

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Marlon Felix Pazian

**Análise dos cromossomos sexuais de *Characidium*
(Characiformes, Crenuchidae) por microdissecção e
pintura cromossômica.**

Botucatu

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise dos cromossomos sexuais de *Characidium*
(Characiformes, Crenuchidae) por microdissecção e
pintura cromossômica.**

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.

Marlon Felix Pazian

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pazian, Marlon Felix.

Análise dos cromossomos sexuais de *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae) por microdissecção e pintura cromossômica / Marlon Felix Pazian. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20406029

1. Citogenética. 2. Cromossomos sexuais. 3. Peixe de água doce. 4. Peixe – Citogenética. 5. Hibridação.

Palavras-chave: *Characidium*; Citogenética; Dop-PCR; Hibridação *in situ*.

AGRADECIMENTOS

Com estas palavras espero conseguir expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta Tese.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e reserva técnica concedida.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Fausto Foresti pela disposição e pelo entusiasmo durante os anos de orientação.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira por sempre estar pronto a ajudar.

Ao Sr. Renato Devidé pela grande disposição em ajudar nas coletas.

Ao Prof. Dr. Ivan por ceder seu laboratório e ao Rodrigo, Juliana, Fábio e o Flávio pela ajuda com as clonagens.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pela ajuda e companheirismo.

À Professora Dra. Maria João Collares Pereira gostaria de agradecer pela hospitalidade e pelo aprendizado que adquiri durante os três meses que passei em seu laboratório; e também agradecer a todos os integrantes do seu grupo de pesquisa (Carla, Catarina, Josefina, Profa. Dra. Maria do Mar, Dr. Massimiliano Rampin e Raquel).

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
1 – INTRODUÇÃO	9
1.1 - ASPECTOS SISTEMÁTICOS E TAXONÔMICOS DOS PEIXES	9
1.2 - CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS	10
1.3 - O SISTEMA CROMOSSÔMICO ZZ/ZW	12
1.4 - O SISTEMA ZZ/ZW E AS REGIÕES DE HETEROCROMATINA EM <i>CHARACIDIUM</i>	12
1.5 – CITOGENÉTICA MOLECULAR E MICRODISSECÇÃO DO CROMOSSOMO W EM <i>CHARACIDIUM</i>	13
2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 – MATERIAL	18
3.2 - MÉTODOS	19
3.2.1 - ESTIMULAÇÃO DE MITOSES	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
3.2.3 - LOCALIZAÇÃO DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA UTILIZANDO A TÉCNICA DE BANDAMENTO C.....	20
3.2.4 - LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS, PELA TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA (Ag-RONS).....	21

3.2.5 - PCR PARA O ISOLAMENTO E MARCAÇÃO DOS GENES DNAR 5S E 18S	21
3.2.6 - MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA.....	22
3.2.7 - DOP-PCR.....	22
3.2.8 - CLONAGEM.....	23
3.2.9 - IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES DE INTERESSE.....	24
3.2.10 - PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS	25
3.2.11 - PCR DE SEQUENCIAMENTO.....	25
3.2.12 - LIMPEZA DA PCR DE SEQUENCIAMENTO	25
3.2.13 - SEQUENCIAMENTO	26
3.2.14 - ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	26
3.2.15 - HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	26
3.2.16 – EXTRAÇÃO DE gDNA	31
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 - CAPÍTULO 1	34
Pintura cromossômica dos cromossomos sexuais Z e W em <i>Characidium</i> (Characiformes, Crenuchidae)	34
4.2 - CAPÍTULO 2	49
Caracterização de sequências presentes no cromossomo W de <i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i> (Characiformes, Crenuchidae).....	49

4.3 - CAPÍTULO 3	69
Análise genômica comparativa por meio da técnica de Gish entre espécies de <i>Characidium</i> (Characiformes; Crenuchidae)	69
4.4 - CAPÍTULO 4	82
Caracterização citogenética de <i>Crenuchus spilurus</i> Günther, 1863 (Characiformes, Crenuchidae).....	82
5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
6 – REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO 1.....	122

Resumo

Foram analisados exemplares de peixes das espécies *Characidium* cf. *fasciatum*, *C. cf. zebra*, *C. cf. lagosantense*, *Characidium* sp. e três amostras de *C. cf. gomesi*, representantes da subfamília Characidiinae e uma amostra de *Crenuchus spilurus*, representante de Crenuchiinae, com o uso de técnicas citogenéticas convencionais por coloração com Giemsa, localização das RONS pela impregnação com Nitrato de prata, bandamento C e moleculares, de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S, sondas produzidas a partir do cromossomo sexual W e uma sonda produzida a partir do genoma de *C. cf. zebra*, com ênfase nas sondas produzidas a partir do cromossomo sexual W. Todas as espécies de *Characidium* apresentaram número diplóide de 50 cromossomos, com predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, tendo sido observada também a ocorrência de cromossomos supranumerários em uma amostra de *C. cf. gomesi* e a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ-ZW nas espécies *Characidium* cf. *gomesi*, *Characidium* cf. *fasciatum*, *Characidium* sp. As espécies *Characidium* cf. *zebra*, *Characidium* cf. *lagosantense* e *Crenuchus spilurus* não apresentaram cromossomos sexuais diferenciados. A técnica de pintura cromossômica utilizando sondas produzidas a partir de cromossomos microdissecados e amplificação por DOP-PCR foi realizada para testar a homeologia dos cromossomos sexuais Z e W encontrados em sete amostras de *Characidium*. Foram produzidas sondas a partir do cromossomo W de *Characidium* cf. *gomesi* (DCg) e de *Characidium* cf. *fasciatum* (DCf). As sondas mostraram sinais de hibridação nos cromossomos Z e W em *Characidium* cf. *gomesi*, *Characidium* cf. *fasciatum*, *Characidium* sp., evidenciando homeologias entre os cromossomos sexuais existentes e uma possível origem comum deste sistema de diferenciação sexual nestas espécies. Por outro lado, em *Characidium* cf. *zebra*, *Characidium* cf. *lagosantense* e *Crenuchus spilurus* a hibridação com as sondas DCg e DCf não revelou marcações nos cromossomos, apontando que a origem do cromossomo W possivelmente tenha ocorrido após a cladogenese dos ancestrais dos dois grupos de espécies do gênero *Characidium* analisadas. Sete sequências de DNA presentes no

cromossomo W de *C. cf. gomesi* (CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW9, CgW13 e CgW34) foram isoladas e caracterizadas mas não apresentaram similaridade com sequências previamente conhecidas. Foi observado que na população de *C. cf. gomesi* do córrego Alambari a sequência CgW4 estava presente apenas nos cromossomos Z e W dos indivíduos estudados, enquanto nos indivíduos coletados no Córrego Águas da Magdalena, esta sequência estava presente também nos cromossomos supranumerários. Os resultados mostraram que os cromossomos B de *C. cf. gomesi* compartilham sequências com os cromossomos Z e W, sugerindo uma origem intra-específica e possivelmente relacionada ao processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nesta espécie. A amostra de *Crenuchus spilurus* apresentou número diplóide de 38 cromossomos (12m + 04sm + 02st + 20a), com as RONS identificadas no par nove pela prata e pela sonda de DNAr 18S estando, contudo, localizadas em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S, que foi observado em dois pares cromossômicos. A análise da heterocromatina constitutiva por bandamento C revelou regiões heterocromáticas no braço curto do par subtelocêntrico número nove e nas regiões pericentroméricas de vários cromossomos acrocêntricos. Não foi observado polimorfismo ligado ao sexo nos exemplares desta espécie. Considera-se que os estudos realizados permitiram um melhor entendimento sobre a estruturação do material genético dos cromossomos autossômicos, cromossomos sexuais e cromossomos B destas espécies, fornecendo também subsídios para o melhor entendimento do processo de diferenciação cromossômica nas espécies estudadas.

Abstract

We analyzed samples of fish species *Characidium* cf. *fasciatum*, *C.* cf. *zebra*, *C.* cf. *lagosantense*, *Characidium* sp. and three strains of *C.* cf. *gomesi*, representatives of the subfamily Characidiinae and a sample of *Crenuchus spilurus*, representative Crenuchiinae, using conventional cytogenetic techniques for staining with Giemsa, location of NORs by impregnation with silver nitrate, C-banding and molecular cytogenetic techniques for fluorescence *in situ* hybridization with probes of 18S and 5S rDNA, probes produced from the sex chromosome W and a probe generated from the genome of *C.* cf. *zebra*, with emphasis on probes produced from the sex chromosome W. All species of *Characidium* showed a diploid number of 50 chromosomes, with the predominance of chromosomes of metacentric and submetacentric types. The occurrence of supernumerary chromosomes was observed in one sample of *C.* cf. *gomesi* and also the presence of a system of sex chromosome ZZ-ZW was observed in *Characidium* cf. *gomesi*, *Characidium* cf. *fasciatum*, *Characidium* sp. The species *Characidium* cf. *zebra*, *Characidium* cf. *lagosantense* and *Crenuchus spilurus* showed no differentiated sex chromosomes. The technique of chromosome painting using probes produced by microdissected chromosomes amplified by DOP-PCR was performed to test the homeology of Z and W sex chromosomes found in seven species of *Characidium*. Probes were produced from the W chromosome of *Characidium* cf. *gomesi* (DCg) and *Characidium* cf. *fasciatum* (DCf). The probes showed hybridization signals on chromosomes Z and W in *Characidium* cf. *gomesi*, *Characidium* cf. *fasciatum*, *Characidium* sp., showing homeology between sex chromosomes in the species and a possible common origin of this sexual differentiation system in these species. Moreover, in *Characidium* cf. *zebra*, *Characidium* cf. *lagosantense* and *Crenuchus spilurus* the hybridization with probes DCg and DCf revealed no markings on chromosomes, pointing that the origin of the W chromosome possibly occurred after the cladogenesis in the ancestors of the two groups of the genus *Characidium* analyzed. Seven sequences of DNA present in the chromosome W of *C.* cf. *gomesi* (CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW9, and CgW13 CgW34) were isolated and characterized but did not showed similarity to previously known sequences. It was observed that the population of *C.* cf. *gomesi* from Alambari stream the CgW4 sequence was present only in the Z and W

chromosomes of the individuals studied, while in individuals collected in the waters of Magdalena stream, this sequence was present in also in the supernumerary chromosomes. The results showed that B chromosomes of *C. cf. gomesi* share sequences with Z and W chromosomes, suggesting an intra-specific origin for B chromosomes and that they are possibly related to the differentiation process of the sex chromosomes in this species. The sample of *Crenuchus spilurus* analyzed showed a diploide number of 38 chromosomes (12m + 04sm + 02st + 20a), with the NORs identified in the pair nine by silver staining and by location of the 18S rDNA probe, being, however, located in different chromosomal compartments of rDNA 5S sequences, which were observed in two chromosome pairs. The analysis of constitutive heterochromatin by C-banding revealed heterochromatic regions on the short arm of the submetacentric pair number nine and in the pericentromeric regions of various acrocentric chromosomes. No sex-linked chromosomal polymorphism was observed in specimens of this species. It is considered that the present studies have allowed a better understanding of the structure and characteristics of the genetic material of autosomal chromosomes, sex chromosomes and B chromosomes of these species, also providing subsidies to the better understanding of the process of chromosome differentiation in the species studied.

1 – Introdução

1.1 - Aspectos sistemáticos e taxonômicos dos peixes

Os peixes constituem mais da metade do número total de espécies de vertebrados existentes (Pough *et al.*, 2003) e segundo Nelson (2006), há aproximadamente 54.711 espécies de vertebrados, das quais cerca de 27.977 são espécies válidas e já identificadas de peixes. Deste total, cerca de 26.761 espécies são espécies de Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas), 1.100 são Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras), 108 são Myxinoidea e Petromyzontoidea (feiticeiras e lampréias) e oito são Sarcopterygii. As demais 26.734 espécies de vertebrados estão incluídas no grupo dos tetrápodos (Nelson, 2006).

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta (Schaefer, 1998). De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas existirem, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. A fauna de peixes de águas continentais do Brasil apresenta-se como a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies já descritas e existindo ainda muitas desconhecidas (Buckup *et al.*, 2007). Neste universo de espécies de peixes de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi, que representam 71% da ictiofauna de água doce Neotropical (Fink; Fink, 1981; Reis *et al.*, 2003).

Entre os Ostariophysi, os Characiformes são peixes exclusivamente de água doce e encontram-se distribuídos nas Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens Neotropicais (Buckup, 1998). Esta ordem compreende 1.460 espécies divididas em 14 famílias, sendo quatro africanas e as demais na região Neotropical (Reis *et al.*, 2003). Os Characiformes apresentam uma grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (Vari, 1998). Além disso, nessa ordem são encontradas desde espécies predadoras, que alcançam cerca de 100 cm de comprimento total até espécies cujas

formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total, as chamadas espécies miniaturas (Weitzman; Vari, 1988).

A família Crenuchidae compreende 12 gêneros (*Ammocryptocharax*, *Characidium*, *Crenuchus*, *Elachocharax*, *Geryichthys*, *Klausewitzia*, *Leptocharacidium*, *Melanocharacidium*, *Microcharacidium*, *Odontocharacidium*, *Poecilocharax* e *Skiocharax*) e possui 71 espécies válidas (Buckup, 1998). Desde a descrição das primeiras espécies de Characidiinae, a posição filogenética deste grupo tem se apresentado confusa, sendo ora considerado como membro de Hemiodontidae, ora como subfamília de Characidae e ora como família independente. No entanto, estudos recentes utilizando a metodologia cladística sugerem que Characidiinae compõe, juntamente com Crenuchinae, a família Crenuchidae (Buckup, 1998). A monofilia de Crenuchidae foi proposta por Buckup (1993b, 1998) e o autor também propõe que o gênero *Characidium* seja monofilético.

O gênero *Characidium* é o mais diversificado e especioso dos gêneros pertencentes à Crenuchidae, estando amplamente distribuído na região Neotropical. Espécies desse gênero ocorrem em rios e riachos desde o Panamá até a Argentina, apresentando atualmente cerca de 50 espécies válidas (Buckup, 1999; Buckup; Hahn, 2000; Reis *et al.*, 2003).

1.2 - Cromossomos sexuais em peixes Neotropicais

Dentre os peixes Neotropicais, diferentes sistemas de cromossomos sexuais já foram descritos. Embora a maioria das espécies não apresente cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos já foram identificados em diferentes grupos de peixes (Devlin; Nagahama, 2002), muitos deles encontrados entre os peixes Neotropicais e correspondendo aos tipos XX/X0 (Alves *et al.*, 2006), ZZ/ZW (Galetti; Foresti, 1986; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Centofante *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a; Machado *et al.*, 2011; Mariotto *et al.*, 2011), XX/XY (Cioffi *et al.*, 2011; Mariotto *et al.*, 2011), $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo *et al.*, 1984; Bertollo *et al.*, 1997; Almeida-Toledo *et al.*, 2000), XX/XY₁Y₂ (Centofante *et al.*, 2006), ZZ/ZW₁W₂, Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂, (Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012).

A heterogametia feminina, principalmente o sistema ZZ/ZW, tem sido o mecanismo mais frequente, correspondendo a mais de 50% das ocorrências de cromossomos sexuais em peixes. Neste caso enquadram-se algumas espécies dos gêneros *Leporinus*, *Parodon*, *Thorococarax*, *Potamorhina*, *Semaprochilodus*, *Cheirodon*, *Odontostilbe*, *Hypostomus*, *Microlepidogaster*, *Loricariichthys*, *Opsodoras*, *Eigenmannia*, *Gambusia* (Centofante *et al.*, 2002), *Ancistrus* (Mariotto *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2007), *Apareiodon* (Vicari *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006), *Leporinus* (Galetti; Foresti, 1986; Galetti *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1998; Parise-Maltempo *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012), *Triporthus* (Artoni *et al.*, 2001; Artoni; Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2007), além de algumas espécies do gênero *Characidium* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a; Machado *et al.*, 2011)

Contudo, a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos não é regra geral entre os peixes. De fato, apenas cerca de 6% das espécies cariotipadas apresentam essa característica, correspondendo ao redor de 63 casos descritos em peixes Neotropicais (Oliveira *et al.*, 2009). Entre os sistemas simples, como ocorre com o sistema ZZ/ZW, a heterocromatina está associada à diferenciação morfológica destes cromossomos, principalmente do cromossomo W (Galetti; Foresti, 1986; Feldberg *et al.*, 1987; Bertollo; Cavallaro, 1992; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Andreato *et al.*, 1993; Artoni *et al.*, 2001; Artoni; Bertollo, 2002; Centofante *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2008, Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a; Marreta *et al.*, 2012). Entretanto, entre os sistemas múltiplos, rearranjos estruturais estão associados com a diferenciação destes sistemas, principalmente translocações e fusões cromossômicas (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo; Mestriner, 1998).

Por sua vez, é também interessante ressaltar que a coexistência de diferentes sistemas de cromossomos sexuais não é um atributo do grupo dos peixes como um todo, mas pode ocorrer entre espécies de uma mesma família assim como de um mesmo gênero, evidenciando processos de evolução independentes para estes sistemas (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Jesus; Moreira-Filho, 2000; Almeida-Toledo; Foresti, 2001; Centofante *et al.*, 2002).

1.3 - O sistema cromossômico ZZ/ZW

A ocorrência do sistema ZZ/ZW já foi caracterizada em várias espécies de peixes pertencentes aos gêneros *Leporinus* (Galetti ; Foresti, 1986; Galetti *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1998; Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012); *Microlepidogaster* (Andreatta *et al.*, 1993), *Parodon* (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Vicente *et al.*, 2003; Centofante *et al.*, 2002), *Triportheus* (Bertollo; Cavallaro, 1992; Artoni *et al.*, 2001; Artoni; Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2007), *Characidium* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Pansonato-Alves *et al.*, 2010), *Semaprochilodus taeniurus* (Feldberg *et al.*, 1987), *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Henning *et al.*, 2008b), *Loricariichthys platymetopon* (Scavone; Júlio Jr., 1995), *Hypostomus* sp. (Artoni *et al.*, 1998), *Ancistrus* (de Oliveira *et al.*, 2007; Mariotto *et al.*, 2011), *Apareiodon* (Vicari *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006). Uma descrição mais detalhada pode ser encontrada em Centofante *et al.* (2002).

Em vários casos como em *Leporinus*, *Parodon*, *Semaprochilodus* e *Microlepidogaster*, o acúmulo de heterocromatina constitutiva propiciou um diferencial do cromossomo W ao longo do processo evolutivo, contribuído para a sua diferenciação morfológica em relação ao cromossomo Z. Em espécies do gênero *Leporinus*, segmentos distintos de heterocromatina caracterizados por fluorocromos base específicos, podem ser observados nos cromossomos sexuais (Molina *et al.*, 1998). Os dados obtidos a partir de diferentes metodologias de análise corroboram a proposição de que houve uma origem comum para o sistema de cromossomos sexuais entre diferentes espécies do gênero (Galetti; Foresti, 1986).

1.4 - O sistema ZZ/ZW e as regiões de heterocromatina em *Characidium*

O gênero *Characidium* começou a ser citogeneticamente estudado por Miyazawa; Galetti (1994) que caracterizaram os cromossomos das espécies *C. cf. zebra*, *C. lagsantense* e *C. pterostictum*. Maistro *et al.*, (1998), também analisando espécies de *Characidium*, descreveram a existência do sistema sexual ZZ/ZW nos exemplares estudados e, a partir de então, sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW foram descritos nas espécies *C. gomesi* (Centofante *et al.*, 2001), *C. cf. alipioi* (Centofante *et al.*, 2003) e *C. cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008). Pansonato-Alves

et al. (2010) descrevem mais cinco espécies portadoras de cromossomos sexuais, relacionando *C. schubarti*, *Characidium* sp., *C. oiticicai*, *C. lanei* e *C. lauroi*.

Estes estudos demonstraram algumas características inerentes ao gênero *Characidium*, pois todas essas espécies compartilham o mesmo número diplóide, sendo mantido o valor de $2n=50$ cromossomos. O cariótipo se mantém conservado, com uma macroestrutura cariotípica bastante similar entre as diferentes espécies, além de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW que é mais uma característica de algumas espécies do grupo, podendo ser encontradas ao lado de espécies congênicas com cariótipos homomórficos que não apresentam cromossomos sexuais.

O cromossomo Z também é conservado em todas as espécies estudadas, correspondendo a um cromossomo metacêntrico de tamanho médio do cariótipo e evidenciando segmentos heterocromáticos presentes na região centromérica e pericentromérica, enquanto o cromossomo W geralmente apresenta-se totalmente heterocromático. Torna-se evidente, portanto, que a heterocromatina encontra-se claramente envolvida na diferenciação do sistema ZZ/ZW em *Characidium*, particularmente devido à sua localização e distribuição no cromossomo W.

1.5 – Citogenética molecular e microdissecção do cromossomo W em *Characidium*

O advento da tecnologia de genética molecular possibilitou um aumento significativo do conhecimento sobre a estrutura e comportamento dos cromossomos durante a mitose e a meiose, assim como a descrição das alterações cromossômicas não identificadas através das análises cromossômicas convencionais nos diferentes organismos.

A microdissecção cromossômica é um método confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para diferentes aplicações, incluindo o estabelecimento de sondas para FISH, construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e o mapeamento físico dos cromossomos para análise citogenética. Esta técnica foi introduzida inicialmente em estudos de citogenética humana (Bates *et al.*, 1986),

com a construção de uma biblioteca do cromossomo 2 usando-se muitos fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke *et al.*, (1989) descreveram um procedimento de microdissecção no qual foi utilizada a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificar pequenas quantidades de DNA dos fragmentos cromossômicos dissecados. Esse método foi aperfeiçoado por Senger *et al.* (1990) que dissecaram com sucesso regiões específicas de cromossomos bandeados com a técnica GTG. E, finalmente, Meltzer *et al.* (1992) e Deng *et al.* (1992) desenvolveram a técnica de micro-FISH, na qual a microdissecção cromossômica é seguida pela amplificação do material dissecado via PCR, utilizando-se um *primer* degenerado (DOP - *Degenerated Oligonucleotide Primer*). O produto do PCR é, então, utilizado como sonda para FISH.

A técnica de microFISH permite a localização cromossômica de sequências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros (Trask, 1991). Em humanos, quando aliada às metodologias de citogenética clássica, esta técnica tem se constituído numa poderosa ferramenta da genética clínica para a caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer *et al.*, 1997; Wiltshire *et al.*, 2001; Nuntakarn *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; entre outros). No campo de estudos sobre evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Taguchi *et al.*, 2003; Nieves *et al.*, 2005; Neusser *et al.*, 2005), cervídeos (Li *et al.*, 2005) e roedores (Fagundes *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2004), entre outros.

A pintura cromossômica que representa uma metodologia amplamente utilizada em estudos citogenéticos e evolutivos nos mamíferos, apresenta-se como uma ferramenta bastante eficaz no estudo de homeologias cromossômicas. A associação desta metodologia com a técnica de microdissecção cromossômica vem sendo aplicada com sucesso nos estudos com peixes, sendo que os trabalhos existentes se concentram principalmente no conhecimento, comportamento e identificação dos cromossomos supranumerários e dos cromossomos sexuais.

Em estudos com cromossomos sexuais de peixes Reed *et al.* (1995) produziram uma sonda derivada do braço menor do cromossomo Y de *Salvelinus*

namaycush que hibridou nos cromossomos X e Y dessa espécie e no maior par de cromossomos submetacêntricos de duas outras espécies de salmonídeos, indicando que esses pares de cromossomos seriam homeólogos. Harvey *et al.* (2002) usaram esta técnica para produzir sondas específicas dos homólogos componentes do maior par do complemento de *Oreochromis niloticus* e os resultados obtidos forneceram evidências da existência de diferenças nas sequências gênicas nos cromossomos deste par, dando suporte à teoria de que estariam relacionados à determinação sexual e que estes cromossomos sexuais ainda estariam num grau inicial de divergência. Stein *et al.* (2002) isolaram um locus de microssatélite do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush* ligado ao sexo, sendo que este locus foi localizado próximo ao telômero. Mais recentemente, em estudos realizados em peixes Neotropicais, vários trabalhos utilizaram sondas confeccionadas a partir dos cromossomos sexuais microdissectados de espécies pertencentes aos gêneros *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008a), *Triportheus* (Diniz *et al.*, 2008), *Characidium* (Machado *et al.*, 2011), *Apareiodon* e *Parodon* (Schemberger *et al.*, 2012) com grande sucesso, realizando inferências sobre a origem dos cromossomos sexuais nas espécies estudadas e contribuindo com informações interessantes sobre a evolução dos cromossomos sexuais ocorrida nestes grupos.

As variações cariotípicas observadas em diferentes espécies de *Characidium* estão relacionadas principalmente a eventos cromossômicos envolvendo a distribuição de heterocromatina e parecem convergir, conforme evidenciado por Pansonato-Alves *et al.* (2010), para a formação de dois grupos de espécies neste gênero. Um primeiro grupo apresenta heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos e ausência de sistema cromossômico de determinação sexual. E um segundo grupo, que além da heterocromatina pericentromérica e telomérica observada nos representantes do primeiro grupo, também possuem grandes blocos intersticiais e/ou terminais e um sistema cromossômico de determinação sexual do tipo ZZ-ZW.

Nesse último grupo, a heterocromatinização parcial ou até mesmo total observada em um dos cromossomos do par sexual, o cromossomo W, é uma característica comum a todas as espécies que o possuem. No entanto, o padrão de distribuição da heterocromatina neste cromossomo sexual, assim como em alguns pares de autossomos, indica que possam ter ocorrido eventos de diferenciação

cromossômica posteriores ao surgimento desse sistema cromossômico sexual ancestral (Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a, Machado *et al.*, 2011).

A microdissecção cromossômica se apresenta como um método direto de análise da composição molecular dos cromossomos ligados ao sexo. E as informações obtidas dessas análises são de grande interesse para o entendimento dos processos de diferenciação destes cromossomos no genoma. Dessa forma, a utilização da metodologia de micro-FISH apresenta-se como uma ferramenta valiosa para a obtenção de dados visando a uma melhor compreensão da composição e estrutura do genoma e dos mecanismos envolvidos na origem e evolução deste tipo de cromossomos nas espécies do gênero e, de forma geral, nos peixes.

2 - Justificativa e objetivos

Conforme destacado anteriormente, as espécies do gênero *Characidium* apresentam algumas peculiaridades, onde se destaca a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, que as torna um interessante modelo para estudos de evolução cromossômica. Essa característica tem despertado interesse sobre a origem e evolução deste sistema de heteromorfismo cromossômico que ocorre neste grupo de peixes.

Neste contexto, a obtenção por microdissecção de uma sonda proveniente do cromossomo W de representantes do gênero *Characidium*, permite uma abordagem mais refinada do processo de evolução do sistema ZZ/ZW entre as espécies de *Characidium*, assim como um melhor entendimento da constituição da heterocromatina constitutiva presente no cromossomo W e seu possível papel no processo de diferenciação destes cromossomos sexuais. Assim, como objetivo geral desse trabalho é proposto o estudo da estrutura, composição, origem e evolução do cromossomo W de *Characidium*. Para alcançar tal objetivo foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

a) obter informações sobre a estrutura, composição, origem e evolução do cromossomo W em diferentes espécies de *Characidium* por meio de micro-FISH e pintura cromossômica;

- b)** obter informações sobre a estrutura, composição, origem e evolução do cromossomo W em *Characidium* cf. *gomesi*, através da caracterização de seqüências específicas para o cromossomo W;
- c)** obter informações sobre a estrutura, composição, origem e evolução do cromossomo W em diferentes espécies de *Characidium*, através do mapeamento de seqüências cromossomo W específicas no complemento cromossômico padrão de *Characidium* cf. *gomesi*.
- d)** obter informações sobre a estrutura do cariótipo da espécie *Crenuchus spilurus* através da caracterização cariotípica por coloração convencional com Giemsa, localização das RONS pela impregnação por Nitrato de prata, e bandamento C, bem como por métodos de citogenética molecular, realizando a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S, sondas obtidas de cromossomos sexuais e seqüências teloméricas.

3 - Material e Métodos

3.1 – Material

Foram coletadas amostras da espécie *Characidium* cf. *gomesi* provenientes de um pequeno tributário do Rio Tietê (SP), rio Alambari (S 22° 56' 08,00" W 48° 19' 15,00") e do riacho Águas da Magdalena, tributário do rio Paranapanema, localizados no município de Botucatu-SP (S 22° 59' 26,28" W 48° 25' 37,68"); de *Characidium* cf. *fasciatum*, coletadas em componentes da bacia hidrográfica do Rio das Velhas (Rio São Francisco), município de Curvelo/MG (S 19° 38' 18,50" W 44° 07' 17,60"); de *C.* cf. *gomesi*, coletadas no Córrego da Cachoeira, Bacia do Alto Paraná, município de Itumirim/GO (S 18° 34' 50,80" W 52° 05' 52,80"); de *Characidium* sp., coletadas no Rio Formoso, Bacia do Alto Paraná, município de Chapadão do Céu/GO (S 18° 16' 17,00" W 52° 50' 34,40"); de *C.* cf. *zebra*, coletadas no Ribeirão Claro, Bacia do Rio Tietê, município de Rio Claro/SP (S 22° 22' 42,99" W 47° 32' 04,08"); de *C.* cf. *lagosantense*, coletadas no córrego Amendoim, Bacia do Rio das Velhas, município de Curvelo/MG (S 18° 43' 14,60" W 44° 20' 47,30") e de *Crenuchus spilurus*, coletadas no igarapé Cajueirinho, Rio Caeté, Município de Tracuateua/PA (S 01° 05' 07,80" W 46° 51' 44,30"). Após as coletas foram preparadas suspensões celulares para obtenção e análise dos cromossomos mitóticos nestas espécies. Todos os exemplares coletados foram inicialmente fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e posteriormente depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes para futuras análises.

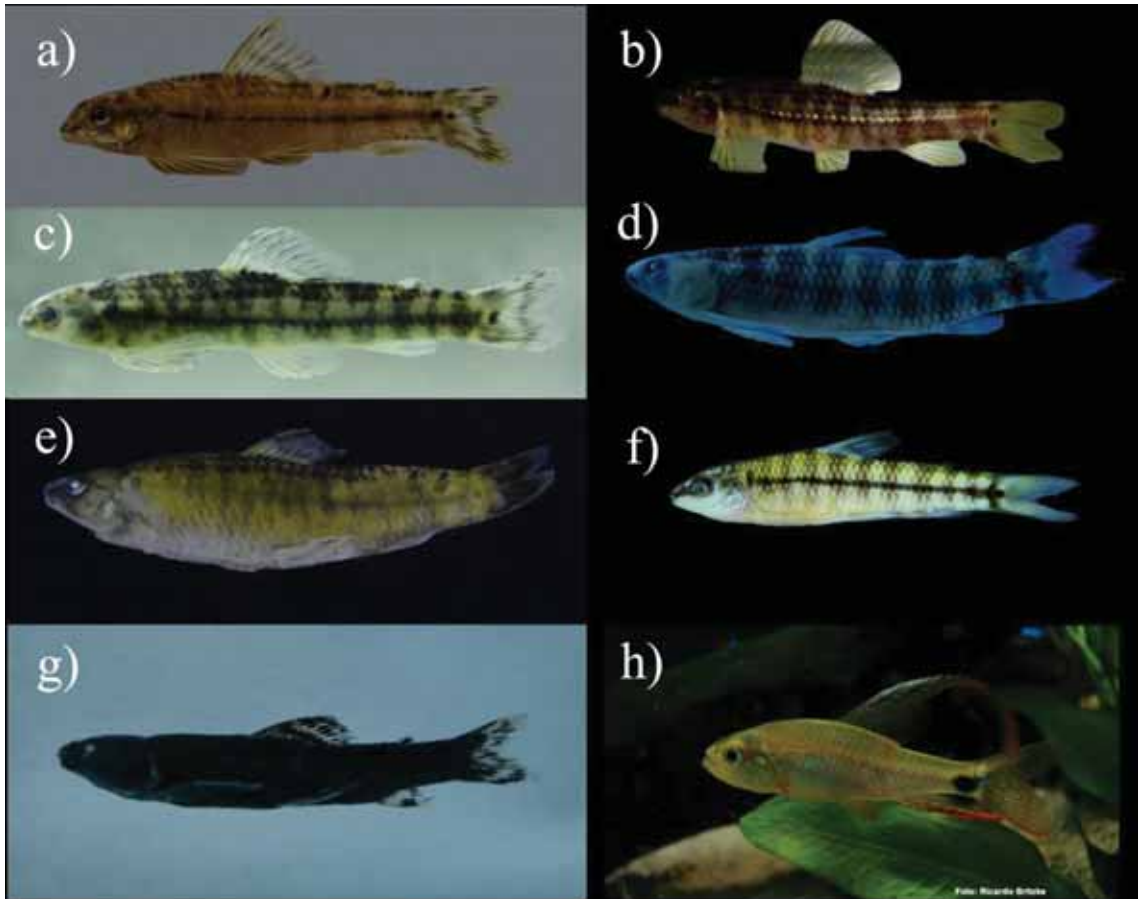


Figura 1: Exemplos das espécies analisadas: a) *Characidium* cf. *gomesi*; b) *Characidium* sp.; c) *C. cf. gomesi*; d) *C. cf. zebra*; e) *C. cf. fasciatum*; f) *C. cf. lagosantense*; g) *C. cf. gomesi* e h) *Crenuchus spilurus*.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparação de cromossomos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção de figuras mitóticas foi a descrita por Foresti *et al.* (1981), com adaptações pertinentes para a espécie estudada. O protocolo utilizado pode ser descrito como segue: injetar, intraperitonealmente, uma solução de colchicina 0.016% (1ml/100g de peso do animal). Deixar a animal nadando livremente por 40 minutos. E, então, sacrificá-lo, retirando a porção anterior do rim, colocando os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6ml de solução hipotônica (KCl 0,075M).

Dissociar o material na placa, procurando obter uma suspensão homogênea de células e, então, transferir o material da placa de Petri para um tubo de centrifuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 20 minutos. Retirar a suspensão celular da estufa e adicionar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura e deixá-la em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionar mais cerca de 6ml de fixador e novamente agitar levemente a mistura. Centrifugá-la (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6ml de fixador e centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100 rpm. Repetir o item anterior por duas vezes. Após a última centrifugação, pode-se gotejar a suspensão celular em lâminas limpas, para coloração com Giemsa a 5% e observação ou retirar o sobrenadante, ressuspender em 0,5-1ml de metanol e armazenar a -20°C para uso na microdissecção.

3.2.2 - Localização de heterocromatina constitutiva utilizando a técnica de bandamento C

Para a obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas adaptações, seguindo o seguinte protocolo: tratar o material preparado segundo a técnica descrita para obtenção de cromossomos mitóticos com HCl 0,2 N à temperatura ambiente durante 30 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar. Mergulhar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 5%, recém preparada e filtrada, a 60° C, por aproximadamente 15 segundos. Para interromper a ação da solução de hidróxido de Bário, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 1N e lavá-la em água destilada. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 30 minutos. Após este período, lavar a Lâmina com a preparação em água destilada e deixar secar ao ar. Corar com solução de Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato (pH=6.8) durante 15 minutos.

3.2.3 - Localização das regiões organizadoras de nucléolos, pela técnica de impregnação com nitrato de Prata (Ag-RONs)

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas utilizando a técnica descrita por Howell ; Black (1980), com adaptações. Foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução A: solução coloidal reveladora: dissolver 1,0 g de gelatina em 50,0 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico (mantida em frasco escuro e em geladeira. Pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor).

Solução B: solução de nitrato de Prata: 1,0 g de AgNO₃ dissolvida em 2,0 ml de água destilada(mantida em frasco escuro e a 4°C).

O protocolo empregado pode ser descrito como segue: hidrolisar o material contido na lâmina por 3 minutos em HCl 1N à temperatura de 60°C; lavar em água destilada e deixar secar ao ar. Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota de solução A e adicionar sobre a gota anterior 2 gotas de solução B. Misturar bem e cobrir com uma lamínula. Incuba- lá sobre um suporte no interior do banho-maria a 60° C, por aproximadamente 3 minutos. Após a preparação assumir uma tonalidade amarelada, lavar em água destilada, 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.

3.2.4 - PCR para o isolamento e marcação dos genes DNAr 5S e 18S

Foram realizadas amplificações dos genes DNAr 5S de *Leporinus elongatus*, segundo Martins ; Galetti (1999) e 18S de *Prochilodus argenteus*, segundo Hatanaka ; Galetti (2004), utilizando-se os seguintes *primers*, M13F (5' AGCGGATAACAATTTACACAGG 3') e M13R (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'). Para cada amostra a ser amplificada com os *primers* 5S e 18S, foi preparada a seguinte reação (*mix*): 0,5µl de Primer F (10µM);

0,5µl de Primer R (10µM); 3,0µl de dNTP (2mM) (dATP,dCTP e dGTP); 0,7µl de dNTP (2mM) (dUTP); 0,6µl de Digoxigenina 11-dUTP (Roche) (1mM); 0,2µl de Taq (5U/µl); 5µl de Tampão (10X); 4µl de MgCl₂ (50 mM); 1,0µl de DNA (cerca de 50ng de DNA); 34,5µl de H₂O, em um volume total de 50µl. As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cyclers (MJResearch, InC.).

O programa utilizado para a amplificação dos genes para DNAr 5S e 18S consistiu de uma etapa inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, e uma etapa final de 7 minutos a 72°C. Para verificar a efetividade da reação e a amplificação dos fragmentos dentro do tamanho esperado, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,0%, corados com Blue Green Loading Dye I (LCG Biotecnologia) e visualizados em um transiluminador de UV.

3.2.5 - Microdissecção cromossômica

Na aplicação da técnica de microdissecção de cromossomos, foi utilizado o protocolo que pode ser descrito como segue: diluir uma alíquota da suspensão celular final em metanol: ácido acético na proporção 3:1, respectivamente, pingar a suspensão em lamínulas grandes, 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. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.

Depositar a lamínula contendo a preparação celular na platina de um microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder à microdissecção dos cromossomos com o auxílio de agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR.

3.2.6 - DOP-PCR

A amplificação do material microdissecado foi feita segundo o protocolo descrito por Mühlmann-Diaz *et al.* (2001), com algumas adaptações, num

termociclador PTC-100TM (MJ Research, InC.). Adicionar 5µl de água ao material coletado e aquecê-lo por 10 min a 95°C. Em seguida, acrescentar 20µl de reação de PCR, composto por tampão 2X = 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0,2% de Triton-X, 3mM MgCl₂; 500µM de cada dNTP; 2,5µM de *primer* DOP (*degenerated oligonucleotide primer*) 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'; e 2U de *Taq* polimerase.

O programa de PCR consistirá de 10 ciclos de baixa estringência (94°C por 1,5 min, 37°C por 3 min e 72°C por 4 min), seguidos por 30 ciclos de alta estringência (94°C por 1,5 min, 56°C por 1 min, e 72°C por 1,5 min). Os produtos serão checados em gel de agarose 1%. Em seguida, aliquotar 3µl do primeiro produto de PCR e realizar uma nova reação de amplificação num volume final de 50µl (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 3µl DOP primer = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3 (10µM) e 2 unidades de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 90° por 5 minutos depois 30 ciclos (90°C por 1,5 min, 56°C por 1,5 min e 72°C por 1,5 min) e um ciclo à 72°C por 7 minutos. Checar o produto da PCR em gel de agarose 1%.

3.2.7 - Clonagem

As amostras de DNA foram isoladas do gel de agarose e posteriormente ligadas ao plasmídeo pGEM®-T (Promega) para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. O procedimento geral consta em adicionar 3µl do inserto de interesse (fragmento de DNA) em um tubo de 0,5 ml, acrescentando-se 1µl de T4 DNA ligase, 5µl de tampão de reação 2x, 1µl do plasmídeo pGEM-T (54 ng/µl). Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12-16 horas.

A seguir, descongelar as células competentes em gelo, aliquotar 50µl das células competentes, que são transferidas para um tubo de microcentrifuga de 1,5ml e mantidas em gelo. Recolocar o restante das células competentes em freezer -70° C. Adicionar 4µl do produto de ligação (inserto-plasmídeo) ao tubo contendo os 50µl de células competentes, misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter

o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico de 20 segundos em banho-maria a 37°C. Colocar o tubo imediatamente em gelo e manter por 2 minutos. Adicionar ao tubo 950µl de meio líquido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%) à temperatura ambiente e agitar a 225rpm por uma hora a 37°C. Centrifugar por 10 segundos a 14000rpm e descartar parte do sobrenadante.

Espalhar 150µl do produto de transformação em placas de Petri estéreis contendo meio sólido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, ph 7,5), contendo 2µl de ampicilina (50 mg/ml) por mililitro de meio LB, 50µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside) (50mg/ml) e 100µl de IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) (100 mM). Incubar as placas com o meio voltado para baixo por 16 a 18 horas a 37°C. As colônias brancas serão transferidas para tubos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina, com ajuda de palitos ou ponteiros de micropipeta autoclavados. Os tubos com as bactérias serão, então, mantidos *overnight* (16-18h) sob agitação (300rpm) a 37°C. Transferir 0,8ml do meio com as bactérias para tubos de microcentrifuga de 1,5ml contendo aproximadamente 200µl de glicerol estéril. O material será homogeneizado e armazenado a -70°C.

3.2.8 - Identificação dos clones de interesse

Os clones de interesse foram identificados através de reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o plasmídeo. A reação foi feita num volume total de 50µl (50pmol de cada *primer* - M13F (5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3') e M13R (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'), tampão de reação 1x (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris-HCl 10 mM), 2mM de cada dNTP e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences). Para tanto, deve-se encostar um palito estéril sobre a colônia recombinante e mergulhar o palito no tubo de 0,5ml contendo as soluções para amplificação.

As reações de amplificação serão realizadas num termociclador PTC-100™ (MJ Research), de acordo com as seguintes condições: um ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 50°C, 2 minutos a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Para verificar a efetividade da reação e a

amplificação de fragmentos dentro do tamanho esperado, checar o produto de PCR em gel de agarose 2%.

3.2.9 - Purificação das amostras amplificadas

Após checagem da amplificação, os produtos da PCR foram purificados com o kit “*ExoSap-ITO*®” (USB Corporation) seguindo as recomendações do fabricante com algumas alterações. Em um tubo para PCR (0,2 ml) foram colocados 5,0µl do DNA amplificado juntamente com 2,0µl da solução de ExoSap (0,13µl de ExoSap + 1,87µl de água ultrapura). A mistura foi encubada em termociclador por 1 hora a 37 °C seguida de 15 minutos à 80°C.

3.2.10 - PCR de sequenciamento

Para realização da PCR de sequenciamento foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Inc.). Foi montada uma reação com 7µl de volume final contendo: 1,4µl de DNA (produto amplificado e purificado), 0,35µl de primer (10uM), 0,7µl de solução Pré-Mix (kit BigDye), 1,05µl de Tampão 5X (kit BigDye) e 3,5µl de água ultrapura autoclavada. A reação foi submetida ao processo de amplificação em um termociclador, seguindo as seguintes condições de amplificação: 2 minutos de desnaturação inicial a 96°C seguidos 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Os conjuntos de *primers* utilizados na PCR de sequenciamento são o conjunto de *primers* universais M13F/M13R.

3.2.11 - Limpeza da PCR de sequenciamento

Após a amplificação, os sequimentos de DNA a serem sequenciados foram submetidos a um protocolo de limpeza, para a eliminação de excessos de reagentes, seguindo o procedimento: adicionar 0,7µl de EDTA (125mM); 0,7µl de Acetato de Sódio (3M). Homogeneizar e centrifugar brevemente; Adicionar 17,5µl de etanol 100%; Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente; centrifugar por 15

minutos a 13.000 rpm à 25°C; descartar o etanol e secar em papel toalha e adicionar 24,5µl de etanol 70% gelado. Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm à 20°C, descartar o etanol e secar em papel toalha. Adicionar novamente 24,5µl de etanol 70% gelado, centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm à 20°C, descartar o etanol e secar em papel toalha. A seguir, secar em termociclador aberto por 2 minutos a 96°C sem tampa nos tubos e guardar à -20°C, os tubos já secos e envoltos em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.2.12 - Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI 3130 DNA Analyzer (Perking-Elmer), seguindo o procedimento padrão.

3.2.13 - Análise das sequências nucleotídicas

As sequências foram editadas com auxílio do programa computacional Bio Edit (Hall, 1999). Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas *online* BLASTn (Altschul *et al.*, 1990), através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Posteriormente, as seqüências serão depositadas no GenBank.

3.2.14 - Hibridação *in situ*

A técnica de hibridação *in situ* fuorescente foi realizado de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações.

Marcação da sonda por PCR utilizando Biotina 11 dUTP

Marcação via PCR utilizando Digoxigenina 11 dUTP Reagentes	
Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima 10X	5.0 µl

DNA Variável 10-100ng	--
dATP 2mM	1,0 µl
dCTP 2mM	1,0 µl
dGTP 2mM	1,0 µl
dTTP 2mM	0,7 µl
Digoxigenina 11dUTP 1Nmol/µl	0,6 µl
Primer DOP 10µM	5,0 µl
MgCl ₂ 50mM	2,0 µl
dH ₂ O variável (completar 50 µl)	--
Taq polimerase 5U/ µl	0,5 µl
Total	50 µl

Marcação da sonda por PCR utilizando utilizando Biotina 14 dUTP

Marcação via PCR utilizando Biotina 14 dUTP Reagentes	
Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima 10X	5.0 µl
DNA Variável 10-100ng	--
dATP 2mM	1,0 µl
dCTP 2mM	1,0 µl
dGTP 2mM	1,0 µl
dTTP 2mM	0,5 µl

Biotina 14 dUTP 1Nmol/ μ l	0,5 μ l
Primer DOP 10 μ M	5,0 μ l
MgCl ₂ 50mM	2,0 μ l
dH ₂ O variável (completar 50 μ l)	--
Taq polimerase 5U/ μ l	0,5 μ l
Total	50 μ l

Foi utilizado o seguinte protocolo:

- a) após a amplificação, checar o produto de PCR em gel de agarose 1%;
- b) precipitar o produto de PCR com 1/10 do volume da reação com acetato de sódio 3M e duas vezes o volume total da reação com etanol PA gelado;
- c) incubar a -20°C *over night*;
- d) centrifugar a 14.000rpm por 10 minutos;
- e) descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 50 μ l etanol 70%;
- f) centrifugar a 14.000rpm por 5 minutos;
- g) descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir 40 μ l de água.

Tratamento das lâminas contendo preparações cromossômicas

Usar lâminas recém-preparadas ou descongelar as lâminas em temperatura ambiente uma hora antes do uso e desenvolver a seguinte programação:

- a) lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente (com agitação);
- b) desidratar as lâminas em séries alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (com agitação);

- c) incubar as lâminas em 100µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
- d) lavar 3 x por 5 minutos em 2xSSC (com agitação);
- e) lavar durante 5 minutos em PBS 1x;
- f) incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37°C;
- g) lavar em PBS 1x durante 5 minutos a temperatura ambiente (com agitação);
- h) Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- i) lavar em PBS 1x por 5 minutos (com agitação);
- j) desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100%) por 5 minutos cada;
- k) simultaneamente à desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;
- l) desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- m) desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada.

Hibridação

- a) preparar a câmara úmida a 37°C;
- b) montar cada lâmina com 50µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C;

Solução de Hibridação:

- 200µl Formamida (50% de Formamida);
- 80µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);

- 72µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda seca.

- Volume final 400µl

Lavagens

a) lavar 2 vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC, pH 7.0, a 42°C, durante 10 minutos cada (com agitação);

b) lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada (com agitação);

c) incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos;

d) lavar 2 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente (com agitação).

Detecção e amplificação do sinal para sondas marcadas com Biotina

a) incubar as lâminas com 100µl de FITC (1µl FITC/99µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;

b) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação);

c) incubar com 100µl de anti-avidina (1µl anti-avidina/99µl de NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;

d) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (com agitação)

e) incubar as lâminas com 100µl de FITC (1µl FITC/99µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a 37°C;

f) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente (com agitação);

g) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, durante 5 minutos cada (secar).

Detecção de duas sondas (Double FISH)

- a) montar um mix contendo 98 μ l + 1 μ l de avidina FITC conjugada + 1 μ l de antidigoxigenina rodamina conjugada;
- b) incubar as lâminas com 100 μ l cada do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- c) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente(com agitação);
- d) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, por 5 minutos cada (secar).

Detecção do sinal para sondas marcadas com Digoxigenina

- a) montar um mix contendo 99 μ l + 1 μ l de antidigoxigenina rodamina conjugada;
- b) incubar as lâminas com 100 μ l cada do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- c) lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente(com agitação);
- d) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, por 5 minutos cada (secar).

Montagem das lâminas com DAPI

- a) misturar 400 μ l de antifading com 1 μ l de DAPI (0,2 mg/ml);
- b) colocar 50 μ l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.
- c) ou 22 μ l de contra-corante com DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI) e observar em microscópio de fluorescência.

3.2.15 – Extração de gDNA

As extrações de gDNA foram realizadas segundo o protocolo proposto por Aljanabi; Martinez (1997), com modificações:

- a) em um cadinho, dissociar a amostra em 290µl de tampão de extração (30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) e transferir a solução obtida para um tubo de PCR de 1,5 ml.
- b) adicionar 10µl de proteinase K (10 mg/ml) e deixar em banho-maria (55°C) de 2 a 3 horas, vertendo-os esporadicamente.
- c) adicionar 100µl de solução de NaCl5M e misturar bem vertendo o tubo vagarosamente.
- d) centrifugar a 10.000rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.
- e) remover 300µl do sobrenadante e transferir para um novo tubo de 1,5ml.
- f) adicionar 600µl de etanol 100% gelado.
- g) deixar no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos.
- h) centrifugar a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C.
- i) remover o sobrenadante.
- j) secar bem (pode-se deixar em estufa a 37°C por até 30 minutos ou então *overnight* em temperatura ambiente).
- l) adicionar 200µl de água ultrapura autoclavada. Deixar à temperatura ambiente ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.
- m) aliquotar o DNA e guardar cerca de 150µl no freezer (-20°C), para solução estoque e o restante na geladeira (4°C), para a solução de trabalho.

4 - Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Characidium* são apresentados a seguir, na forma de capítulos:

4.1 - Capítulo 1 - Pintura cromossômica dos cromossomos sexuais Z e W em *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae).

4.2 - Capítulo 2 - Caracterização de sequências presentes no cromossomo W de *Characidium* cf. *gomesi* (Characiformes, Crenuchidae).

4.3 - Capítulo 3 - Análise genômica comparativa por meio da técnica de Gish entre espécies de *Characidium* (Characiformes; Crenuchidae).

4.4 - Capítulo 4 - Caracterização citogenética de *Crenuchus spilurus* Günther, 1863 (Characiformes, Crenuchidae).

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

4.1 - Capítulo 1

**Pintura cromossômica dos cromossomos sexuais Z e W em
Characidium (Characiformes, Crenuchidae)**

Resumo

Algumas espécies do gênero *Characidium* apresentam cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW, sendo o cromossomo W totalmente heterocromático. A microdissecção cromossômica, associada à pintura cromossômica, tornou-se ferramenta importante para estudos citogenéticos em peixes Neotropicais. Em *Characidium* cf. *fasciatum*, o cromossomo Z contém um bloco de heterocromatina pericentromérica, ao passo que o cromossomo W é totalmente heterocromático. Uma sonda foi produzida a partir do cromossomo W com o uso de microdissecção e amplificação por DOP-PCR, a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada utilizando a sonda nos cromossomos W de exemplares da espécie. Foram identificados sinais de hibridação na região pericentromérica do cromossomo Z, bem como o cromossomo W foi totalmente marcado. Ao aplicar o mesmo teste em preparações cromossômicas de *C.* cf. *gomesi* e *Characidium* sp., um padrão semelhante ao *C.* cf. *fasciatum* foi encontrado, enquanto que as espécies *C.* cf. *zebra*, *C.* cf. *lagosantense* e *Crenuchus spilurus* não apresentaram sinais de hibridação. Considera-se que alterações estruturais nos cromossomos de um sistema sexual ancestral no grupo que inclui a espécie *C.* cf. *gomesi*, *C.* cf. *fasciatum* e *Characidium* sp., podem ter contribuído para o processo de especiação e poderia representar um mecanismo causal da diversificação cromossômica neste grupo. O processo de heterocromatinização possivelmente começou em cromossomos homólogos homomórficos em uma forma ancestral e poderia ter dado origem aos atuais padrões de diferenciação encontrados nas espécies deste grupo com cromossomos sexuais heteromórficos.

Introdução

Crenuchidae é uma família de pequenos peixes de água doce composto por duas subfamílias: Characidiinae e Crenuchinae (Buckup, 1998). O gênero *Characidium* é o mais diversificado da família Crenuchidae. Amplamente distribuído na região Neotropical (Buckup, 2003), *Characidium* é considerado o grupo mais especioso da subfamília Characidiinae, composta por cerca de 52 espécies reconhecidas (Buckup, 1999; Buckup; Hahn, 2000).

Os peixes teleósteos são um bom modelo para estudo de processos evolutivos de diferenciação dos cromossomos sexuais porque seus cromossomos sexuais diferem em sua origem e nível de modificações (Takehana *et al.*, 2012). Estudos citogenéticos envolvendo representantes do gênero *Characidium* foram iniciados por Miyazawa e Galetti (1994), que caracterizaram os cariótipos de espécies da *C. cf. zebra*, *C. lagsantense* e *C. pterostictum*. Ao analisar a espécie *Characidium cf. fasciatum*, Maistro *et al.* (1998) descreveram a ocorrência de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW. Depois, este sistema foi também descrito em outras espécies do gênero, como em *C. gomesi* (Centofante *et al.*, 2001), *C. cf. alipioi* (Centofante *et al.*, 2003) e *C. cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008). A presença de cromossomos sexuais também foi descrita por Pansonato-Alves *et al.* (2010) em *C. schubarti*, *Characidium sp.*, *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lanei* e *C. lauroi*.

Os estudos citogenéticos em *Characidium* estão atualmente restritos a 10 espécies (Miyazawa; Galetti, 1994; Maistro *et al.*, 1998, 2004; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a). Considerando-se o fato de que existem 52 espécies neste gênero, tais estudos podem ser considerados escassos. As espécies analisadas apresentam conservada macroestruturas do cariótipo com um número diplóide constante de 50 cromossomos, predominantemente dos tipos metacêntricos e submetacêntricos (Maistro *et al.*, 1998, 2004; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a; Machado *et al.*, 2011).

Os cromossomos sexuais ZZ/ZW foram observados na maioria das espécies analisadas até o momento, exceto *C. cf. zebra* e *C. cf. lagsantense*. As amostras analisadas de *Characidium* apresentaram possíveis cromossomos sexuais

homeologous em algumas espécies. Este grupo mostrou ser um modelo importante para o estudo da evolução de cromossomos sexuais, devido à presença ou ausência de cromossomos sexuais em espécies filogeneticamente relacionadas (Machado *et al.*, 2011).

A Micro-FISH (Microdissecção, DOP-PCR e hibridização *in situ*) tem sido utilizada com sucesso em vertebrados, principalmente para identificar os rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Taguchi *et al.*, 2003; Neusser *et al.*, 2005; Nieves *et al.*, 2005), cervídeos (Li *et al.*, 2005) e roedores (Fagundes *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2004). Microdissecção cromossômica é um método direto para analisar a composição molecular de cromossomos ligados ao sexo e as informações obtidas com a aplicação desta técnica têm sido importantes para a compreensão dos processos envolvidos na diferenciação de cromossomos sexuais. Sondas obtidas de cromossomos sexuais microdissecados de algumas espécies de salmonídeos (Reed *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 2001); do ciclídeo *Oreochromis niloticus* (Harvey *et al.*, 2002.) e de peixes Neotropicais dos gêneros *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008a), *Triportheus* (Diniz *et al.*, 2008b), *Characidium* (Machado *et al.*, 2011), *Apareidon* e *Parodon* (Schemberger *et al.*, 2012) levaram a inferências importantes sobre a origem e evolução dos cromossomos sexuais nos componentes deste grupos.

No presente estudo, foi utilizada a técnica de Micro-FISH para entender melhor a composição, estrutura e mecanismos envolvidos na origem e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Characidium*, representante da subfamília Characidiinae e em *Crenuchus*, um representante da subfamília Crenuchinae. Obteve-se uma sonda específica para o cromossoma W de *C. cf. fasciatum* por microdissecção cromossômica e DOP-PCR. Usando a técnica de FISH, a sonda foi aplicada a preparações cromossômicas de indivíduos portadores de diferentes formas de cromossomos W, *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp. e em espécies sem cromossomos sexuais, *C. cf. zebra*, *C. cf. lagosantense* e *Crenuchus spilurus*, para identificar as semelhanças na estrutura e composição dos cromossomos sexuais. As espécies estudadas diferiram em relação à presença ou ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados e com o grau de diferenciação dos cromossomos sexuais. Os resultados indicaram a

existência de transformações evolutivas nos cromossomos sexuais heteromórficos que foram analisados.

Materiais e Métodos

Cinco espécies de peixes do gênero *Characidium* e a espécie *Crenuchus spilurus* provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Sudeste, Centro-Oeste e Norte do Brasil foram analisadas (Tabela 1). Os espécimes analisados foram inicialmente fixados em formol a 10% e depois conservados em etanol a 70%. Após a identificação, eles foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia Genética de Peixes (LBP-11443; 9607; 9606; 11442; 11444; 9424).

Tabela 1. Locais de amostragem das espécies dos gêneros *Characidium* e *Crenuchus* analisadas. O número de indivíduos amostrados e o sexo são indicados na tabela abaixo.

Espécies	F	M	Local de amostragem	Coordenadas
<i>C. cf. fasciatum</i>	1	-	Tributário do Rio das Velhas-Rio São Francisco-Curvelo, Minas Gerais	19° 38' 18.50"S 44° 07' 17.60"W
<i>C. cf. gomesi</i>	9	5	Riacho Rio da Cachoeira, Alto Rio Paraná-Itumirim, Goiás	18° 34' 50.80"S 52° 05' 52.80"W
<i>Characidium</i> sp.	5	3	Rio Formoso, Alto Rio Paraná-Chapadão do Céu, Goiás	18° 16' 17.00"S 52° 50' 34.40"W
<i>C. cf. zebra</i>	2	1	Ribeirão Claro, rio Tietê-Rio Claro, São Paulo	22° 22' 42.99"S 47° 32' 04.08"W
<i>C. cf. lagsantense</i>	7	9	Riacho Amendoim, Rio das Velhas-São Francisco-Curvelo, Minas Gerais	18° 43' 14.60"S 44° 20' 47.30"W
<i>Crenuchus spilurus</i>	5	12	Riacho Cajueirinho, rio Caeté-Tracuateua, Pará	01° 05' 07.80"S 46° 51' 44.30"W

F = fêmea e M = macho

As preparações de cromossomos mitóticos *in vivo* foram obtidas utilizando a técnica descrita em Foresti *et al.* (1981), a partir de fragmentos de tecido renal e brânquias, sendo que os animais sacrificados foram previamente anestesiados com benzocaína. Os cromossomos metafásicos foram analisados em um fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas com software Image Pro

Plus 6.0 (MediaCybernetics). O bandeamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas adaptações.

Microdissecção cromossômica, DOP-PCR e confecção da sonda.

Para microdissecção dos cromossomos nestas espécies, aplicou-se o seguinte protocolo: uma alíquota da suspensão celular foi diluída metanol e ácido acético na proporção de 3:1. A suspensão foi gotejada sobre lamínulas, foi realizado um bandamento C suave para identificar o cromossomo W. O material foi seco ao ar e coradas durante 10 minutos com 5% de solução de Giemsa em tampão fosfato (0,06M de KH_2PO_4 e 0,449M de Na_2HPO_4 , pH 6,8), lavadas com água destilada e secas ao ar. A lamínula foi em seguida colocada sob um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss) e a microdissecção dos cromossomos foi realizada utilizando-se capilares de vidro de 70mm de diâmetro, que foram ligados a um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Todo o equipamento foi exposto à luz UV antes da utilização.

Os cromossomos W microdissecados foram depositados em tubos de PCR. A amplificação do material microdissecado foi otimizada num termociclador (PTC-100TM; MJ Research, Inc.) seguindo o protocolo descrito por Muhlmann-Diaz *et al.* (2001): 5 μl de água foram adicionados ao material recolhido e aquecido durante 10 min a 95°C. Em seguida, em 20 μl de mistura de PCR foi adicionado (tampão 2X = 100mM KCl, 20mM Tris-HCl, 0,2% de Triton-100X, MgCl_2 3mM, 500 μM de cada dNTP, 2,5 μM de *primer* (DOP - 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') e 2 unidades de Taq polimerase). O programa de PCR consistiu em 10 ciclos de baixa estringência (94 °C durante 1,5 min, 37 °C durante 3 min, e 72 °C durante 4 minutos), seguido de 30 ciclos de elevado rigor (94 °C durante 1,5 min, 56 °C durante 1 min e 72 °C durante 1,5 min). Os produtos foram verificados em um gel de agarose a 1%. 3 μl do produto da PCR inicial foram utilizados para realizar uma nova reação de amplificação em um volume final de 50 μl (1X tampão de Taq polimerase - 2mM MgCl_2 , 200 μM de dNTP, 3 μl de *primer* (10 μM) (DOP 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG- 3') e 2 unidades de Taq polimerase), de acordo com as condições seguintes: um ciclo inicial de 90 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 90 °C durante 1,5 min, 56 °C durante 1,5 min, e 72 °C por 1,5 min, e uma

etapa final a 72 °C durante 7 minutos. O produto de PCR foi verificado num gel de agarose a 1%.

Outro PCR foi realizado para aumentar a quantidade de DNA e uma subsequente PCR de marcação foi realizada utilizando digoxigenina (digoxigenina 11-dUTP, Roche). Através deste processo de amplificação de DNA, uma sonda do cromossomo W foi obtida. A sonda DCf (DOP-PCR *Characidium cf. fasciatum*) foi preparada a partir dos cromossomos W de *C. cf. fasciatum* (Figuras 1a, 2a) coletado na bacia do Rio das Velhas, um dos afluentes do rio São Francisco no município de Curvelo/MG. O controle negativo foi realizado em todos os passos da produção de sonda, que mostrou fragmentos de 100 a 550pb de tamanho.

A técnica de FISH utilizando a sonda DCf, foi realizada seguindo o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986). A sonda foi produzida por PCR e marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche), de acordo com as instruções do fabricante e 700ng de sonda foram adicionados na solução de hibridação (50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2 X SSC, a 37°C por 18 h) por lâmina. A detecção de sinais de hibridação foi realizada usando o anticorpo FITC-conjugado anti-digoxigenina (Roche). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI e embebidos em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories).

Resultados

A análise citogenética revelou que as espécies do gênero *Characidium* possuem um número diplóide de 50 cromossomos, enquanto *Crenuchus spilurus* possui 38 cromossomos. Nas espécies *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. foi observada a ocorrência de polimorfismo cromossômico ligado ao sexo do tipo ZZ/ZW, sendo que o cromossomo W apresentou tamanho menor que o cromossomo Z. A hibridação *in situ* com a sonda de DCf (Figura 1) e o bandamento C (Figura 2) mostraram que o cromossomo W foi inteiramente marcado em *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp.; adicionalmente, todas as três espécies mostraram sinais fluorescentes pericentroméricos no cromossomo Z. No entanto, em indivíduos das espécies *C. cf. zebra*, *C. cf. lagosantense* e *C. spilurus*, polimorfismos cromossômicos ligados ao sexo não foram observados e a FISH com a sonda DCf não mostrou hibridização com qualquer cromossomo nestas três espécies.

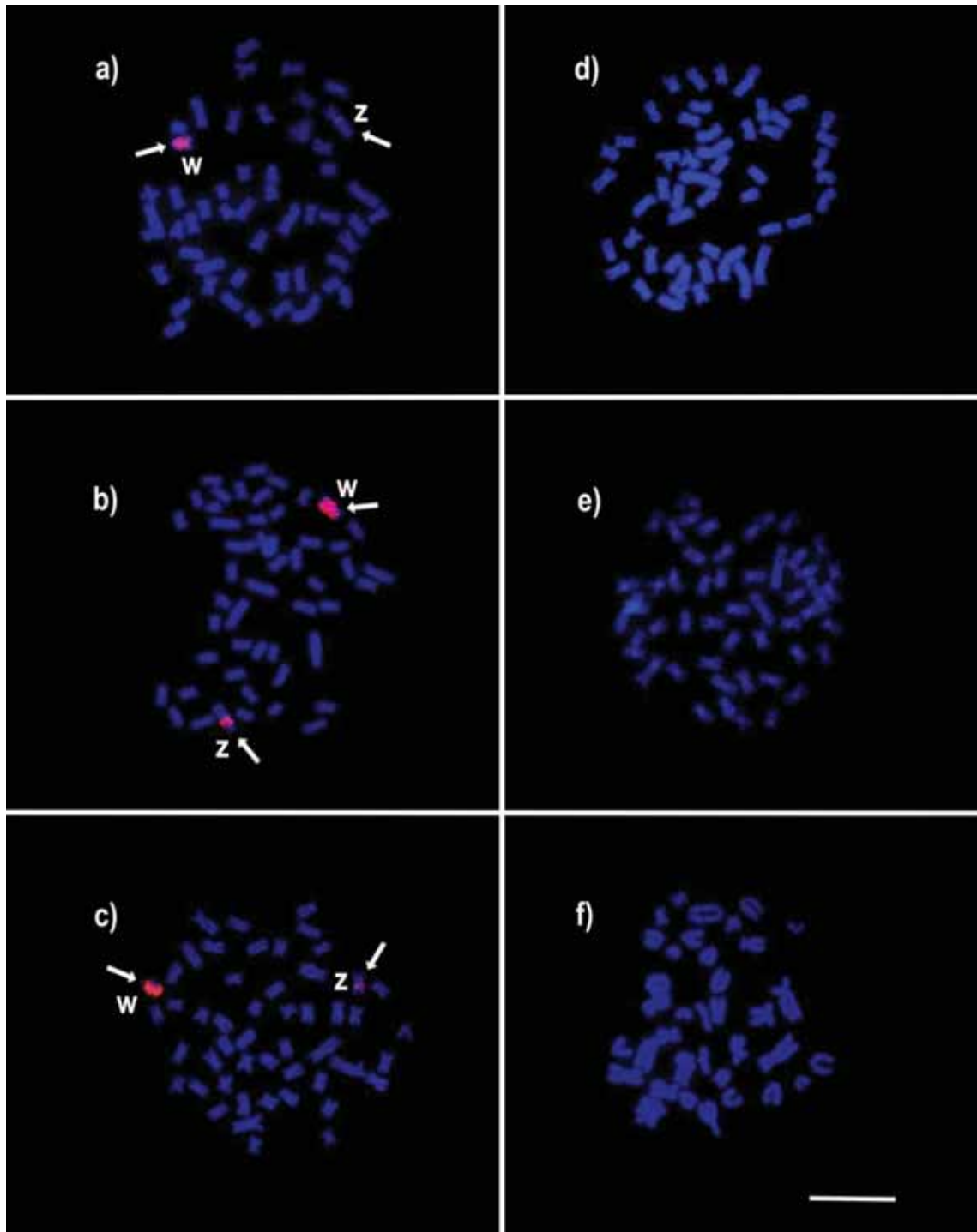


Figura 1. Metáfase somática de espécime fêmea de a) *C. cf. fasciatum*, b) *C. cf. gomesi*, c) *Characidium* sp., d) *C. cf. zebra*, e) *C. cf. lagsantense* e f) *Crenuchus spilurus* após hibridação *in situ* com a sonda DCf. Notar os cromossomos Z e W. A barra corresponde a 10 micrometros.

O bandamento C revelou um padrão de coloração diferencial em *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp., principalmente em relação aos blocos conspícuos encontradas na heterocromatina centromérica do cromossomo Z e nas

regiões terminais, enquanto os cromossomos W mostraram-se totalmente heterocromáticos. Este padrão de coloração não foi encontrado em *C. cf. zebra*, *C. cf. lagosantense* e *Crenuchus spilurus* (Figura 2); nestas espécies a heterocromatina está principalmente localizada na região centromérica.

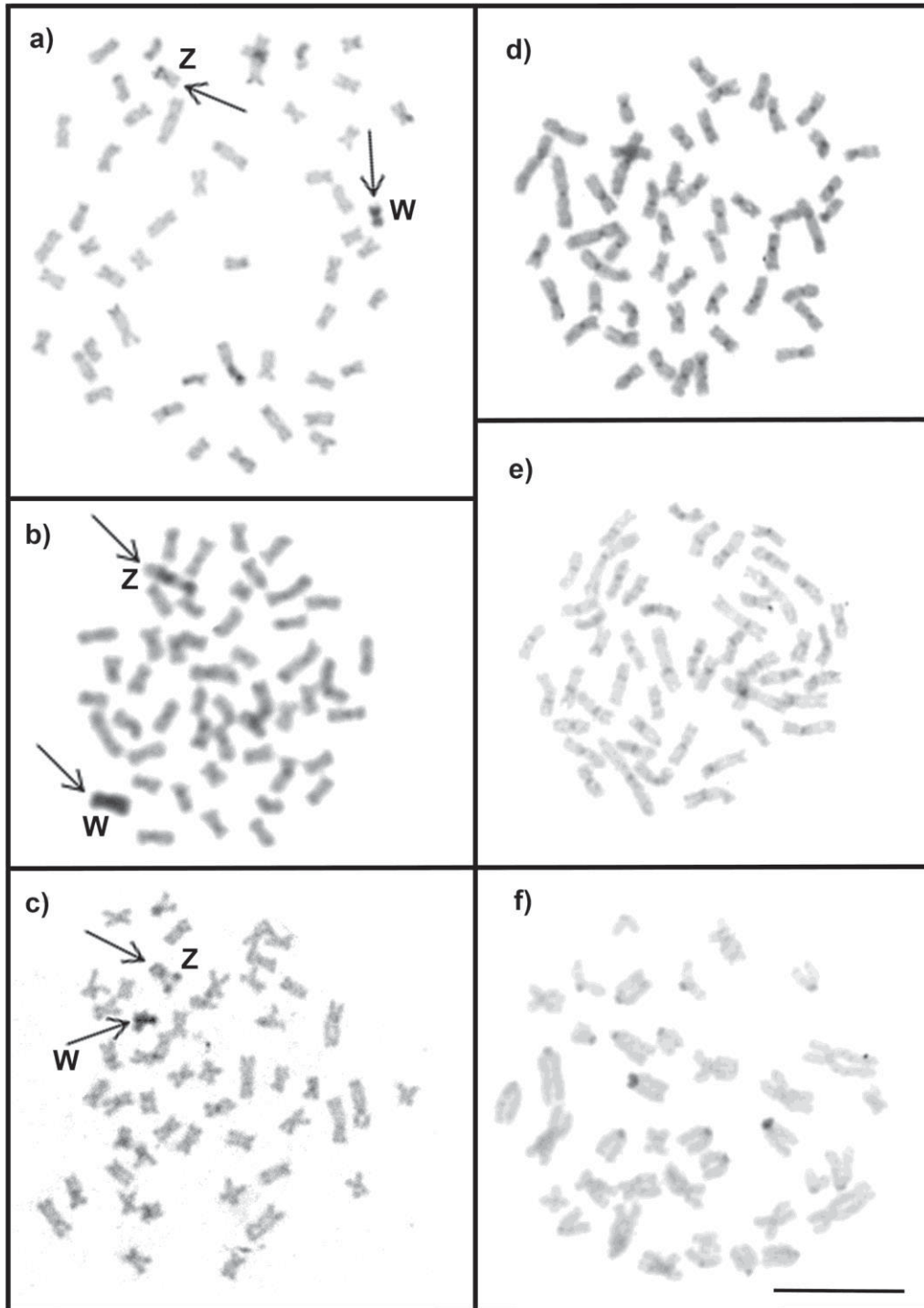


Figura 2. Metáfase somática de espécime fêmea de a) *C. cf. fasciatum*, b) *C. cf. gomesi*, c) *Characidium* sp., d) *C. cf. zebra*, e) *C. cf. lagosantense* and f) *Crenuchus spilurus* após bandamento C. Notar os cromossomos Z e W. A barra corresponde a 10 micrometros.

Discussão

O gênero *Characidium* apresenta um cariótipo estável com $2n = 50$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos na maioria das espécies já analisadas (Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010). Entre estas espécies, bem como aquelas utilizadas no presente estudo, apenas *C. cf. zebra* e *C. cf. lagsantense* não mostram polimorfismo cromossômico associado ao sexo. Espécimes de *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp. e um espécime fêmea de *C. cf. fasciatum* aqui examinados apresentaram os cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW.

A hibridação *in situ* realizada com a sonda DCf que revelou o padrão esperado de associação: hibridação completa da sonda sobre o cromossomo W e hibridação da região pericentromérica do cromossomo Z. Isto indicaria uma homologia parcial entre o W e Z cromossomos. O fato de que a sonda apresentou o mesmo padrão de hibridação em espécies diferentes é uma evidência de que os cromossomos W e Z destas espécies são homeólogos. A mesma sonda, quando testada em *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* e em cromossomos de *Crenuchus spilurus*, não mostrou sinais de hibridação. Uma conclusão possível a partir destes resultados é que o sistema de cromossomos sexuais foi originado na forma ancestral do grupo ao qual a espécie *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. pertencem e sofreu várias alterações durante o processo de diferenciação. A heterocromatinização destes cromossomos provavelmente começou nas formas cromossômicas homólogas e homomórficas do grupo ancestral das espécies que hoje possuem cromossomos sexuais (Figura 3), sendo que o processo de heterocromatinização deve ter ocorrido depois da especiação que separou os ancestrais do grupo *C. cf. zebra* (*C. cf. zebra* e *C. cf. lagsantense*) do grupo *C. cf. gomesi* (*C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp.). Esta constatação é reforçada pelo fato de que a sonda DCf não hibridiza com os cromossomos das três espécies, *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* e *C. spilurus*.

A maioria dos casos de heteromorfismos dos cromossomos sexuais descritos em peixes está relacionada com o tamanho, a morfologia ou presença diferencial de heterocromatina (Cioffi *et al.*, 2012a). Em algumas espécies de peixes, os cromossomos sexuais podem ser distinguidos por diferentes padrões de

heterocromatina, como já foi observado em algumas espécies de *Characidium*. Mais recentemente, novas abordagens têm sido utilizadas para identificar cromossomos sexuais heteromórficos em peixes, tais como pintura de cromossomos específicos, mapeamento de sequências de DNA repetitivas e genes relacionados com a diferenciação sexual, o que tem sido realizado em Salmonidae (Devlin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), Gasterosteidae (Ross *et al.*, 2009), *Orzyas latipes* (Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda, 2005; Takehana *et al.*, 2012) e *Danio rerio* (Liew *et al.*, 2012). No caso de *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium sp.*, os cromossomos sexuais foram detectados com o uso de técnicas convencionais (bandas C) e confirmados por hibridação *in situ* fluorescente com a sonda de DCf em um único par de cromossomos.

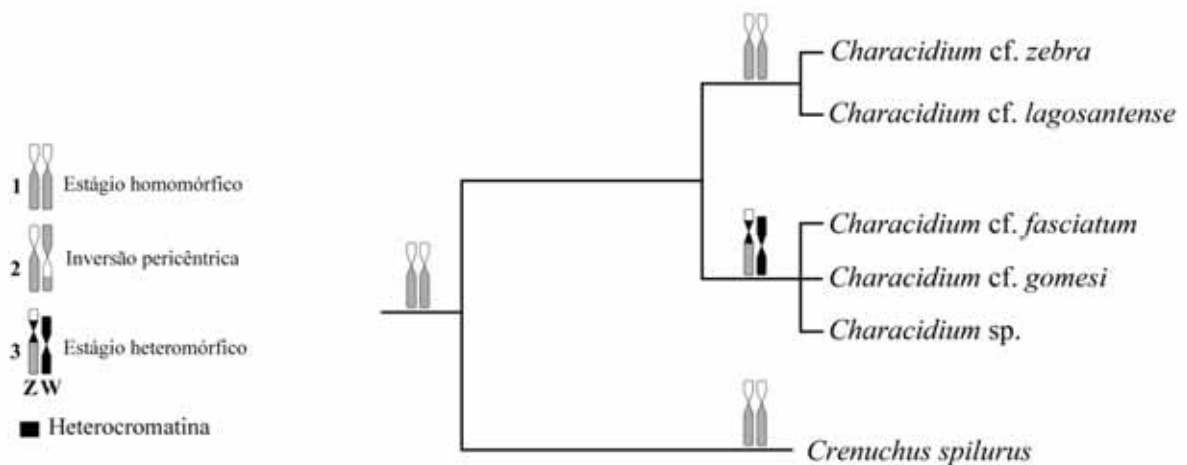


Figura 3. Possível processo de origem dos cromossomos sexuais e cladograma envolvendo as espécies de *Characidium* analisadas no presente estudo. 1 par ancestral de cromossomos homomórficos; 2 ocorrência de inversão pericêntrica em um dos homólogos; 3 heterocromatinização diferencial dos cromossomos do par heteromórfico, erosão gênica e diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W.

O acúmulo diferencial de elementos repetitivos em um par de cromossomos, como observado em *Chionodraco hamatus* que apresenta elementos repetitivos no cromossomo Y (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004), é uma forte evidência para a presença de cromossomos sexuais. Isto também foi observado nos cromossomos dos gêneros *Hoplias* (Cioffi *et al.*, 2012), *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008a, b), *Leporinus* (Galetti ; Foresti 1986; Koehler *et al.*, 1997; Parisi-Maltempa *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012), *Parodon* (Vicente *et al.*, 2003; Schemberger *et al.*, 2012), *Triportheus*

(Artoni; Bertollo 2002; Diniz *et al.*, 2008a, b) e Poeciliidae (Nanda *et al.*, 1993, 2000), assim como em representantes da ordem Anura (Nascimento *et al.*, 2010) e no cromossomo Y da classe Mammalia (incluindo *Homo sapiens*) (Skaletsky *et al.*, 2003). Propõe-se que durante a diferenciação e evolução de cromossomos sexuais, várias alterações genéticas contribuem para a diferenciação dos cromossomos X e Y ou Z e W, uma das quais é o aparecimento de regiões que são ricas em DNA repetitivo (Ohno, 1967; Volff *et al.*, 2007; Cioffi *et al.*, 2012a). No estudo atual, o acúmulo diferencial de segmentos de DNA repetitivo (heterocromatina) foi observado em *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. e permitiu uma clara distinção entre os dois cromossomos do par sexual e os autossomos, como observado em outras espécies do gênero.

A partir de observações sobre a evolução de diferentes cromossomos sexuais, foi levantada a hipótese de que os cromossomos sexuais seriam derivados de um par de autossomos (Ohno, 1967; Volff *et al.*, 2007). Neste caso, um dos passos iniciais na evolução de cromossomos sexuais é o surgimento de um novo *locus* único em um autossomo. A heterozigose neste *locus* levaria ao desenvolvimento de um sexo em homozigose para o outro sexo, estabelecendo assim um sistema de proto-cromossomos sexuais (Graves, 2006; Takehana *et al.*, 2007; Volff *et al.*, 2007). Portanto, nesta fase de evolução, os dois cromossomos sexuais seriam homomórficos, ou seja, morfologicamente idênticos. Por outro lado, supõe-se que cromossomos sexuais heteromórficos surjam por um processo de supressão da recombinação de genes de determinação do sexo. Isto manteria a região não recombinante num estado constante de heterozigose, que conduziria a numerosas deleções de genes funcionais e no acúmulo de sequências repetitivas em um cromossomo sexual específico (Y ou W) (Charlesworth *et al.*, 2005). Este processo de degeneração se espalharia a partir de uma região específica do cromossomo sexual (Y ou W) para, eventualmente, cobrir quase todo o cromossomo e genes específicos benéficos àquele sexo. Assim, genes ligados à espermatogênese, acumular-se-iam num cromossomo específico, tal como observado no cromossomo Y humano (Skaletsky *et al.*, 2003; Graves, 2006).

A provável condição ancestral, sem cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, parece estar presente em *C. cf. zebra* (Machado *et al.*, 2011) e *C. cf. lagsantense*. A ocorrência de uma inversão em cromossomos Z

ou W foi observada por Pansonato-Alves *et al.* (2010) utilizando Ag-NORs em *C. schubarti*, *Characidium* sp., *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lanei* e *C. lauroi*. Machado *et al.* (2011) também sugeriram que a ocorrência de uma inversão pericêntrica nas etapas iniciais da diferenciação dos cromossomos sexuais nas espécies de *Characidium* limitaria a recombinação entre os cromossomos Z e W durante a meiose. Isto pode ter permitido a acumulação subsequente de heterocromatina e de sequências repetitivas e, conseqüentemente, a degeneração desta região cromossômica não recombinante do cromossomo W. Este processo poderia ser associado com a diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W de *Characidium*, os quais evoluíram para uma fase de identificabilidade citogenética (condição observada em *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp. e em outras espécies/populações de *Characidium* estudados). Do mesmo modo, esta situação é observada em mamíferos e aves, onde os cromossomos Y/W se apresentam altamente diferenciados e são menores do que os cromossomos X ou Z (Matsubara *et al.*, 2006; Takehana *et al.*, 2007).

De acordo com Vicari *et al.*, (2008), Noletto *et al.*, (2009), Pansonato-Alves *et al.* (2010, 2011a) e Machado *et al.* (2011), o gênero *Characidium* apresenta um sistema de cromossomos sexuais com uma única origem. Este modelo de origem única também é proposto ocorrer nos gêneros *Triporthus* (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008a, b) e *Leporinus* (Galetti; Foresti, 1986; Koehler *et al.*, 1997; Marreta *et al.*, 2012) e em algumas espécies de Parodontidae (gêneros *Apareiodon* e *Parodon*) (Schemberger *et al.*, 2012). Tal observação difere dos achados em outros grupos de peixes, como *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008b), *Oryzias* (Takehana *et al.*, 2007, 2012.), *Xiphophorus* (Nanda *et al.*, 2000; Volff; Scharl, 2001) e espécies da família Gasterosteidae (Ross *et al.*, 2009), que apresentam cromossomos sexuais possivelmente oriundos de múltiplas fontes. A maioria das espécies cariotipadas do gênero *Characidium* apresentam um sistema heterogamético feminino e a ausência de cromossomos sexuais indiferenciadas pode ser considerada uma característica plesiomórfica (Vicari *et al.*, 2008), como ocorre em *C. cf. zebra*, que pertence a um grupo considerado morfológicamente basal no gênero *Characidium* (Buckup, 1993). A ausência de cromossomos sexuais em *Crenuchus spilurus* reforça a hipótese de que os cromossomos sexuais apareceram em algumas espécies do gênero *Characidium*.

Espécimes de *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. estudadas após bandamento C, apresentam um segmento de heterocromatina terminal na região Zq. Uma maior quantidade de heterocromatina foi observada na região pericentromérica dos cromossomos Z em espécimes *C. cf. gomesi* em comparação com o mesmo segmento dos cromossomos Z em espécimes de *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. Tais observações reforçam o fato de que esta região pode ter sido originada por uma duplicação do segmento ou por rearranjos intra ou intercromossômicos.

Entre as espécies já estudadas de *Characidium*, a ocorrência de dois sistemas diferentes de determinação do sexo (determinação do sexo controlado por cromossomos sexuais e sistemas com cromossomos sexuais morfologicamente indiferenciadas) sugere que a diferenciação dos cromossomos sexuais poderia ser um evento recente na evolução do grupo, como observado em outros grupos de peixes Neotropicais tais como a família Anostomidae e a subfamília Hypoptopomatinae (Oliveira *et al.*, 2009). Também sugere que os cromossomos heteromórficos Z e W de *Characidium* seriam homoplásticos em relação aos cromossomos Z e W encontrados em outros gêneros de peixes. A natureza homoplástica está relacionada a eventos recorrentes de diferenciação dos cromossomos sexuais em peixes, tem sido reconhecido por diversos autores (Takehana *et al.*, 2007; Volff *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009) e se apresenta como uma condição interessante, que também é observada em anuros (Nascimento *et al.*, 2010) e répteis (Ezaz *et al.*, 2009; Kawagoshi *et al.*, 2012). Tal evidência parece contrastar com a condição heteromórfica observada em aves (ZZ/ZW) e mamíferos (XX/XY), onde os sistemas que têm cromossomos sexuais são aparentemente bem estabelecidos (Ezaz *et al.*, 2006; Graves, 2006; Volff *et al.*, 2007).

Em resumo, o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW é uma característica comum para as espécies *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. E a maioria das espécies e populações de *Characidium* que foram analisadas possui um sistema ZZ/ZW diferenciado. A ocorrência de cromossomos Z/W deste grupo pode corresponder a uma condição sinapomórfica para algumas espécies. Assim, estudos citogenéticos adicionais e estudos filogenéticos moleculares de relacionamento entre as espécies de *Characidium* devem ser realizados para proporcionar um melhor

entendimento do processo de evolução cromossômica ocorrido neste grupo de peixes.

4.2 - Capítulo 2

**Caracterização de sequências presentes no cromossomo W de
Characidium cf. gomesi (Characiformes, Crenuchidae)**

Resumo

No presente estudo foram isolados e sequenciados sete fragmentos de DNA presentes em uma sonda W específica (DCg), que foram denominados CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW9, CgW13 e CgW34, com o intuito de melhor entender a composição, estrutura e os mecanismos envolvidos na origem e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Characidium*, uma vez que os mecanismos moleculares que norteiam a origem e a evolução dos elementos que compõem esses cromossomos são pouco conhecidos. A diferenciação desses cromossomos está associada a processos de heterocromatinização diferencial que levariam a uma possível supressão da recombinação entre os cromossomos do par sexual. Nesse trabalho constatou-se que a sequência CgW4 está presente nos cromossomos Z e W dos indivíduos analisados na população de *C. cf. gomesi* do córrego Alambari, enquanto que nos indivíduos da população do Córrego Águas da Magdalena, a sequência se encontra presente tanto nos cromossomos Z e W, como nos cromossomos B. Estes resultados sugerem que os cromossomos Z e W compartilham sequências e que os cromossomos B presentes nos indivíduos analisados têm sua origem a partir de fragmentos dos cromossomos sexuais ou, por outro lado, os cromossomos sexuais e os B podem ter origem comum.

Introdução

Alguns grupos de vertebrados possuem cromossomos sexuais, sendo que os mamíferos exibem heterogametia masculina (♂ XY e ♀ XX), enquanto aves, cobras e algumas espécies de anfíbios apresentam heterogametia feminina (♂ ZZ e ♀ ZW) (Yoshimoto *et al.*, 2008, 2010). Em peixes também se observa uma grande variação de sistemas de determinação sexual, ocorrendo heterogametia feminina em alguns grupos, como entre representantes dos gêneros *Characidium* e *Parodon* (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Vicente *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2008; Pansonato-Alves *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011); heterogametia masculina, como o observado em *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2012a) e *Oryzias*, *Eigenmannia* e *Hypostomus*, que podem apresentar tanto heterogametia masculina quanto feminina em diferentes espécies do mesmo gênero (Matsuda *et al.*, 2002; Takehana *et al.*, 2005, 2012; Cioffi *et al.*, 2012a). Há ainda espécies que apresentam sistemas de determinação cromossômica de sexo complexos, com cromossomos sexuais múltiplos, podendo ser relacionadas *Leporinus elongatus* (Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012), *Ancistrus* (de Oliveira *et al.*, 2008), *Harttia carvalhoi* (Cioffi *et al.*, 2012a), entre outras. De forma geral, os cromossomos sexuais apresentam algumas similaridades, sendo que os cromossomos X e Z possuem regiões eucromáticas, enquanto os cromossomos Y e W são geralmente heterocromáticos. O acúmulo de heterocromatina e a possível perda de genes dos cromossomos Y e W são consideradas propriedades convergentes no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais (Takehana *et al.*, 2012).

Segundo Ohno (1967) os cromossomos sexuais originam-se de um par cromossômico autossômico e um dos primeiros passos para a diferenciação é o surgimento de um novo *locus* de determinação do sexo. Nesta fase da evolução ambos os cromossomos sexuais apresentam morfologia semelhante, sendo considerados homomórficos. Os cromossomos sexuais heteromórficos aparentemente surgiram em decorrência da supressão de recombinação meiótica em torno do *locus* de determinação sexual, mantendo essa região não recombinante em estado heterozigoto, que levam a possíveis exclusões de genes funcionais e acúmulo de sequências repetitivas, geralmente heterocromatina, em um dos sexos, que ocorre nos cromossomos Y ou W (Charlesworth *et al.*, 2005), num processo se

espalha ao longo de quase todo o cromossomo. No entanto, como os estudos geralmente concentram-se em cromossomos sexuais altamente diferenciados, como ocorre em mamíferos, aves e em algumas espécies de répteis, anfíbios e peixes, o início do processo da diferenciação dos cromossomos sexuais ainda permanece pouco conhecido (Takehana *et al.*, 2012).

Os peixes teleósteos qualificam-se como um bom modelo para estudos dos cromossomos sexuais, uma vez que apresentam grande diversidade de sistemas de determinação sexual, incluindo também espécies apresentando cromossomos sexuais pouco diferenciados (Volff *et al.*, 2007). O gênero *Characidium* apresenta espécies que possuem cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZW e espécies que apresentam cromossomos homomórficos, sem diferenciação observável pela utilização de técnicas citogenéticas de rotina. Na espécie *Characidium cf. gomesi* são observados cromossomos sexuais dos tipos Z e W (Vicari *et al.*, 2008; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a; Machado *et al.*, 2011), na qual o cromossomo W apresenta-se heterocromático, enquanto no cromossomo Z apenas a região pericentromérica é marcadamente heterocromática, o que os torna facilmente diferenciados dos cromossomos autossômicos nesta espécie.

Regiões de heterocromatina são ricas em DNA repetitivo (Oliveira; Wrigth, 1998; Yamada *et al.*, 2005). Estudos envolvendo a identificação de sequências repetitivas sexo-específicas em peixes foram realizados por Nakayama *et al.* (1994), que isolaram dois fragmentos de DNA satélite sexo-específico na espécie *Leporinus elongatus*, sendo que um deles hibridou apenas no cromossomo W presente em fêmeas desta espécie. Parise-Maltempi *et al.* (2007) isolaram, através de digestão enzimática do DNA, um elemento repetitivo (Le Spe I) associado aos cromossomos sexuais também de *Leporinus elongatus*. Com o auxílio da técnica de hibridação *in situ*, os autores propuseram um novo sistema de cromossomos sexuais para a espécie, que foi identificado como um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$. Takehana *et al.* (2012) isolaram a família de DNA repetitivo BstNI do genoma de *Oryzias hubbsi*; contudo, nesta espécie as regiões isoladas aparentemente não possuem função conhecida, semelhante à maioria das sequências de DNA repetitivo descritas, presentes em cromossomos sexuais.

No presente estudo, para tentar conhecer melhor a composição, estrutura e os mecanismos envolvidos na origem e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Characidium*, foram isoladas sete sequências de DNA originárias do cromossomo W de *C. cf. gomesi*, identificadas como (CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW9, CgW13 e CgW34). Realizou-se a caracterização molecular de todas as sete sequências obtidas e, após hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a sequência CgW4 apresentou-se distribuída por todo o cromossomo W e na região pericentromérica do cromossomo Z desta espécie e nos cromossomos sexuais e supranumerários de *Characidium cf. gomesi*, coletados no córrego Águas da Magdalena, na região de Botucatu, SP, Brasil.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares de *Characidium cf. gomesi*, coletados no córrego Alambari, Bacia do Rio Tietê, município de Botucatu/SP (22° 56' 08"S 48° 19' 15"W), riacho Águas da Magdalena, tributário do Rio Paranapanema, localizados no município de Botucatu-SP (22° 59' 26,28"S 48° 25' 37,68"W) e no Córrego da Cachoeira, Bacia do Alto Paraná, município de Itumirim/GO (18° 34' 50,80"S 52° 05' 52,80"W); de *Characidium cf. fasciatum*, coletados em componentes da bacia hidrográfica do Rio das Velhas (Rio São Francisco), município de Curvelo/MG (19° 38' 18,50"S 44° 07' 17,60"W) e de *Characidium sp.*, coletados no Rio Formoso, Bacia do Alto Paraná, município de Chapadão do Céu/GO (18° 16' 17,00"S 52° 50' 34,40"W) (Tabela 1). Os espécimes analisados foram inicialmente fixados em formalina a 10% e depois conservados em etanol 70% para identificação, sendo posteriormente depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Antes de serem sacrificados, os exemplares analisados foram anestesiados com benzocaína. As preparações dos cromossomos mitóticos foram obtidas de células renais segundo o protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1981). O bandamento C foi realizado segundo procedimento proposto por Sumner (1972), com algumas adaptações.

Tabela 1. Local de amostragem das espécies do gênero *Characidium* analisadas. O número de indivíduos amostrados e o sexo são indicados na tabela abaixo. F = fêmea; M = macho.

Espécies	F	M	Local de amostragem	Coordenadas
	♀	♂		
<i>C. cf. fasciatum</i>	1	-	Tributário do Rio das Velhas-Rio São Francisco-Curvelo, Minas Gerais	19° 38' 18.50"S 44° 07' 17.60"W
<i>C. cf. gomesi</i>	9	5	Riacho Rio da Cachoeira, Alto Rio Paraná-Itumirim, Goiás	18° 34' 50.80"S 52° 05' 52.80"W
<i>Characidium</i> sp.	5	3	Rio Formoso, Alto Rio Paraná-Chapadão do Céu, Goiás	18° 16' 17.00"S 52° 50' 34.40"W
<i>C. cf. gomesi</i>	3	-	Córrego Águas da Magdalena, Rio Paranapanema-Botucatu, São Paulo	22° 59' 26,28"S 48° 25' 37,68"W
<i>C. cf. gomesi</i>	4	1	Córrego Alambari, Rio Tietê-Botucatu, São Paulo	22° 56' 08,00"S 48° 19' 15,00"W

Microdissecção cromossômica, DOP-PCR e confecção da sonda DCg

A técnica de microdissecção cromossômica foi aplicada seguindo o seguinte protocolo: diluir uma alíquota da suspensão celular da preparação cromossômica final mantida em metanol: ácido acético na proporção 3:1, respectivamente e gotejar a suspensão sobre lamínulas grandes. Para identificar os cromossomos W, pode-se realizar um bandamento C leve, utilizando soluções diluídas ou tempo menor de tratamento. Secar o material ao ar e corar com solução de Giemsa diluída a 5% em Tampão Fosfato (KH_2PO_4 0,06M e Na_2HPO_4 0,449M, pH 6.8) por 10 minutos. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar naturalmente. Colocar a lamínula contendo a preparação celular em um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss) e realizar a microdissecção dos cromossomos utilizando microagulhas produzidas de capilares de vidro de cerca de 70 μm de diâmetro, ajustadas a um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Os equipamentos foram expostos a luz UV antes de sua utilização.

Os cromossomos W microdissecados foram depositados em um tubo de PCR para posterior amplificação, que foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Muhlmann-Diaz *et al.* (2001), otimizado o procedimento em um termociclador

PTC-100TM (MJ Research, Inc.). Seguiu-se o seguinte procedimento: adicionar 5 μ l de água no tubo Eppendorf contendo o material coletado e aquecer por 10 min a 95 °C. Em seguida, adicionar 20 μ l da solução de reação de PCR (Tampão Taq polimerase; 2X = 100mM KCl; 20mM Tris-HCl; 0,2% Triton-100X; 3mM MgCl₂; 500 μ M de cada dNTP; 2,5 μ M de *primer* (DOP - *degenerated oligonucleotide primer* 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') e 2 unidades de Taq polimerase).

O programa de amplificação consistiu em 10 ciclos de PCR de baixa estringência (94 °C por 1,5 min, 37 °C por 3 min e 72 °C por 4 min), seguido por 30 ciclos de alta estringência (94 °C por 1,5 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min). Os produtos foram verificados em gel de agarose a 1%. Para tanto, 3 μ l do produto da primeira PCR foram aliquotados e uma nova reação de amplificação foi realizada, tendo por base um volume final de 50 μ l (tampão da Taq polimerase; 1X = 2mM MgCl₂; 200 μ M dNTP; 3 μ l do *primer* DOP 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' (10 μ M) e 2 unidades de Taq-polimerase, de acordo com as seguintes condições: um ciclo inicial de 90 °C por 5min, seguido de 30 ciclos (90 °C por 1,5 min, 56 °C e 72 °C por 1,5 min) e um ciclo a 72 °C por 7 minutos. O produto da PCR foi verificado em gel de agarose 1%. Controles negativos foram realizados em todas as etapas de amplificação do cromossomo W. O tamanho dos fragmentos foi de 100 a 550bp (Figura 1).

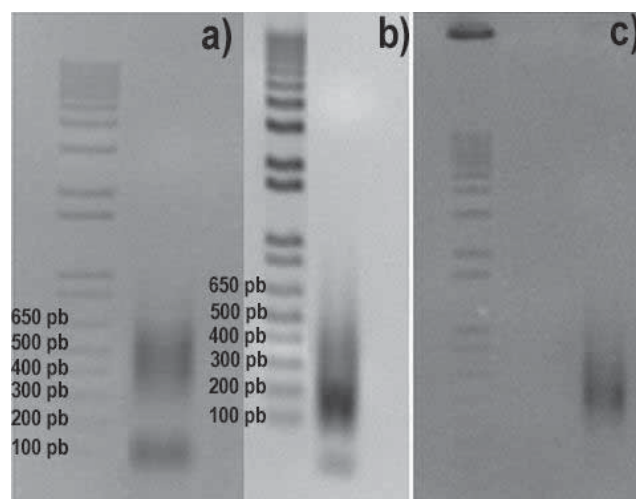


Figura 1. Gel de agarose a 1%: a) corresponde à primeira amplificação pelo processo de DOP-PCR. b) corresponde à PCR para aumentar a quantidade do material c) PCR de marcação com oligonucleotídeos biotinilados digoxigenina- 11-dUTP (Roche). Notar o arrasto, com fragmentos de tamanho desde aproximadamente 100pb até cerca de 550pb.

Outra PCR foi realizada para a marcação do DNA da sonda utilizando digoxigenina (digoxigenina 11-dUTP, Roche). A partir deste procedimento de amplificação de DNA, foi obtida uma sonda de cromossomo W desta espécie (Figura 1). A sonda DCg (DOP-PCR *Characidium cf. gomesi*) foi preparada a partir dos cromossomos W em um volume final de 50µl, de acordo com as seguintes condições: um ciclo inicial de 90 °C por 5min seguido de 30 ciclos (90 °C por 1,5 min, 56 °C e 72 °C por 1,5 min) e um ciclo a 72 °C por 7 minutos.

Elaboração da sonda CgW4

Foram realizadas amplificações do fragmento CgW4 via PCR utilizando-se os *primers* M13F (5' AGCGGATAACAATTTACACAGG 3') e M13R (5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'). Para cada amostra a ser amplificada, foi preparada uma reação (*mix*) contendo 0,5µl de Primer F (10µM); 0,5µl de Primer R (10µM); 1,0µl de dNTP (2mM) (dATP, dCTP, dTTP e dGTP); 0,2µl de Taq (5U/µl); 5µl de Tampão (10X); 1,5µl de MgCl₂ (50 mM); 1,0µl de DNA (cerca de 50ng de DNA); 40,3µl de H₂O; em um volume total de 50µl. O programa utilizado para a amplificação consistiu em uma etapa inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma etapa final de 7 minutos a 72°C. Para verificar a efetividade da reação e a amplificação de fragmentos dentro do tamanho esperado, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,0 %, corados com Blue Green Loading Dye I (LCG Biotecnologia) e visualizados em um transiluminador de UV.

A hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel *et al.* (1986). A sonda CgW4 foi obtida a partir da clonagem de fragmentos da sonda DCg que foi obtida de cromossomos W de um espécime fêmea de *C. cf. gomesi* por microdissecção e amplificação por DOP-PCR. As duas sondas foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science; www.roche.com) via reação da PCR (polymerase chain reaction), segundo especificações do fabricante. Em seguida, 700ng de sonda foi adicionado na solução de hibridização (50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano e 2 X SSC, a 37°C por 18h) em cada lâmina. Os sinais hibridização foram detectados utilizando-se anti-digoxigenina-rhodamina (Roche Applied Science) e contracorado com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) - VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI), seguindo-se

a análise em um fotomicroscópio óptico (Olympus, BX61; www.olympus.com). As metáfases foram fotografadas e editadas utilizando o software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics; www.mediacy.com).

Clonagem e sequenciamento do fragmento

Os fragmentos de DNA foram obtidos por amplificação via DOP-PCR e clonados utilizando-se o vetor pGEM® T Easy Vector System (Promega) e células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , segundo as especificações do fabricante. O inserto foi sequenciado utilizando-se o Kit “Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Inc.) em um sequenciador automático ABI 3130 DNA Analyzer (Perking-Elmer). Foram utilizados na PCR de sequenciamento os primers universais M13 (F 5' AGCGGATAACAATTTACACAGG 3' e R 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3').

Análise das sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram editadas com auxílio do programa computacional Bio Edit (Hall, 1999). Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas online BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e no Banco de dados GIRI, utilizando a ferramenta Repeat Masking (<http://www.girinst.org/censor/index.php>). Posteriormente, as sequências obtidas serão depositadas no GenBank.

Resultados

Foram isolados fragmentos da sonda DCg confeccionada a partir do cromossomo W de um exemplar da espécie *Characidium cf. gomesi* coletado no ribeirão Alambari - Botucatu/SP (Figura 2) e, utilizando-se do processo de clonagem foram obtidos 7 incertos, identificados como CgW1, CgW2, CgW4, CgW9, CgW10, CgW13 e CgW34 (Tabela 2).

As sequências obtidas apresentaram a predominância de bases A e T, com mínimo de 57% e máximo de 71% das mesmas (Tabela 2). Posteriormente, estas sequências foram submetidas a buscas *online* BLASTn através do National Center

for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), onde foi observado que estas não possuíam similaridade com nenhuma das sequências presentes nos bancos de dados do NCBI e Giri (Tabela 3). Posteriormente as sequências foram submetidas a buscas no banco de dados do programa GIRI, utilizando a ferramenta Repeat Masking (<http://www.girinst.org/censor/index.php>). Apenas a sequência CgW9 apresentou similaridade de 72,87% com o transposon Helitron; as demais sequências não apresentaram similaridade com sequências presentes também neste banco de dados. As sequências obtidas não apresentaram similaridade entre si. Posteriormente, as sequências serão depositadas no GenBank.

Tabela 2. Sequências de nucleotídeos obtidas de fragmentos da sonda DCg confeccionada a partir do cromossomo W de exemplar da espécie *Characidium cf. gomesi*.

CLONE_CgW_1

CCCGGATGTGGCATACTGGCAAGCCATGTTCTTAATTAATAATTCAGTTTTTACATAGT
CACAGCTGCGTTTTCAAATAGAACGAGAATCTACGTAACGGTAATTGTGCATCAAGAAAGCAGGA
ATACGTAGTGTACCAGTTGGTAAGCCTGTTACAGGATCAATATTTTCATAGTTGTAATCCACGAAC
CAGTTT

CLONE_CgW_2

GCTTTATGTGGGCTTGCTCTCGCTACTAGCCAGTAAACCATCTGCATTTGATAATAATGCCATTTA
TTTATTCAATGGCTATCAATACCCAAAACAAATAAATTATTTAGATCTTACAAAAGCCCCGCATCTA
TTAGTGGCAGGCCGCTCAAAGGAGACGATTACTAAAATGTTGCACACCTTAATGGTGAGTATCTT
AATGCA

CLONE_CgW_4

GTTCCATGTGGGAGATGTAAATGTGACTGTAGATTAACCTTTAGTAGTTCTTAGAAGCACTAACAT
AGACACAGCATAGATATACACATTGAAAAGTCTGTATGTGTTGGATGCCACATAATGTACTCGAGT
CGGA

CLONE_CgW_9

GCTTCATGTGGTTGCTACATCGTTGCTAAGTAGATGCTATATCGATGCTAAGTGGATGCTATATCA
TTGCTAAGTGGATGCTACATGGCTGCTACATCGTTGGTTAGTGGATGATACATGGTTGCTATGAG
GTTGCTTAGTGGATGCTATATTGTTGCTAAGTGGCTGCTACATCATTGCTAAGTGGATGCTACATG
GCTACTA

CLONE_CgW_10

GCATTATGTGGATTAATGAGCTGAAGTAGAGAATAAAAAGTTTAAAAAGAATAAAAAGAAATAGCTTT
GAAGTTAGTGAAGCATATATTCTTTAATCTAAATCATTTAATCTTTCCTATGAATAAAAATCTTAAT
ACATTATAATCGACCACATACAACGCTCGAGTCGG

CLONE_CgW_13

GAGACATGTGGGTAAGTAGATCTTCTATCAAGAAAATTTTTAATTTTTTACTGTATGTGAAGTTTT
AATTACGTTTTCTGCCTGTGTTTCTGCTGTTGCCACATTTGGAAGTCTCGAGTCG

CLONE_CgW_34

TTATCATGTGGATATTTAACATTTCTTCCTTCTAGGTGCCTATGACAAACATTTGCCTTTTGTCTCTG
ATGGGTAGTCTCACAGTTCTCGTGGGTATTTTTACCTTGTTTCTCCAGAAATCTATAATATGCCTT
TGCCAGATACAATTGAAGAGATACTGAGAGTAAAAGGGTAAATGTTTTTAGGTTTGTTTTTTAGTTT
CCTTTGGTCGTTCTTTTTCTGCTGTGTTTCGTATGCCACATAACGTCCTCGAGTCGGAA

Tabela 3. Clones obtidos de fragmentos de DNA purificado da sonda DCg obtida de cromossomos da espécie *Characidium cf. gomesi* e comparação de suas características com sequências existentes no GenBank.

Clones	Similaridade % GenBank*	Similaridade % GIRI*	% GC	% AT
CgW_1	00	00	38,2%	61,8%
CgW_2	00	00	37,8%	62,2%
CgW_4	00	00	37,5%	62,5%
CgW_9	00	72,87% - Helitron	42,7%	57,3%
CgW_10	00	00	28,4%	71,6%
CgW_13	00	00	35,0%	65,0%
CgW_34	00	00	37,8%	62,2%

A sonda DCg quando hibridada nos cromossomos em cromossomos metafásicos de *Characidium cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium sp.* (Figuras 2, 3 e 4) apresentou sinais de hibridação total com os cromossomos W e com a região pericentromérica dos cromossomos Z nestas espécies.

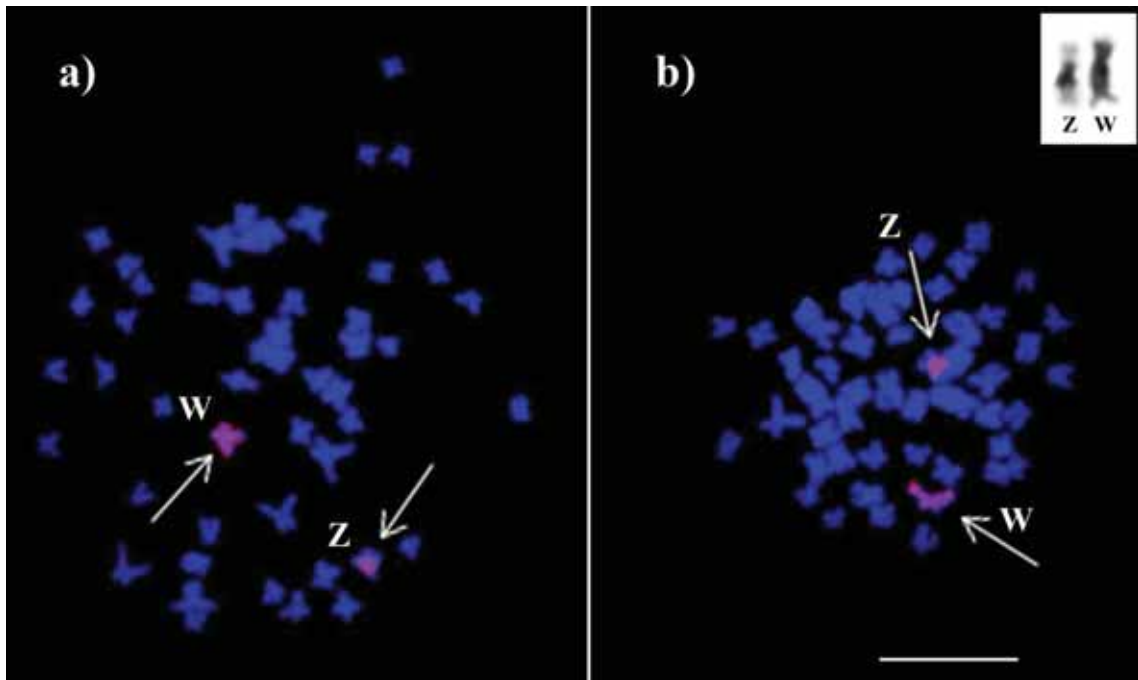


Figura 2. a) Metáfase somática de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* da localidade córrego Alambari com hibridação da sonda DCg. Estão indicados os cromossomos sexuais Z e W, que apresentaram marcação fluorescente e b) Metáfase somática de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* da localidade córrego Alambari com hibridação da sonda CgW4. Estão indicados os cromossomos sexuais Z e W, que apresentaram marcação fluorescente Em destaque os cromossomos Z e W após bandamento C. A barra corresponde a 10 micrômetros.

O fragmento CgW4 obtido do cromossomo W de *C. cf. gomesi* foi mapeado via hibridação *in situ* (FISH) em cromossomos de exemplares de duas populações da mesma espécie. Foi observado que esta sequência se encontra dispersa por todo o cromossomo W e está localizada na região pericentromérica do cromossomo Z nos exemplares amostrados no Ribeirão Alambari (Botucatu–SP) (Figura 2). Nos exemplares coletados no Córrego Águas da Magdalena (Botucatu–SP), além do padrão já observado nos exemplares do Ribeirão Alambari com a sonda DCg, foram também identificados sinais de hibridação desta sequência (CgW4) nos cromossomos B (Figura 4).

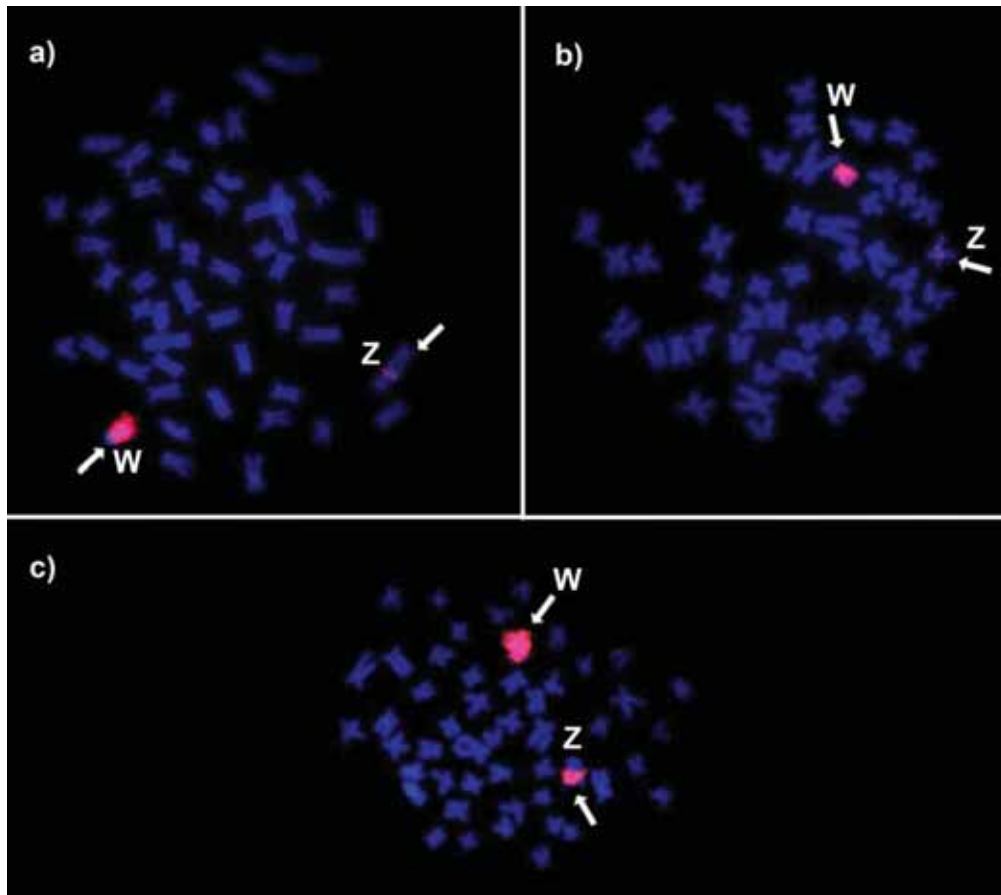


Figura 3. Metáfase somática de espécime fêmea de a) *C. cf. fasciatum*, b) *Characidium* sp., c) *C. cf. gomesi*, após hibridação *in situ* com a sonda DCg. Notar os cromossomos Z e W. A barra corresponde a 10 micrômetros.

Discussão

Caracterização geral das sequências cromossomo W-específicas de *Characidium*.

As sequências de DNA CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW13 e CgW34, obtidas do cromossomo W de *Characidium* cf. *gomesi* não apresentaram similaridade entre si e com outras sequências conhecidas (Tabela 3). Este tipo de comportamento também foi observado por Nakayama *et al.* (1994) e Parisi-Maltempi *et al.* (2007) ao estudarem sequências presentes nos cromossomos sexuais de *Leporinus elongatus* e Vicente *et al.* (2003) ao estudarem sequências dos cromossomos sexuais da espécie *Parodon hilarii*. Ao realizar estudos com cromatina do cromossomo W da espécie *Cydia pomonella*, Fuková *et al.* (2007) obtiveram várias sequências que não apresentaram similaridade com sequências previamente conhecidas. Takehana *et al.* (2012) isolaram a família de DNA repetitivo BstNI do

genoma de uma fêmea de *Oryzias hubbsi*, que é sugerido como bom marcador para o cromossomo W da espécie. Contudo, quando a sequência dessa família de DNA satélite foi comparada pela ferramenta BLAST no GenBank não foi observada similaridade da sequência obtida de *Oryzias hubbsi* com nenhuma sequência previamente conhecida, caracterizando-se como um resultado semelhante ao observado no presente trabalho com as sequências CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW13 e CgW34 obtidas de *C. cf. gomesi*.

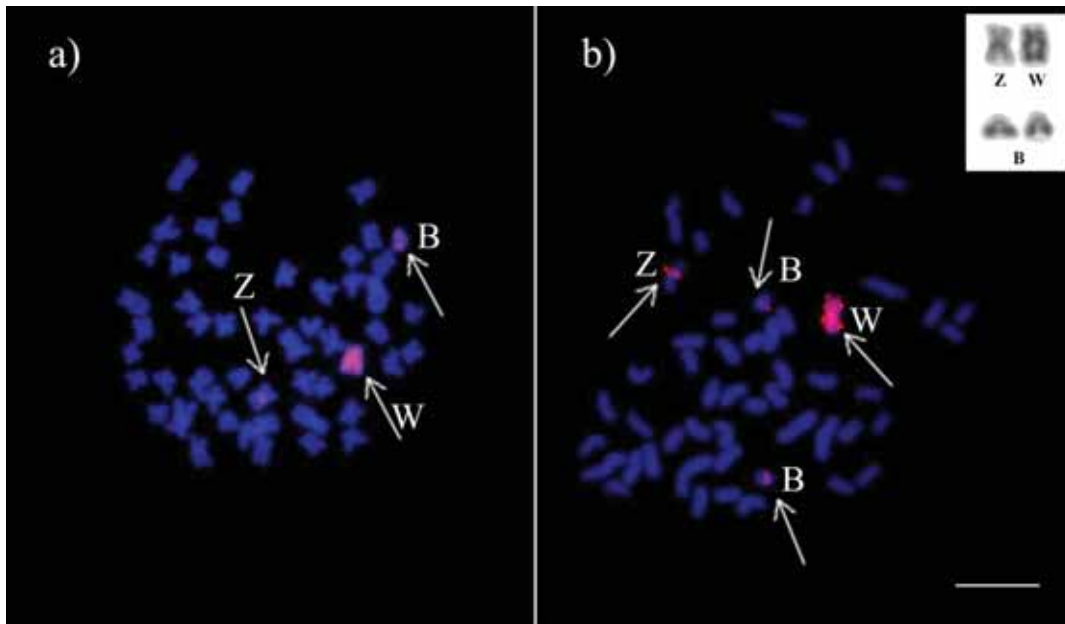


Figura 4. a) Metáfase somática de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* da localidade córrego Águas da Magdalena com hibridação da sonda DCg. Estão indicados os cromossomos sexuais Z, W e cromossomo B, que apresentaram marcação fluorescente e b) Metáfase somática de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* da localidade córrego Águas da Magdalena com hibridação da sonda CgW4. Estão indicados os cromossomos sexuais Z, W e cromossomos Bs, que apresentaram marcação fluorescente. Em destaque os cromossomos Z, W e Bs após bandamento C. A barra corresponde a 10 micrometros.

As sequências isoladas de *Characidium cf. gomesi* aparentemente não têm função biológica conhecida, já que não fazem parte de sequências codificantes e não mostram semelhança evidente com qualquer sequência conhecida, principalmente com aquelas L'5 e L'46 descritas por Nakayama *et al.* (1994), com a sequência Le Spe I isolada por Parise-Maltempo *et al.* (2007), com o segmento de DNA satélite pPh2004 isolado da espécie *Parodon hilarii* por Vicente *et al.* (2003),

bem como com componentes da família de DNA repetitivo BstNI, isolados de uma fêmea de *Oryzias hubbsi* (Takehana *et al.*, 2012).

A sonda CgW4 obtida no presente trabalho, apresentou sinais de hibridação nos cromossomos Z e W de *Characidium cf. gomesi* coletados no ribeirão Alambari (Figura 2), em padrão semelhante ao observado nas hibridações com a sonda DCg. Sequências específicas dos cromossomos sexuais já foram observadas em *Leporinus* (Nakayama *et al.*, 1994; Parise-Maltempo *et al.*, 2007; e Marreta *et al.*, 2012); em *Apareiodon* e *Parodon* (Vicente *et al.*, 2003; Schemberger *et al.*, 2012) e em *Oryzias* (Takehana *et al.*, 2012). A realização da FISH com as sondas CgW1, CgW2, CgW6, CgW9, CgW13 e CgW34 em cromossomos do complemento cariotípico de *C. cf. gomesi* não revelou sinais aparentes de hibridação. Considera-se que tal fato possivelmente se deve à pequena quantidade de cópias destas sequências existente nos cromossomos sexuais.

A sequência CgW9 apresentou similaridade de 72,87% com a sequência de um transposon de DNA (Helitron-2 Dr) isolado do genoma da espécie *Danio rerio* e Zhou *et al.* (2006) identificaram vários Helitrons na região de determinação do sexo dos cromossomos sexuais de *Xiphophorus maculatus*. A presença de tais elementos também é descrita em *Danio rerio* e *Takifugu rubripes* (Poulter *et al.*, 2003). Foi observado em *Xiphophorus maculatus* e em outros Poecilídeos que o transposon Helitron possui uma quantidade de cópias relativamente modesta (menos de 20 cópias em todo o genoma) (Zhou *et al.*, 2006). Pode-se supor que a presença desta classe de transposons em cromossomos sexuais poderia permitir a inserção de Helitron diferentes nos cromossomos sexuais, uma vez que os cromossomos sexuais são particularmente ricos em sequências repetitivas (Volff *et al.*, 2003; Nanda *et al.*, 2000). Considera-se, pois, que os Helitrons poderiam contribuir, juntamente com outras sequências, para a diferenciação molecular entre os cromossomos sexuais de *Characidium*, como observado para os elementos transponíveis em outros organismos (Nanda *et al.*, 2000; Steinemann; Steinemann, 2005).

Padrão de DNA repetitivo encontrado nas sequências dos cromossomos W de *Characidium* e sua relação com origem, estrutura e evolução destes cromossomos.

Estudos de sequências de DNAs repetitivos não codificantes têm mostrado que estas desempenham um papel importante na organização estrutural e funcional do genoma (Schueler *et al.*, 2001; Biémont; Vieira, 2006). Uma clara correlação entre cromossomos sexuais e DNAs repetitivos tem sido apontada em vários estudos (Singh *et al.*, 1976; Nanda *et al.*, 1990; Nishioka *et al.*, 1993; Erlandsson *et al.*, 2000; Vicente *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2006; Matsubara *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2008; Kejnovsky *et al.*, 2009; Cioffi; Bertollo, 2010; Cioffi *et al.*, 2011), indicando que a evolução do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais é frequentemente associada ao acúmulo de sequências de DNA repetitivo nestes cromossomos. É sabido que DNAs repetitivos podem também ocorrer e se acumular nos autossomos de diversos organismos. No entanto, cromossomos sexuais realizam este procedimento de modo positivo, uma vez que o processo de acúmulo seria favorecido pela ausência ou baixa frequência de recombinação nestes cromossomos (Charlesworth *et al.*, 2005).

Diferentes estudos têm proposto que alterações estruturais do DNA devam ocorrer para a diferenciação dos cromossomos sexuais ou para que seja alcançada a supressão total ou parcial de crossing-over entre os cromossomos sexuais homomórficos ancestrais (Ohno, 1967; Volff *et al.*, 2007). O acúmulo de sequências de DNA repetitivo possivelmente resulta de processos de transposição e amplificação, que se acredita têm início nas proximidades das regiões determinantes do sexo, favorecido pela ausência ou baixa frequência de eventos de recombinação nestas áreas (Takehana *et al.*, 2007). A supressão da recombinação favoreceria, então, o acúmulo de mutações, levando à inativação de genes, de modo que o acúmulo de sequências de DNA repetitivo geraria diferenciação morfológica durante os primeiros estágios de evolução dos cromossomos sexuais (Ohno, 1967; Bull, 1983; Cioffi *et al.*, 2012b). Nesse sentido, o acúmulo de heterocromatina também poderia levar a uma redução da taxa de recombinação entre cromossomos sexuais. Contudo, se o processo de heterocromatinização representa a causa ou a consequência de uma redução da recombinação ainda é uma questão que não está totalmente resolvida (Charlesworth *et al.*, 1994).

Variações nos tipos de DNA repetitivo que formam a estrutura dos cromossomos sexuais têm sido mostradas e associadas com a diversidade genômica e evolução deste tipo de cromossomos, e exemplos como *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2009, 2011) e *Xiphophorus maculatus* (Nanda *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2006) podem ser citados. No entanto, estas sequências podem representar um acúmulo de DNA repetitivo no genoma, que direta ou indiretamente poderia favorecer a divergência dos cromossomos sexuais, como foi sugerido ocorrer nas espécies *Leporinus elongatus* e *L. macrocephalus* (Hashimoto *et al.*, 2009).

Relatos em diferentes táxons referem-se ao acúmulo de retroelementos nos cromossomos sexuais (Steinemann; Steinemann, 1992; Erlandsson *et al.*, 2000; Ozouf-Costaz *et al.*, 2004; Marchal *et al.*, 2006; Cermak *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011a). O acúmulo de elementos transponíveis interferiria fortemente na atividade dos genes e poderia ser considerado um passo importante na promoção da morfogênese dos cromossomos sexuais (Steinemann; Steinemann, 2005). Os resultados mencionados em vários estudos sugerem um potencial papel das sequências repetitivas de DNA para a diferenciação dos cromossomos sexuais em vários grupos de peixes Neotropicais. Nesse sentido, as sequências de DNA repetitivo têm se apresentado como ferramenta importante para elucidar tanto os processos de diferenciação morfológica apresentados pelos cromossomos sexuais nos peixes, quanto para explicar a expressiva diversidade de sistemas de diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais que ocorre neste grupo de vertebrados (Cioffi *et al.*, 2011).

Cromossomos B e cromossomos sexuais em *C. cf. gomesi*

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) foi realizada utilizando-se uma sonda produzida a partir de uma sequência obtida dos cromossomos W de exemplares de *C. cf. gomesi* (sonda CgW4) (Figura 4). Esta sonda evidenciou marcação nos cromossomos W, conforme esperado e na região pericentromérica do cromossomo Z. No entanto, foi constatado que também os cromossomos B se apresentaram parcialmente marcados. Resultado semelhante foi encontrado em *Locusta migratoria*, descrito por Teruel *et al.* (2009a) que observaram que os cromossomos B e os sexuais compartilhavam sequências, ao hibridarem

sondas confeccionadas a partir do cromossomos B. O compartilhamento de seqüências de DNA repetitivo entre cromossomos B e os do complemento A já foi observado em diferentes organismos, como foi demonstrado em *Apodemus peninsulae* (Rubtsov *et al.*, 2004), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2004), *P. kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2009a). Tal fato poderia levar à formulação de hipóteses de uma origem comum para estes elementos genômicos, para uma derivação evolutiva entre eles ou ainda por sua presença justificada pela ocorrência de transposições, tendo em vista a mobilidade característica de alguns elementos repetitivos no genoma das espécies.

Os cromossomos supranumerários ou B podem ser classificados como cromossomos extras que ocorrem em diferentes grupos de organismos e apresentam características específicas que os diferenciam dos cromossomos do complemento A. Aparentemente não constituem elementos genômicos essenciais à vida e desenvolvimento dos organismos portadores, estando presentes em alguns indivíduos das populações e ausentes em outros (Camacho *et al.*, 2000). Geralmente não apresentam homologia com os demais cromossomos do conjunto básico de cromossomos, visto que são observados como univalentes nas células germinativas (Oliveira *et al.*, 1988). Sua frequência é bastante variável, apresentando-se geralmente como elementos heterocromáticos. Em *C. cf. gomesi*, entretanto, os cromossomos B encontrados nas análises realizadas no presente trabalho, ao contrário da característica heterocromática comum à maioria destes cromossomos, apresentaram-se apenas parcialmente heterocromáticos, com heterocromatina restrita à região terminal dos braços cromossômicos (Pansonato-Alves *et al.*, 2011a). Este aspecto da heterocromatina já foi descrito anteriormente em algumas espécies que exibem cromossomos B parcialmente heterocromáticos como *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 2012), *Astyanax scabripinnis* (Salvador; Moreira-Filho, 1992), *Rhamdia* (Hochberg; Erdtmann, 1988; Fenocchio; Bertollo, 1990; Abucarma; Martins-Santos, 2001) e *Pimelodus* sp. (Borin; Martins-Santos, 2004).

Usando a sonda As51 obtida após digestão do DNA genômico de *Astyanax scabripinnis* com a enzima de restrição KpnI, Mestriner *et al.* (2000) descreveram a composição do DNA repetitivo encontrado nos grandes cromossomos B identificados nesta espécie. Os padrões obtidos após a aplicação da técnica de

FISH utilizando esta sonda levaram os autores a sugerir que a origem dos cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* seria decorrente da formação de um isocromossomo, uma vez que sequências repetitivas apareceram de modo simétrico em ambos os braços do cromossomo supranumerário. Estes resultados reafirmam os resultados de Vicente *et al.* (1996), que também identificaram simetria nas bandas C encontradas nos braços do cromossomo B em indivíduos de outra população analisada desta espécie, onde as sequências repetitivas também se apresentaram em posições idênticas em um dos braços de um par de cromossomos do complemento A.

Em *Prochilodus lineatus*, espécie que apresenta um número variável de microcromossomos B, uma das sequências satélites isoladas por Jesus *et al.* (2003) está presente nas regiões pericentroméricas de vários cromossomos do conjunto A e em todos os microcromossomos B. Esses resultados levaram os autores a proporem que a origem dos cromossomos B nessa espécie teria se dado, provavelmente, a partir de elementos do complemento A.

Relacionamentos entre cromossomos sexuais e cromossomos B têm sido amplamente relatados entre insetos (Camacho *et al.*, 2011) e peixes (Oliveira *et al.*, 2009) e é evidente que estes cromossomos compartilham características como a distribuição diferencial da heterocromatina dos demais autossomos, acúmulo de DNA repetitivo e perda de atividade de genes, características distintas em relação aos autossomos (Camacho *et al.*, 2011). Um exemplo interessante da relação entre os cromossomos sexuais e cromossomos B vem do peixe ciclídeo Africano *Lithochromis rubripinnis* que possui um cromossomo B aparentemente originado do par sexual, específico dos exemplares do sexo feminino que demonstra uma razão favorável ao sexo feminino nesta espécie, embora não tenham sido identificados genes relacionados à determinação do sexo nos cromossomos B (Yoshida *et al.*, 2011). Os cromossomos B observados em exemplares de *C. cf. gomesi* ocorrem em machos e fêmeas, não revelando um relacionamento destes cromossomos supranumerários com um sexo específico (Pansonato-Alves *et al.*, 2011a).

Neste contexto, a proposição de uma origem dos cromossomos B em *Characidium* a partir dos cromossomos sexuais também tem que ser considerada, principalmente tendo como referência os resultados obtidos em alguns gêneros de

gafanhotos (Hewitt, 1979; Camacho, 2005). Em vertebrados, o cromossomo B do anfíbio *Leiopelma hochstetteri* aparentemente teve sua origem a partir do cromossomo W heteromórfico presente nos representantes desta espécie, em hipótese sustentada pela comparação de sequências de DNA (Sharbel *et al.*, 1998) e pelas semelhanças morfológicas existentes entre estes cromossomos (Green *et al.*, 1993).

A presente análise revela que os cromossomos sexuais e cromossomos B compartilham sequências presentes na sonda DCg e a sequência CgW4. O fato de estas sondas hibridarem nos cromossomos sexuais e nos B e não hibridarem em nenhum cromossomo autossômico poderia ser considerado um forte indicativo da origem dos cromossomos B desta população a partir de fragmentos dos cromossomos sexuais.

4.3 - Capítulo 3

Análise genômica comparativa por meio da técnica de Gish entre espécies de *Characidium* (Characiformes; Crenuchidae)

Resumo

No presente estudo foi utilizada a hibridização genômica (GISH) em espécies do gênero *Characidium* (*C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp.) na tentativa de um melhor entendimento da evolução dos cromossomos sexuais destas espécies. Uma grande parte do genoma dos eucariontos é composta por elementos repetitivos, que afirmam a existência de uma grande quantidade de segmentos de DNA que aparentemente não estão sujeitos a uma forte pressão seletiva. Na maioria dos organismos, as sequências repetidas de DNA compreendem grande porção do genoma, sendo que cerca de 45% de todo o DNA dos mamíferos é composto de elementos transponíveis, enquanto no peixe *Fugu rubripes* apenas 2,7% do genoma é composto por elementos transponíveis. Apesar de não se saber ao certo a função da presença dos segmentos de DNA repetidos, diferentes estudos vem sugerindo o envolvimento destas sequências no processo de replicação do DNA, recombinação, expressão gênica e até na diferenciação de cromossomos sexuais, ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral. O gênero *Characidium* apresenta espécies homomórficas, com ausência de diferenciação morfológica entre os cromossomos, enquanto em outras a diferença entre os cromossomos em indivíduos machos e fêmeas caracteriza-se como a presença de cromossomos sexuais. Os cromossomos sexuais são muitas vezes os elementos mais conspícuos em um complemento cromossômico em termos de tamanho, forma e heterocromatinização, nos quais é observada uma clara distinção entre os cromossomos do par considerado sexual. A técnica de GISH vem sendo utilizada na busca de homologias entre os genomas de diferentes espécies, tendo sua aplicação também em estudos de cromossomos sexuais em alguns grupos de peixes.

Introdução

Uma grande parte do genoma dos eucariotos é composta por elementos repetitivos que se propagam através de cópias de si mesmos, podendo se mover para diferentes posições do genoma (Ferreira *et al.*, 2011b). Nesse grupo de elementos genômicos, a presença de íntrons, grandes regiões intergenes, sequências satélites, pseudogenes e muitas famílias de elementos transponíveis sugerem a existência de uma grande quantidade de segmentos de DNA que aparentemente não estão sujeitos a uma forte pressão seletiva (Weiner *et al.*, 1986; Charlesworth *et al.*, 1994).

Cerca de 45% de todo o DNA dos mamíferos é composto de elementos transponíveis (Ferreira *et al.*, 2011), sendo que a enorme variação relatada no tamanho do genoma entre os diferentes eucariotos está frequentemente associada ao acúmulo de sequências repetidas. Apesar de ainda não se saber ao certo sobre a função desempenhada no genoma pelo DNA repetido, em que pese a existência de numerosas evidências, diferentes estudos vem sugerindo o envolvimento destas sequências no processo de replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e até na diferenciação de cromossomos sexuais em peixes (Nanda *et al.*, 1990; Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Marreta *et al.*, 2012; Cioffi *et al.*, 2012a), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral. Essas sequências repetidas podem também estar envolvidas com a ocorrência de rearranjos cromossômicos tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos de organismos (Kidwell, 2002). Mesmo tendo em conta que o significado funcional destas sequências no genoma ainda não esteja totalmente conhecido, considera-se que algumas classes de sequências repetidas devem desempenhar papel importante no funcionamento celular (Epplen; Epplen-Haupt, 2002).

O gênero *Characidium* apresenta espécies com ausência outras com presença de cromossomos sexuais (Pansonato-Alves *et al.*, 2011a; Machado *et al.*, 2011). Estes elementos genômicos estruturais fornecem o sinal primário na via de determinação do sexo, ao mesmo tempo asseguram uma proporção equilibrada entre o sexo da prole (Sahara *et al.*, 2012). Além da sua função, os cromossomos

sexuais são muitas vezes os elementos mais conspícuos em um complemento cromossômico em termos de tamanho, forma e heterocromatinização, sendo normalmente observada uma clara distinção entre os cromossomos do par sexual e os autossomos.

A técnica de GISH vem sendo utilizada em vários grupos na busca de homologias entre os genomas de diferentes espécies de peixes ciclídeos (Valente *et al.*, 2009), em estudos de híbridos como evidenciado nos ciprinídeos *Carassius auratus gibelio* (Zhu; Gui, 2007) e *Squalius alburnoides* (Rampin *et al.*, 2012), em salamandras (Bi; Bogart, 2006) e em estudos de cromossomos sexuais em mariposas (Fuková *et al.*, 2005). No presente estudo foi utilizada a hibridização genômica (GISH) em espécies do gênero *Characidium* (*C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp.) na tentativa de melhor entender o processo determinante de evolução dos cromossomos sexuais nestas espécies.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares de *Characidium cf. gomesi*, coletados no córrego Alambari, Bacia do Rio Tietê, município de Botucatu/SP (22° 56' 08"S 48° 19' 15"W); *C. cf. gomesi*, coletados no Córrego da Cachoeira, Bacia do Alto Paraná, município de Itumirim/GO (18° 34' 50,80"S 52° 05' 52,80"W); de *C. cf. fasciatum*, coletados na Bacia hidrográfica do Rio das Velhas (Rio São Francisco), município de Curvelo/MG (19° 38' 18,50"S 44° 07' 17,60"W) e de *Characidium* sp., coletados no Rio Formoso, Bacia do Alto Paraná, município de Chapadão do Céu/GO (18° 16' 17,00"S 52° 50' 34,40"W) (Tabela 1). Os espécimes analisados foram previamente fixados em formalina a 10% e conservados em etanol 70% para identificação, sendo posteriormente depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil (LBP).

Antes do sacrifício os exemplares analisados foram anestesiados com benzocaína. As preparações dos cromossomos mitóticos foram obtidas de células renais segundo Foresti *et al.* (1981). O bandamento foi realizado segundo Sumner (1972).

Tabela 1. Local de amostragem das espécies do gênero *Characidium*. O número de indivíduos amostrados e o sexo são indicados na tabela abaixo. F = fêmea e M = macho

Espécies	F	M	Local de amostragem	Coordenadas
<i>C. cf. fasciatum</i>	1	-	Tributário do Rio das Velhas-Rio São Francisco-Curvelo, Minas Gerais	19° 38' 18.50"S 44° 07' 17.60"W
<i>C. cf. gomesi</i>	9	5	Riacho Rio da Cachoeira, Alto Rio Paraná-Itumirim, Goiás	18° 34' 50.80"S 52° 05' 52.80"W
<i>C. cf. gomesi</i>	4	1	Córrego Alambari, Rio Tietê Botucatu, São Paulo	22° 56' 08,00"S 48° 19' 15,00"W
<i>C. cf. zebra</i>	2	1	Ribeirão Claro, Rio Tietê-Rio Claro, São Paulo	22° 22' 42.99"S 47° 32' 04.08"W
<i>Characidium</i> sp.	5	3	Rio Formoso, Alto Rio Paraná-Chapadão do Céu, Goiás	18° 16' 17.00"S 52° 50' 34.40"W

Confecção de sonda de DNA genômico da espécie *C. cf. zebra*

A sonda GCz (Genoma *Characidium cf. zebra*) foi confeccionada pelo método de DOP-PCR utilizando o genoma total de exemplar fêmea de *Characidium cf. zebra*. A extração do gDNA foi realizada segundo o protocolo utilizado por Aljanabi ; Martinez (1997) e para a elaboração desta sonda foram utilizados 2µl (200 ng) de DNA total em uma reação de volume final igual a 24µl. Essas amostras foram submetidas a uma amplificação inespecífica com o uso de um *primer* degenerado (DOP-PCR - Mühlmann-Diaz *et al.*, 2001) seguindo o protocolo descrito acima.

O produto da PCR foi checado em gel de agarose a 1%, onde foi detectada uma amplificação em forma de arrasto com tamanho de 100 a 500pb. Foi, em seguida, realizada uma PCR para aumentar a quantidade de DNA e posteriormente foi realizada uma PCR de marcação utilizando oligonucleotídeos biotinizados, onde a sonda DCg foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science; www.roche.com) e a sonda GCz foi marcada com Biotina 14-dUTP (Roche Applied Science; www.roche.com) via reação da PCR (Polymerase Chain Reaction), segundo especificações do fabricante.

A hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel *et al.* (1986), onde 1µg da sonda GCz e 700ng da sonda DCg foram adicionados à solução de hibridação (50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano e 2 X SSC, a 37°C por 18h) e depositados em cada lâmina. Os sinais hibridização foram detectados utilizando-se anti-digoxigenina-rhodamina (Roche Applied Science), com a preparação sendo contracorada com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) - VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI) e analisada em um fotomicroscópio ótico (Olympus, BX61; www.olympus.com). As metáfases foram fotografadas e editadas utilizando o software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics; www.mediacy.com) e Adobe Photoshop CS4.

Resultados

A utilização da sonda GCz teve como objetivo buscar homologias entre as regiões de cromatina dos cromossomos de *C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. A técnica de GISH foi realizada utilizando-se a sonda GCz, marcada com fluorocromo verde - Biotina e a FISH com a sonda DCg, marcada com fluorocromo vermelho - Digoxigenina (Figuras 1,2,3,4 e 5).

A sonda GCz apresentou sinais de hibridação dispersos por todos os cromossomos de *Characidium cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp., com maior concentração das marcações nas regiões terminais dos autossomos. O cromossomo Z apresentou marcações terminais nos braços p e q em *C. cf. gomesi* (Alambari), enquanto em *C. cf. fasciatum* e *C. cf. gomesi* (Itumirim) as marcações de hibridação ocorreram na região terminal do braço p e intersticial no braço q. *Characidium* sp. apresentou uma marcação terminal e uma pericentromérica no braço q e uma na região terminal do braço q. O cromossomo W apresentou sinais na região terminal do braço p em *C. cf. gomesi* (Alambari). Em *C. cf. fasciatum* e *C. cf. gomesi* (Itumirim) não foram observadas marcações da sonda CGz. *Characidium* sp. apresentou duas marcações, sendo uma intersticial no braço q e uma pericentromérica no braço p do seu cromossomo W.

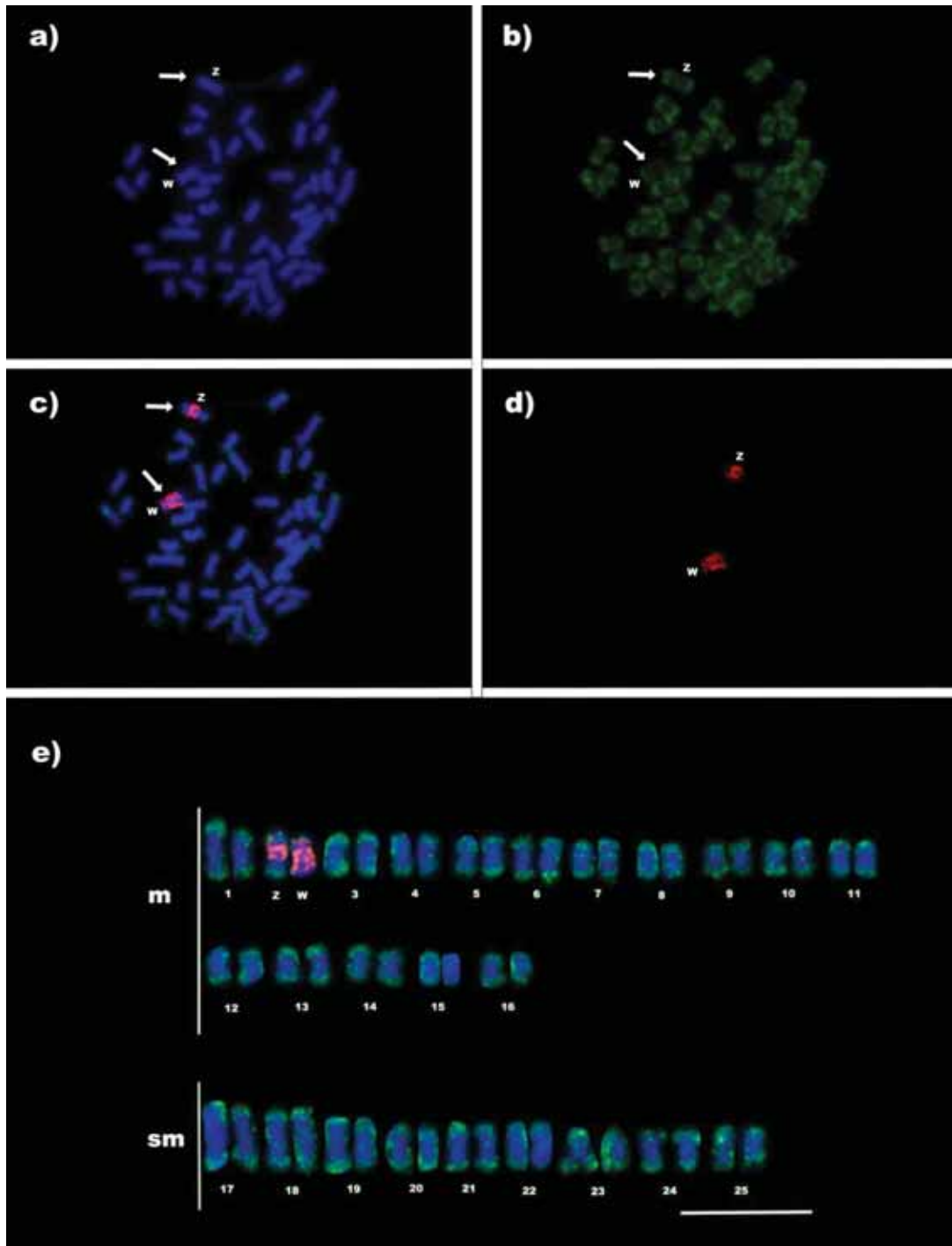


Figura 1. a) Metáfase somática de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* com cromossomos corados com DAPI. b) sinais de hibridação da sonda GCz. c) Metáfase somática corada com DAPI e com os sinais das sondas DCg (vermelha) e GCz (verde). d) Sinais da sonda DCg. e) cariótipo de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* proveniente do ribeirão Alambari, com sinais das sondas DCg e GCz. O cromossomo W mostrou-se inteiramente marcado, enquanto o Z apresentou marca apenas na região pericentromérica. A sonda GCz apresentou marcações dispersas, com maior incidência nas regiões terminais dos cromossomos. A barra corresponde a 10 micrômetros.

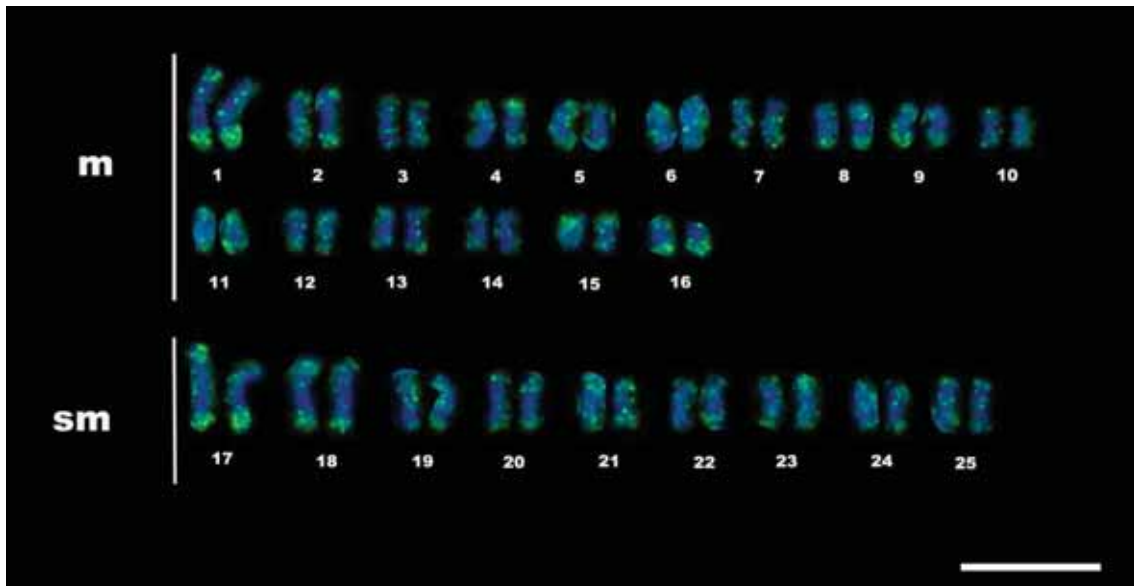


Figura 2. Cariótipo de exemplar fêmea de *C. cf. zebra* proveniente do Ribeirão Claro. A sonda GCz apresentou marcações dispersas, com maior incidência nas regiões terminais dos cromossomos. A barra corresponde a 10 micrômetros.

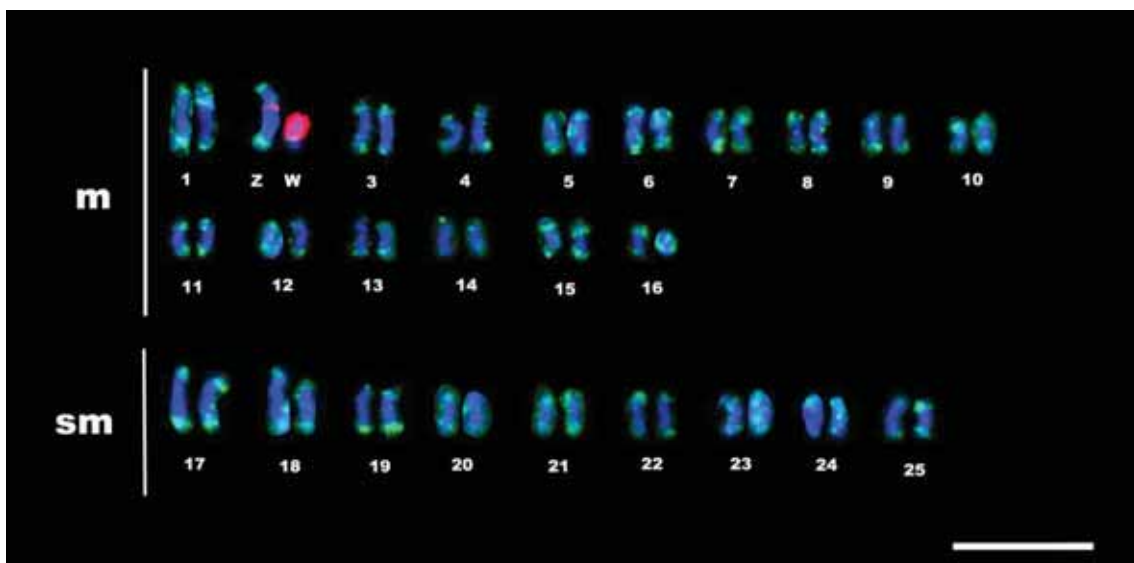


Figura 3. Cariótipo de exemplar fêmea de *C. cf. fasciatum* proveniente da bacia do Rio das Velhas, com marcação pelas sondas DCg (Vermelho) e GCz (verde). O cromossomo W mostrou-se inteiramente marcado, enquanto o Z apresentou marcação apenas na região pericentromérica. A sonda GCz apresentou marcações dispersas, com maior incidência nas regiões terminais dos cromossomos. A barra corresponde a 10 micrômetros.

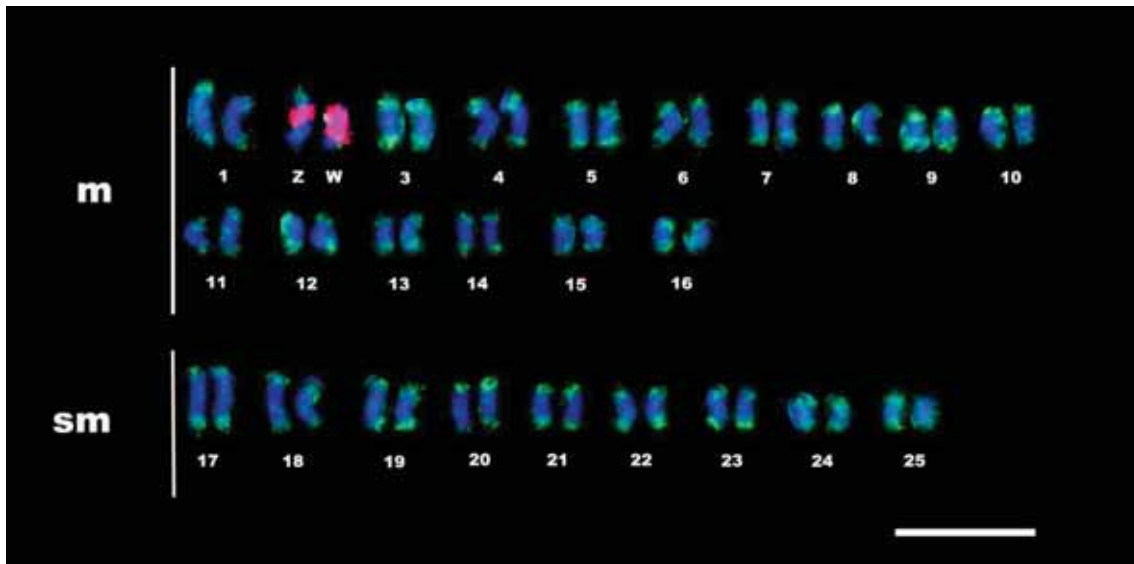


Figura 4. Cariótipo de exemplar fêmea de *C. cf. gomesi* proveniente do Córrego da Cachoeira com marcação pelas sondas DCg (vermelho) e GCz (verde). O cromossomo W mostrou-se inteiramente marcado, enquanto o Z apresentou marcação apenas na região pericentromérica. A sonda GCz apresentou marcações dispersas, com maior incidência nas regiões terminais dos cromossomos. A barra corresponde a 10 micrômetros.

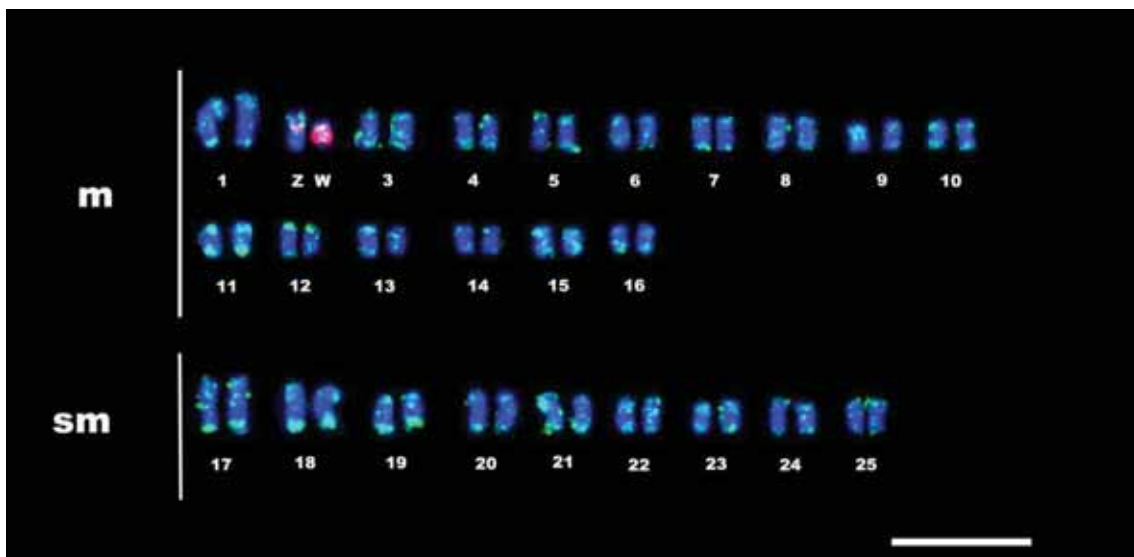


Figura 5. Cariótipo de exemplar fêmea de *Characidium* sp. proveniente do Rio Formoso, com marcação pelas sondas DCg (vermelho) e GCz (verde). O cromossomo W mostrou-se inteiramente marcado, enquanto o Z apresentou marcação apenas na região pericentromérica. A sonda GCz apresentou marcações dispersas, com maior incidência nas regiões terminais dos cromossomos. A barra corresponde a 10 micrômetros.

A hibridação com a sonda DCg, confeccionada a partir de cromossomos W de *C. cf. gomesi*, apresentou um padrão anteriormente conhecido, com marcação em

grande parte do cromossomo W e apenas na região pericentromérica do cromossomo Z. O bandamento C apresentou também padrões já conhecidos anteriormente, com a presença de regiões heterocromáticas nas regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos das espécies analisadas. Nas espécies analisadas, os cromossomos W se apresentaram heterocromáticos, enquanto os cromossomos Z apresentaram blocos de diferentes tamanhos na região pericentromérica (Figura 6).

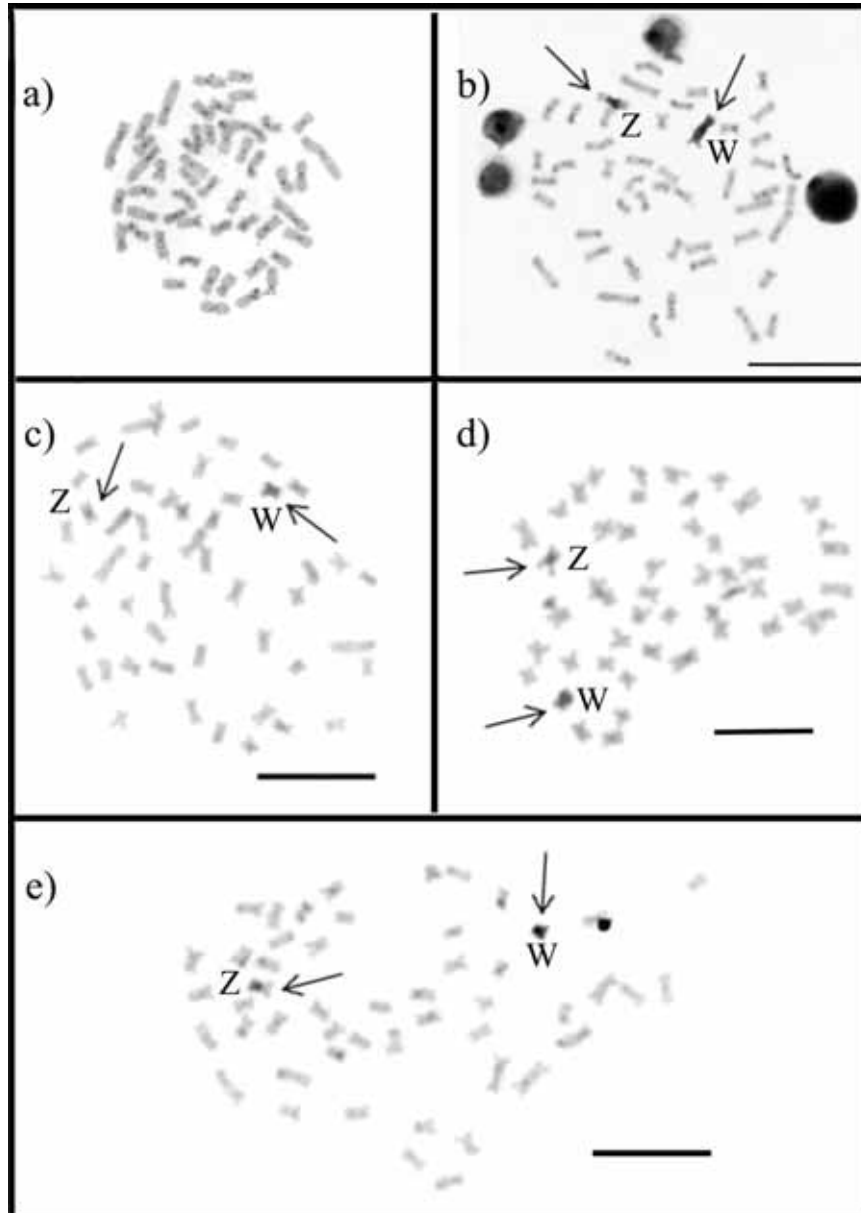


Figura 6. Metáfase somática de espécimes fêmeas de a) *C. cf. zebra*, b) *C. cf. gomesi* (Alambari), c) *C. cf. fasciatum*, d) *C. cf. gomesi* (Itumirim) e e) *Characidium* sp., após bandamento C. Os cromossomos Z e W estão indicados por setas. A barra corresponde a 10 micrômetros.

Discussão

No presente estudo foram utilizados cromossomos metafásicos de *C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. para a hibridação genômica *in situ* com sonda elaborada do DNA total de *C. cf. zebra* (Sonda CGz). De modo geral os padrões de hibridação da GISH foram similares aos resultados de mapeamento de regiões heterocromáticas. A heterocromatina em *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. está presente em regiões pericentroméricas e terminais dos autossomos e na região pericentromérica do cromossomo Z, sendo o cromossomo W totalmente heterocromático. *C. cf. zebra* apresenta as regiões cromossômicas pericentroméricas e terminais heterocromáticas e não apresenta o polimorfismo cromossômico ligado ao sexo (Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a).

Em peixes, encontramos muitos tipos de DNAs repetitivos nas regiões ricas em heterocromatina que foram identificados com DNA satélite (Oliveira; Wright, 1998) e retrotransposons (Ferreira *et al.*, 2011). Este fato também é observado em outros grupos de vertebrados como roedores e répteis (Yamada *et al.*, 2005). Em aves foram isoladas sequências de DNA repetitivo que se encontravam na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento cariotípico (Madsen *et al.*, 1992; Saifitdinova *et al.*, 2001). Tais fragmentos genômicos, centrômeros e telômeros, possuem sequências de DNA repetitivo que são altamente conservadas (Witzany, 2008). Os padrões de hibridação obtidos com a sonda GCz se apresentaram de forma dispersa por todos os cromossomos de *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp., aparecendo com maior intensidade nas regiões terminais. Considera-se que o fato de serem sequências repetitivas altamente conservadas poderia explicar a presença dos sinais de hibridação observados nas espécies analisadas.

Como observado, a heterocromatina presente no cromossomo W e a observada na região pericentromérica do cromossomo Z aparentemente são distintas das demais classes de heterocromatina encontrada nos autossomos de *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum*, *Characidium* sp. e nos cromossomos de *C. cf. zebra*. E a ocorrência de hibridação também sugere que o cromossomo Z apresenta regiões possivelmente homeólogas com cromossomos de *C. cf. zebra*, enquanto o cromossomo W já se apresenta distinto dos demais cromossomos, exceto com

relação à pequena região terminal do braço p identificada com sinais de hibridização, que poderia ocorrer devido à presença de sequências conservadas semelhantes às observadas nas sequências teloméricas, que são conservadas na linhagem dos vertebrados (Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008).

O acúmulo de elementos repetitivos em cromossomos específicos é uma forte evidência da existência de cromossomos sexuais, como observado em espécies dos gêneros *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008ab), *Leporinus* (Galetti e Foresti, 1986; Parisi-Maltempi *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2009; Marreta *et al.*, 2012), *Hoplias* (Cioffi *et al.*, 2009, 2011), *Parodon* (Vicente *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2006), *Tripotheus* (Artoni; Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2008ab) e nos Poeciliidae (Nanda *et al.*, 1990, 2000; Volff; Schartl, 2001), entre outros. É proposto que durante a diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais dos mamíferos, diversas alterações genéticas contribuíram para a diferenciação dos cromossomos X e Y, sendo uma delas o aparecimento de regiões ricas em DNA repetitivo (Ohno, 1967; Volff *et al.*, 2007; Cioffi *et al.*, 2011). Observa-se em *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. o acúmulo de DNAs repetitivos (heterocromatina), que seria um dos passos iniciais que levaria a supressão de recombinação meiótica e, como proposto por Charlesworth *et al.* (1994), as regiões de DNAs repetitivos possivelmente possuiriam uma taxa de seleção menor que a das regiões codificantes, facilitando o acúmulo de mutações e levando a uma clara distinção entre os dois cromossomos do par sexual, tornando-os distintos dos autossomos.

Os padrões de hibridação observados sugerem que os cromossomos sexuais de *C. cf. gomesi*, *C. cf. fasciatum* e *Characidium* sp. possuem regiões homeólogas com cromossomos de *C. cf. zebra*, mas também sugerem a diferenciação dos cromossomos das espécies analisadas, que provavelmente ocorreu após eventos cladogenéticos que separaram as formas ancestrais dos grupos que apresentam cromossomos sexuais daqueles que não os possuem nos dias atuais.

A variação na quantidade dos diferentes tipos de DNA repetitivo está relacionada com a diversidade genômica e evolução dos cromossomos sexuais em muitas espécies de peixes (Cioffi *et al.*, 2012b). A presença do DNAr 18S é observada nos cromossomos sexuais em espécies dos gêneros *Characidium* (Noleto *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011; Pansonato Alves *et al.*, 2011a) e

Triportheus, sendo que na espécie *T. auritus*, além do DNAr 18S também foi observado nestes cromossomos o acúmulo de uma classe de microssatélites, do mesmo modo que em *Leporinus reinhardti*, onde foi observada uma grande concentração de classes de microssatélites no cromossomo W (Cioffi *et al.*, 2012b).

Em *Hoplias malabaricus* várias e diferentes classes de DNA repetitivos, incluindo satélites, elementos transponíveis e microssatélites estão presentes na região heterocromática dos cromossomos sexuais (Cioffi *et al.*, 2010, 2012b). Considera-se, portanto, que há uma clara relação entre a diferenciação dos cromossomos sexuais e a heterocromatinização do cromossomo W, com a presença de classes de DNA altamente repetitivos, entre os quais se incluem os elementos transponíveis (os retrotransposons), bem como outras classes de segmentos repetitivos com número menor de cópias no genoma (os transposons), submetidos a processos de diferenciação e evolução nos cromossomos sexuais em algumas espécies de peixes que os possuem.

4.4 - Capítulo 4

Caracterização citogenética de *Crenuchus spilurus* Günther, 1863 (Characiformes, Crenuchidae)

Resumo

O presente trabalho teve o objetivo de caracterizar e descrever o cariótipo da espécie *Crenuchus spilurus*. A espécie apresentou número diplóide de 38 cromossomos (12m + 4sm + 2st + 20a), que constitui o menor número cromossômico descrito para a família Crenuchidae. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram identificadas em apenas um par de cromossomos subtelocêntricos (par número nove), sendo que a realização de FISH com sondas de DNAr 18S mostrou coincidência dos sítios identificados pela técnica de Ag-RONs. Contudo, dois pares de cromossomos acrocêntricos foram identificados como portadores de sítios de DNAr 5S (pares 10 e 13). O bandamento C revelou conspícuas regiões heterocromáticas no braço curto do par subtelocêntrico número nove e nas regiões pericentroméricas de vários cromossomos acrocêntricos. Não foram observados polimorfismos ligados ao sexo nos exemplares analisados.

Introdução

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta (Schaefer, 1998) e, de acordo com Buckup (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas existirem no planeta, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se distribuídas na região Neotropical, das quais 4.475 são atualmente consideradas válidas, além de cerca de 1.550 que são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. A fauna de peixes de águas continentais do Brasil acompanha estas estatísticas, com 2.587 espécies já descritas e muitas ainda desconhecidas (Buckup *et al.*, 2007). Entre as espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi, que representam 71% da ictiofauna de água doce Neotropical (Fink; Fink, 1981; Reis *et al.*, 2003).

A família Crenuchidae compreende 71 espécies válidas de peixes descritas em 12 gêneros (*Ammocryptocharax*, *Characidium*, *Crenuchus*, *Elachocharax*, *Geryichthys*, *Klausewitzia*, *Leptocharacidium*, *Melanocharacidium*, *Microcharacidium*, *Odontocharacidium*, *Poecilocharax* e *Skiotocharax*) (Buckup, 2003). Estudos recentes utilizando a metodologia cladística sugerem que Characidiinae compõe, juntamente com Crenuchinae, a família Crenuchidae (Buckup, 1998).

Entre os representantes da família Crenuchidae, o gênero *Characidium* é o mais estudado as suas espécies apresentam cariótipos compostos por cinquenta cromossomos frequentemente dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, sendo que a maioria das espécies cariotipadas apresentam heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo do tipo ZZ/ZW (Machado *et al.*, 2011; Pansonato–Alves *et al.*, 2011a). Em relação aos demais gêneros, os dados citogenéticos são pouco conhecidos. Apesar dos resultados obtidos sobre a origem dos cromossomos sexuais sugerirem que este polimorfismo ocorreu em espécies do gênero *Characidium*, o desconhecimento dos cariótipos de exemplares dos demais gêneros da família Crenuchidae dificulta conclusões mais precisas sobre a origem e evolução dos cromossomos Z e W em *Characidium* e também a compreensão da evolução cromossômica ocorrida nesta família, visto que os exemplares de *Crenuchus spilurus* analisados apresentaram trinta e oito cromossomos, com uma fórmula cariotípica distinta dos cromossomos observados em *Characidium*.

O presente estudo teve como objetivo principal a descrição do cariótipo e das particularidades cariotípicas da espécie *Crenuchus spilurus*. Considera-se que as

informações obtidas são importantes para um melhor entendimento dos processos envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais e dos autossomos das espécies de peixes que compõem a família Crenuchidae.

Material e Métodos

Foram coletados 17 indivíduos de *C. spilurus* (05 fêmeas e 12 machos) do Rio Caeté, (Pará, Brasil; S 01° 05' 07,80" W 46° 51' 44,30"). Os espécimes analisados foram previamente fixados em formalina a 10% e conservados em etanol 70% para identificação e encontram-se depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil, com o número de lote LBP 9424.

As preparações dos cromossomos mitóticos foram obtidas de células renais segundo o protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1981), sendo os exemplares anestesiados com solução de benzocaina antes do sacrifício. Na aplicação das técnicas rotineiras de citogenética de peixes, as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram detectadas utilizando Nitrato de prata, de acordo com Howell; Black (1980), enquanto o bandamento C para a localização das regiões heterocromáticas foi realizado segundo protocolo descrito por Sumner (1972).

A hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel *et al.* (1986), com a utilização de 30µl de solução de hibridação por lâmina (700ng de sonda, 50% de Formamida, 2 XSSC e 10% de Sulfato Dextrano, a 37°C por 18h). A sonda para DNAr 18S foi obtida a partir da espécie *Prochilodus argenteus*, segundo protocolo descrito por Hatanaka ; Galetti (2004), enquanto a sonda para DNAr 5S foi obtida da espécie *Leporinus elongatus*, segundo Martins ; Galetti (1999). A sonda telomérica foi obtida segundo Ijdo *et al.*, (1991). Estas sondas foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science; www.roche.com) via reação da PCR (Polymerase Chain Reaction), segundo especificações do fabricante e os sinais de hibridização foram detectados utilizando-se anti-digoxigenina-rhodamina (Roche Applied Science), sendo as preparações contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) - VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI) e analisados em um fotomicroscópio ótico (Olympus, BX61; www.olympus.com). As metáfases foram fotografadas e editadas utilizando o software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics; www.mediacy.com) e Adobe Photoshop CS4, sendo a

morfologia dos cromossomos determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964).

Resultados

As análises citogenéticas mostraram que os indivíduos da espécie *Crenuchus spilurus* apresentaram número diplóide de 38 cromossomos, segundo a fórmula cariotípica (12m + 4sm + 2st + 20a) e número fundamental igual a 56 (Figura 1). Não foram encontrados polimorfismos cromossômicos ligados ao sexo nos indivíduos analisados.

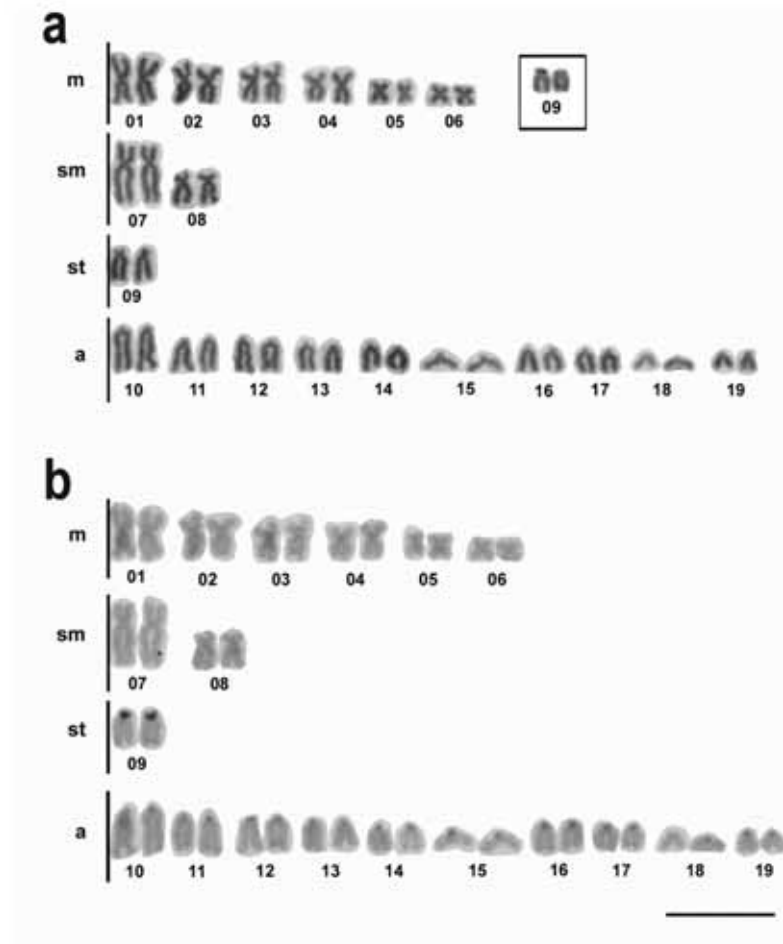


Figura 1. a) Cariótipo de exemplar de *Crenuchus spilurus* após coloração convencional por Giemsa (a), tendo em destaque o par cromossômico portador das RONS; b) cariótipo após tratamento para bandamento C. Notar a presença de blocos de heterocromatina na região pericentromérica dos cromossomos acrocêntricos e no braço curto do par 9 subtelo-cêntrico, coincidente com a região da NOR. A barra corresponde a 10 micrômetros.

A impregnação das preparações cromossômicas por nitrato de Prata evidenciou marcações terminais nos braços menores do par cromossômico subtelocêntrico número 9 (Figura 1). A análise de distribuição de heterocromatina constitutiva mostrou a presença de marcações pericentroméricas em vários cromossomos acrocêntricos, além de uma marcação conspícua nos braços menores de um par de cromossomos subtelocêntricos do par 9 (Figura 1). A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes evidenciou sítios de DNAr 18S nos braços menores do par cromossômico subtelocêntrico (par 9) (Figura 2), coincidentes com as marcações evidenciadas pela prata (Figura 1). A hibridação *in situ* utilizando a sonda de DNAr 5S evidenciou quatro regiões portadoras desse gene, com marcações em posição intersticial no par acrocêntrico 10 e em posição terminal no par acrocêntrico 13 (Figura 2). A sequência (TTAGGG)_n foi detectada nas regiões teloméricas em todos os cromossomos, sendo que o par cromossômico número dois apresentou sinais de hibridação na região pericentromérica e o par número dez apresentou marcações na região intersticial (Figura 3). Dado que as sequências teloméricas são relativamente curtas, em a visualização de sinais foi tênue em alguns cromossomos.

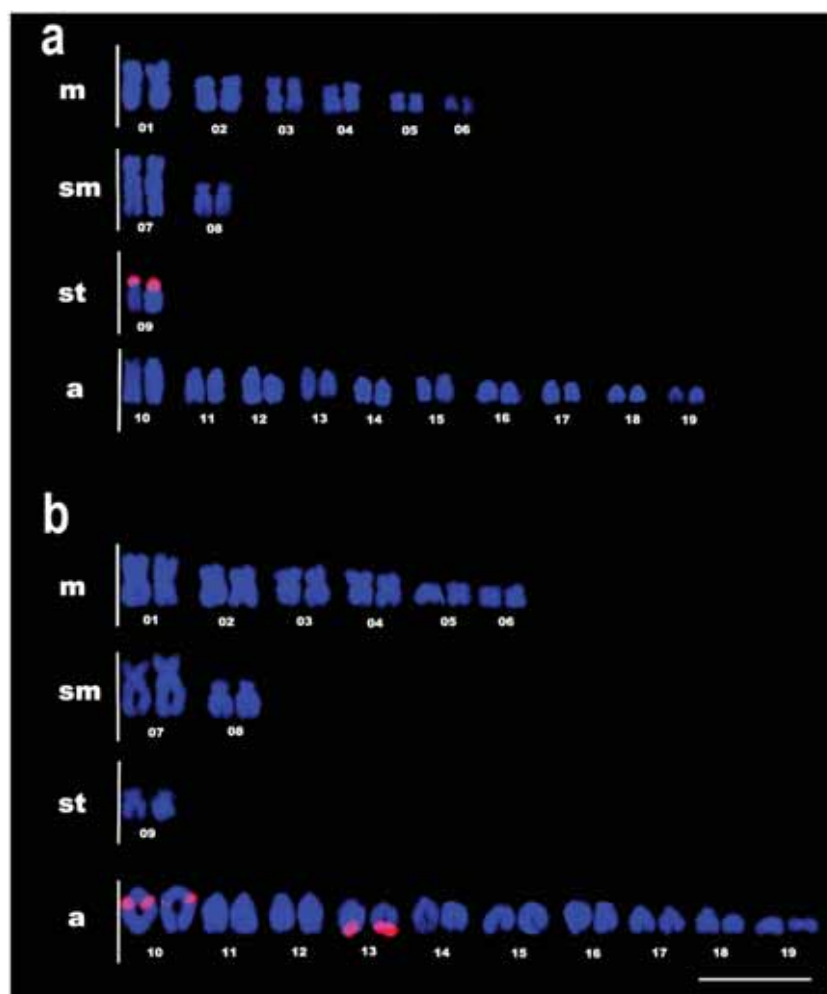


Figura 2. a) Cariótipo de *Crenuchus spilurus* mostrando a localização do DNAr 18S no braço curto do par 9 subteloentríco e, em b) cariótipo mostrando a localização dos sítios de DNAr 5S, localizados nos pares cromossômicos 10 e 13. A barra corresponde a 10 micrômetros.

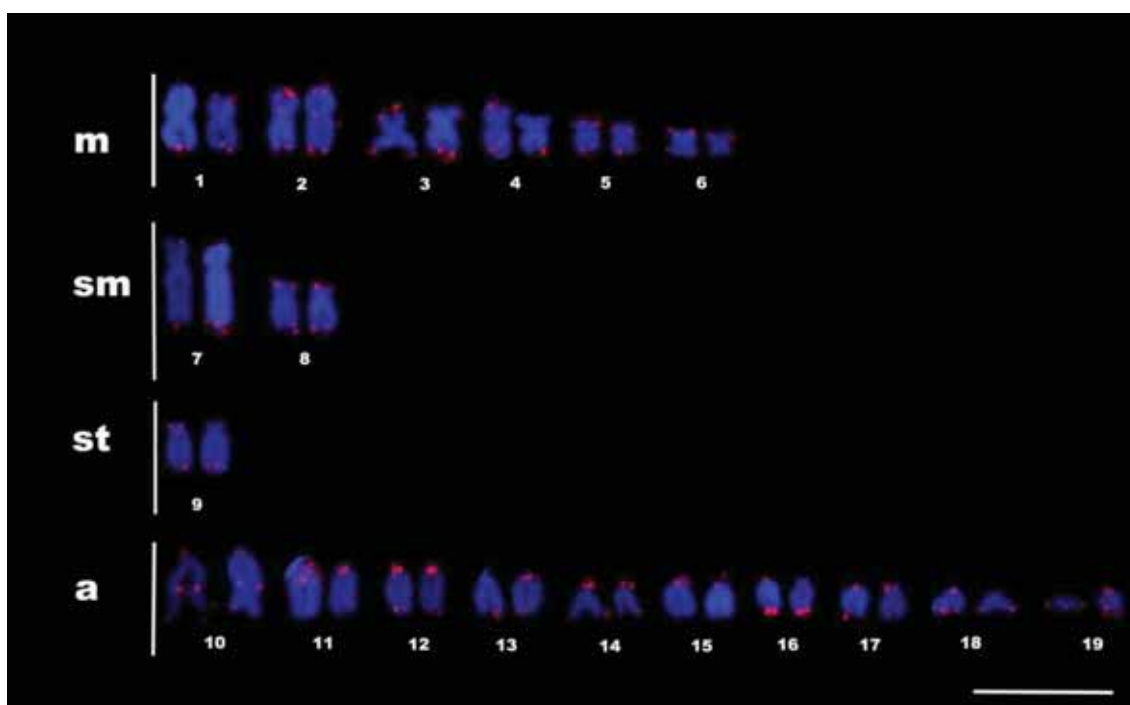


Figura 3. Cariótipo de *Crenuchus spilurus* mostrando a localização de sequências teloméricas nas regiões terminais dos cromossomos e a localização de marcações intersticiais (ITS) nos pares cromossômicos 2 e 10. A barra corresponde a 10 micrômetros.

Discussão

A espécie *Crenuchus spilurus* apresentou número diplóide de 38 cromossomos (12m + 4sm + 2st + 20a) (Figura 1), sendo que o maior par de cromossomos é um submetacêntrico. Esta espécie apresenta o menor número cromossômico já descrito para a família Crenuchidae. Quando comparada aos grupos co-familiares, verifica-se que os Characidiinae (gênero *Characidium*) apresentam 50 cromossomos, sendo a fórmula cromossômica constituída principalmente por elementos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos (Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a).

A espécie *C. spilurus* apresenta cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subteloacêntricos e acrocêntricos, mostrando diferenças quanto ao número e morfologia dos cromossomos, quando comparados os cariótipos de representantes do gênero *Characidium* e outras espécies de *Crenuchus*. Em *Characidium*, e tendo como exemplo *C. pterostictum*, nota-se a existência de um par cromossômico que oscila entre os tipos acrocêntrico e subteloacêntrico. De modo geral, os representantes do gênero *Characidium* apresentam o cariótipo composto

apenas por cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos (Pansonato-Alves *et al.*, 2010) e as diferenças observadas foram causadas possivelmente por sucessivos rearranjos que modificaram o número e a morfologia dos cromossomos desses dois grupos.

Na população de *C. spilurus* estudada foi detectada a presença de RONS simples, que se apresentaram nos braços curtos dos cromossomos do par 9 (Figura 1). Outros Crenuchidae, como encontrado entre os representantes do gênero *Characidium* também apresentam Ag-RONS simples em algumas populações (Centofante *et al.*, 2003; Silva; Maistro, 2006; Noleto *et al.*, 2009; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a), como visto em grupos de *C. cf. zebra* (Pansonato-Alves *et al.*, 2011b). Contudo, entre representantes deste mesmo gênero, como no caso de uma população de *Characidium cf. gomesi* estudada por Vicari *et al.* (2008), é descrita a ocorrência de sete cromossomos portadores das Ag-RONS, do mesmo modo que em *Characidium lauroi* que possui quatro cromossomos com sítios de Ag-RONS (Centofante *et al.*, 2003). Além disso, ocorrem espécies neste gênero que apresentam as Ag-RONS nos cromossomos do par heteromórfico sexual, como descrito por Pansonato-Alves *et al.* (2010) em *C. cf. gomesi* e em *C. lanei* por Noleto *et al.* (2009), fato este não observado em *C. spilurus*.

Os exemplares analisados de *Crenhuchus spilurus* apresentaram o par cromossômico número nove portador de sítios de DNAr 18S (Figura 2), do mesmo modo como é comum encontrar entre os representantes do gênero *Characidium*. Neste gênero, a presença de sítios de DNAr 18S ocorre apenas em um par cromossômico, conforme descrito em *C. lanei* (Noleto *et al.*, 2009) e *C. cf. gomesi* (Pansonato-Alves *et al.*, 2011a). Contudo, Vicari *et al.* (2008) relatam a ocorrência de cinco pares cromossômicos portadores destes sítios em indivíduos analisados em outra população de *C. cf. gomesi*. Nos indivíduos da população de *C. spilurus* analisada, o DNAr 18S foi localizado em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S, corroborando uma situação bastante comum em vertebrados na qual esses dois genes possivelmente seguem padrões evolutivos independentes (Lucchini *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2009).

Em muitos vertebrados, o gene ribossomal 5S está localizado em apenas um par cromossômico (Suzuki *et al.*, 1996; Makinem *et al.*, 1997). Em anfíbios (Schimid

et al., 1987; Lucchini *et al.*, 1993) e peixes (Mazzei *et al.*, 2004; Nirchio; Oliveira, 2006), este gene pode ser detectado em um ou em vários pares cromossômicos. Em *C. spilurus* foram observados dois pares cromossômicos portadores de sítios de DNAr 5S (pares 10 e 13) (Figura 2). Já para gênero *Characidium* é descrita a presença de um par portador de DNAr 5S em *C. cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008) e em *C. lanei* (Noletto *et al.*, 2009), sendo que, ao analisarem indivíduos de outra população de *C. cf. gomesi*, Pansonato-Alves *et al.* (2011a) descrevem a presença de dois pares cromossômicos portadores deste sítiosgênicos. Variações do DNAr 5S podem ocorrer devido à presença de pseudogenes, inserções, deleções e mini repetições e estes segmentos genômicos têm sido frequentemente caracterizados em vários organismos (Suzuki *et al.*, 1996; Sadjak *et al.*, 1998; Alves-Costa *et al.*, 2006).

Estudos realizados anteriormente empregando a técnica de bandamento C mostraram que algumas espécies de peixes (Gold *et al.*, 1990), bem como de outros animais (Sumner, 1990), possuem bandas heterocromáticas em quantidades diferentes, distribuídas principalmente nas regiões centroméricas ou terminais dos cromossomos e menos frequentemente em posição intersticial (Weiler; Wakimoto, 1995; Oliveira; Wright, 1998). Os indivíduos da população de *C. spilurus* analisados apresentam blocos heterocromáticos na região pericentromérica da maioria dos cromossomos acrocêntricos e no braço menor do par 9 (Figura 1). Exemplos do gênero *Characidium* possuem blocos de heterocromatina constitutiva localizadas nas regiões pericentromérica, centroméricas e regiões terminais (Maistro *et al.*, 1998, 2004; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Silva; Maistro, 2006), além do cromossomo W que se apresenta totalmente heterocromático em *C. cf. gomesi*, *C. lanei*, *C. schubarti*, *C. pterostictum* e *C. oiticai* (Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2010, 2011a).

A sequência TTAGGG é uma sequência conservada e presente principalmente na região telomérica dos cromossomos dos vertebrados (Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008). Contudo, além da localização na região dos telômeros, muitas espécies de vertebrados apresentam sítios teloméricos intersticiais (ITS), sendo que em muitos casos, a presença destas sequências está relacionada com eventos de rearranjos cromossômicos (Meyne *et al.*, 1990). Em decorrência disto, a

identificação e localização das sequências teloméricas tem sido utilizada em estudos de evolução cariotípica em várias espécies de vertebrados (Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008). A observação de *ITS* nos pares dois e dez de *C. spilurus* (Figura 3) sugere a ocorrência de fusões nestes pares cromossômicos e não pode ser descartado o fato de que tenham ocorrido outros eventos de fusão que, contudo, não foram detectadas pela hibridação *in situ* devido à perda ou modificação das regiões teloméricas durante o processo de fusão cromossômica.

Vários eventos promotores de modificações na estrutura dos cromossomos parecem atuar no processo de diversificação dos cariótipos das espécies da família Crenuchidae (*Crenuchus* e *Characidium*) com cariótipos conhecidos, como a presença e ausência de cromossomos sexuais, diferentes posições de regiões ricas em heterocromatina constitutiva, mudanças na forma e número dos cromossomos. As diferenças observadas entre o cariótipo da espécie *C. spilurus* quando comparado com os cariótipos das espécies alocadas no gênero *Characidium* mostram a necessidade de mais estudos para levantar informações cromossômicas de representantes dos demais gêneros pouco estudados, com vistas a um melhor entendimento dos processos evolutivos ocorridos na família Crenuchidae.

5 - Considerações finais

Entre a grande diversidade de espécies de peixes da região Neotropical, algumas espécies apresentam cromossomos sexuais diferenciados (Andreatta *et al.*, 1993; Almeida Toledo; Foresti, 2001; Oliveira *et al.*, 2009; Cioffi *et al.*, 2012 entre outros), sendo que algumas possuem cromossomos sexuais com origem comum em espécies pertencentes a um mesmo gênero, como ocorre entre os representantes dos gêneros *Tripotheus* e *Leporinus* (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008ab; Marreta *et al.*, 2012). Os padrões comparativos obtidos das análises realizadas com cromossomos sexuais de tres espécies de peixes do gênero *Characidium*, *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp. sugerem que os cromossomos Z e W são homeólogos. Por outro lado, os indivíduos analisados de *C. cf. zebra* e *C. cf. lagosantense* não apresentaram pares cromossômicos com qualquer diferenciação morfológica, sugerindo que o processo de diferenciação dos cromossomos Z e W parece ter ocorrido em um ancestral muito relacionado ao grupo *C. cf. zebra*, após a separação dos dois grupos identificados pelos cariótipos de *C. cf. gomesi* e *C. cf. zebra*. A ausência de cromossomos sexuais diferenciados na amostra de *Crenuchus spilurus* analisada também parece reforçar a possibilidade da diferenciação dos cromossomos sexuais ter ocorrido em exemplares alocados no gênero *Characidium*. A presença de regiões eucromáticas nos cromossomos Z, com excessão do bloco conspícuo de heterocromatina característico da região pericentromérica destes cromossomos e a marcante presença de um cromossomo W totalmente heterocromatinizado em *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* e *Characidium* sp., sugerem poucas possibilidades de recombinação entre os cromossomos Z e W nestas espécies ou, caso ocorra, esta pode se apresentar bastante restrita. A ausência ou a diminuição do grau de recombinação entre os cromossomos sexuais (Z e W ou X e Y) vêm sendo propostas como um dos passos iniciais da separação entre os pares homomórficos que levariam ao aparecimento de pares cromossômicos heteromórficos. Contudo, o conhecimento das causas que levam à formação de cromossomos sexuais em algumas espécies e não em outras, mesmo sendo estas algumas vezes bastante relacionadas filogeneticamente, ainda constitui questão em estudo.

As sequências CgW1, CgW2, CgW4, CgW6, CgW9, CgW13 e CgW34 isoladas do cromossomo W de *Characidium* cf. *gomesi* não apresentaram similaridade com sequências previamente conhecidas, quando comparadas àquelas existentes nos bancos de dados GenBank e Giri, como já descrito para outras sequências oriundas de cromossomos sexuais em espécies de peixes como *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.*, 1994; Parisi-Maltempo *et al.*, 2007), *Oryzias hubbasi* (Takehana *et al.*, 2012) e em outros organismos como a mariposa *Cydia pomonella* (Fuková *et al.*, 2007). A inexistência de similaridade entre as sequências isoladas no presente trabalho e aquelas descritas na literatura apresenta-se como um reforço para a proposição de que os cromossomos sexuais em peixes podem apresentar origens distintas (Volff, 2005; Volff *et al.*, 2007). A ausência da sequência CgW4 nas regiões eucromáticas dos cromossomos Z em *C. cf. gomesi* sugere a ausência ou diminuição do grau de recombinação entre os cromossomos Z e W nestas espécies, aparecendo como um dos passos necessários para a diferenciação dos cromossomos sexuais. O cromossomo W de *C. cf. gomesi* aparentemente também é formado por diferentes sequências de DNA.

A sonda DCg e a sonda elaborada da sequência CgW4 apresentaram hibridação com segmentos dos cromossomos Z, W e B em *C. cf. gomesi*, evidenciando uma possível origem dos cromossomos supranumerários a partir dos cromossomos sexuais nestes exemplares analisados. O compartilhamento de sequências entre cromossomos sexuais e cromossomos B é descrito em várias espécies, tendo já sido observado em ratos (Rubtsov *et al.*, 2004), gafanhotos (Rubtsov *et al.*, 2004, 2007; Teruel *et al.*, 2009a) e peixes (Jesus *et al.*, 2003), entre outros organismos. Neste estudo é sugerido que o cromossomo B presente nos indivíduos analisados teria uma possível origem a partir de fragmentos dos cromossomos sexuais Z e W, de modo semelhante ao proposto por Teruel *et al.* (2009a) para a espécie de gafanhoto *Locusta migratoria*.

Os indivíduos analisados da espécie *Crenuchus spilurus* apresentaram o menor número cromossômico até agora descrito para a família Crenuchidae, com fórmula cariotípica composta por cromossomos de todos os tipos morfológicos, diferentemente do que ocorre entre os representantes do gênero *Characidium*. As RONS foram caracterizadas em apenas um par cromossômico subtelocêntrico nesta espécie, sendo que os sítios de DNAr 18S identificados por FISH mostraram-se

coincidentes com as marcações identificadas pela técnica de Ag-RONs. Dois pares de cromossomos acrocêntricos foram identificados como portadores de sítios de DNA 5S nos pares 10 e 13, que não apresentaram sintonia com as regiões 18S. Nesta espécie, diferentemente dos representantes do gênero *Characidium*, as regiões heterocromáticas foram observadas no braço curto do par subtelocêntrico número nove e nas regiões pericentroméricas dos cromossomos acrocêntricos, não tendo sido observados polimorfismos ligados ao sexo. Além disso, a presença de marcações intersticiais (*ITS*) nos pares cromossômicos dois e dez, obtidas pela aplicação de sondas repetitivas teloméricas, revelam a possibilidade de ocorrência de fusões cromossômicas durante o processo de diversificação cariotípica. desta espécie.

Considera-se que estudos envolvendo representantes dos outros gêneros da família Crenuchidae seriam de grande ajuda para um melhor entendimento dos processos envolvidos na evolução dos cromossomos dessa família, tendo em vista as diferenças cariotípicas observadas entre as espécies destes gêneros. Tal constatação tem por base o fato de que a maioria dos cariótipos conhecidos e já descritos nesta família caracteriza espécies do gênero *Characidium*.

6 – Referências

- ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguaçú basin. **Cytologia**, v.66, p. 299-306, 2001.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4692-4693, 1997.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; DANIEL-SILVA, M. F.; MOYSES, C. B.; FONTELES, S. B.; LOPES C. E.; AKAMA, A.; FORESTI, F. Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 99, p. 164-169, 2002.
- ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Complex Sex Chromosome System In *Eigenmannia* sp (Pisces, Gymnotiformes). **Genetica**, v. 64, p. 165-169, 1984.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphological differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. **Genetica**, 111, p. 91-100, 2001.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; DANIEL, M. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**, 109, p. 197-200, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, p. 403-410, 1990.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v.128 p. 1-9, 2006.
- ALVES-COSTA, F. A., WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; C. MARTINS. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. **Genetica**, v. 127, p. 243-252, 2006.

- AMARO-GHILARDI, R. C.; SILVA, M. J. J.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetica**, v. 134, p. 159–168, 2008.
- ANDREATA, A. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricaridae): ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterocromatin differentiation in *Microlepdogaster leucofrenatus*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 63, p. 215-220, 1993.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, v. 89, p. 15-19, 2002.
- ARTONI, R. F.; FALCÃO, J. N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research**, v. 9, p. 449-456, 2001.
- ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v. 63, p. 421-425, 1998.
- BAKKALI, M.; CAMACHO, J. P. M. The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. III. Mutation rate of B chromosomes. **Heredity**, v.92, p.428–433, 2004.
- BAROILLER, J. F.; D’COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology part C Toxicology & Pharmacology**, v. 130, p. 399–409, 2001.
- BATES, G. P.; WAINWRIGHT, B. J.; WILLIAMSON, R.; BROWN, S. D. M. Microdissection and microclonning from the short arm of human chromosome 2. **Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 3826-3830, 1986.

- BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLARO, Z. I. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 60, p. 60-63, 1992.
- BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; GANG, J. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499, 1997.
- BERTOLLO, L. A. C.; MESTRINER, C. A. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. Meiotic analysis. **Chromosome Research**, v. 6, p. 141-147, 1998.
- BI, K.; BOGART, J. P. Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Cytogenetic and Genome Research**, 112: 307–312, 2006. doi: 10.1159/000089885
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, 443, p. 521–524, 2006.
- BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 596-600, 1999.
- BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçú. **Hereditas**, v. 140, p. 201-209. 2004.
- BUCKUP, P. A. Family Crenuchidae (South American darters). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 87-95.
- BUCKUP, P. A. Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in Neotropical characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi). **Cladistics**, v. 9, p. 305-341, 1993a.

- BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, 1998. p. 123-144.
- BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (eds.). **Ecologia de peixes de riachos brasileiros**. Rio de Janeiro, PPGE-UFRJ, 1999. p. 91-138.
- BUCKUP, P. A. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoological Journal of the Linnean Society London**, v. 108, p. 224-245, 1993b.
- BUCKUP, P. A.; HAHN, L. *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. **Copeia**, v. 1, p. 150-155, 2000.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007. p. 195.
- BUGROV, A. G.; KARAMYSHEVA, T. V.; PEREPELOV, E. A.; ELISAPHENKO, E. A.; RUBTSOV, D. N.; WARCHALOWSKA-SLIWA, E.; TATSUTA, H.; RUBTSOV, N. B. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi Storozh*. (Orthoptera, Acrididae). **Chromosome Research**, v. 15, p. 315-325, 2007.
- BUGROV, A. G.; KARAMYSHEVA, T. V.; RUBTSOV, D. N.; ANDREENKOVA, O. V.; RUBTSOV, N. B. Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 106, p. 284-288, 2004.
- BULL, J. J. **Evolution of sex determining mechanisms**. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1983. p. 248-269.
- CAMACHO, J. P.; SCHMID, M.; CABRERO, J. B chromosomes and sex in animals. **Sexual Development**, v. 5, p. 155-166, 2011.

- CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: GREGORY, T. R. (ed.). **The evolution of the genome**. San Diego: Elsevier, 2005. p. 223-286.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 355, p. 163-178, 2000.
- CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G.; CAPUTO, V.; CANAPA, A.; OLMO, E., Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. **Gene**, v. 295, p. 193–198, 2002.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; BUCKUP, P. A.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, v. 138, p. 213-218, 2003.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. A ZZ-ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 55, p. 139-150, 2002.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, p. 253-260, 2001.
- CERMAK, T.; KUBAT, Z.; HOBZA, R.; KOBLIZKOVA, A.; WIDMER, A.; MACAS, J.; VYSKOTAND, B.; KEJNOVSKY, E. Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 16, p. 961–976, 2008.
- CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. **Science**, v. 251, p. 1030-1033, 1991.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, p. 118–128, 2005.

- CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKÝ, E.; MARQUINOI, V.; POLTRONIERI, J.; MOLINA, F. W.; DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, p. 28, 2012b. doi:10.1186/1755-8166-5-28
- CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2 Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity**, v. 105, p. 554-561, 2010.
- CIOFFI, M. B.; CAMACHO, J. P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 132, p. 188–194, 2011.
- CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, v. 10, p. 34–44, 2009.
- CIOFFI, M. B.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., BERTOLLO, L. A. C. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, 80, P. 2125–2139, 2012.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ZUANON, M. B. A. J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301-306, 2007.
- DENG, H. X.; YOSHIURA, K. I.; DIRKS, R. W.; HARADA, N.; HIROTA, T.; TSUKAMOTO, K.; JINNO, Y.; NIIKAWA, N. Chromosome band specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. **Human Genetics**, v. 89, p. 13-17, 1992.
- DEVLIN, R. H., MCNEIL, B. K.; SOLAR, I.; DONALDSON, E. M. A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. **Aquaculture**, v. 128, p. 211–220, 1994.

- DEVLIN, R. H.; BIAGI, C. A.; SMAILUS, D. E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. **Genetica**, v. 111, p. 43–58, 2001.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.
- DEVLIN, R. H.; STONE, G. W.; SMAILUS, D. E. Extensive direct-tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y chromosome of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 277–287, 1998.
- DINIZ, D.; LAUDICINA, A. CIOFFI, M. B.; BERTOLLO L. A. C. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triplotheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 122, p. 163-168, 2008b.
- DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO L. A. C. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triplotheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica**, p. 133, v. 85-91, 2008a.
- DU, H.; ROY, A. L.; ROEDER, R. G. Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the AdML promoters. **The EMBO Journal**, v. 12, p. 501–511, 1993.
- EPPLEN, J. F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequence in chromosomal DNA. In: SOBTI, R.C.; OBE, G.; ATHWAL, R.S. (eds.). **Some aspects of chromosome structure and functions**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2002. p 1-10.
- ERLANDSSON, R.; WILSON, J. F.; PÄÄBO, S. Sex chromosomal transposable element accumulation and male driven substitutional evolution in humans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 804–812, 2000.
- EZAZ, T.; SARRE, S.D.; O'MEALLY, D.; MARSHALL-GRAVES, J. A.; GEORGES, A. Sex Chromosome Evolution in Lizards: Independent Origins and Rapid Transitions. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 127, p. 249–260, 2009.

- EZAZ, T.; STIGLEC, R.; VEYRUNES, F.; MARSHALL-GRAVES, J. A. Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. **Current Biology**, v. 16, p. 736-743, 2006.
- FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A. U.; SCALZI-MARTIN, J.; HOZIER, J.; MOREIRA-FILHO, C. A.; YONENAGA-YASSUDA, Y. XY translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 88, n. 1-2, p. 124-9, 2000.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; SANTOS, A. F. Biological aspects of amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genome**, v. 20, p. 1-4, 1987.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, v. 81, p. 193-198, 1990.
- FERREIRA, D. C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. **Mobile Genetic Elements**, v. 1(2), p. 1-6, 2011.
- FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelations of the Osthariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, p. 297-353, 1981.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.31, p. 137-144, 1981.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S. A. Supranumerary chromosome system C-banding pattern characterization and multiple Nucleolus Organizing Region in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, p. 107–114, 1989.
- FRICKE, H.; FRICKE, S. Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. **Nature**, v. 266, p. 830–832, 1977.

- FUKOVÁ, I.; TRAUT, W.; VÍTKOVÁ, M.; NGUYEN, P.; KUBÍČKOVÁ, S.; MAREC, F. Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, p. 116, n. 2, p. 135-145, 2007.
- GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 43, p. 43-46, 1986.
- GALETTI JR., P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375-382, 1995.
- GOLD, J. R.; LI, C. Y.; SHIPLEY, N.S.; POWERS, P.K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal Fish Biology**, v.37, p. 563-575, 1990.
- GRAVES, J. A. M. Sex Chromosome Specialization and Degeneration in Mammals. **Cell**, v. 124, p. 901-914, 2006.
- GREEN, D. M.; ZEYL. C. W.; SHARBEL, T. F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 6, p. 417-441, 1993.
- GUBBAY, J.; COLLIGNON, J.; KOOPMAN, P.; CAPEL, J.; ECONOMOU, A. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 346, p. 245-250, 1990.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARVEY, S. C.; MASABANDA, J.; CARRASCO, L. A.; BROMAGE, N. R.; PENMAN, D. J.; GRIFFIN, D. K. Molecular cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex chromosome differentiation. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 97, n. 1-2, p. 76-80, 2002.

- HASHIMOTO, D. T.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Genetica**, v. 137, p. 135–140, 2009.
- HASHIMOTO, D. T.; VOLTOLIN, T. A.; PAES, A. D. N. V. A.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 141–151, 2012.
- HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.
- HENNING, F.; TRIFONOV, V.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.. Use of Chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. **Genetics and Molecular Biology**. V. 31, n.1 (supplement), p. 279-283, 2008a
- HENNING, F.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 121, p. 55–58, 2008b.
- HEWITT, G. M. **Orthoptera: Grasshoppers and crickets**. **Animal Cytogenetics**. Vol. 3. Berlin Stuttgart: Gebrüder Borntrager, 1979. p. 170.
- HOCHBERG, V. B. M.; ERDTMANN, B. Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Revista Brasileira de Genetica*, v. 11, p. 563-576, 1988.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experimentia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

- HU, L.; SHAM, J. S.; TJIA, W. M.; TAN, Y. Q.; LU, G. X.; GUAN, X. Y. Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. **Genomics**, v. 83, n. 2, p. 298-302, 2004.
- IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 19(17), p. 4780, 1991.
- ITURRA, P.; MEDRANO, J. F.; BAGLEY, M.; LAM, N.; VERGARA, N.; MARIN, J. C. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout. **Genetica**, v. 101, p. 209–213, 1998.
- JESUS, C. M.; GALETTI JR, P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, p. 25-32, 2003.
- JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 11, p. 75-80, 2000.
- JONES, R. N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 417–423, 2003;
- KARAMYSHEVA, T. V.; ANDREENKOVA, O. V.; BOCHKAEREV, M. N.; BORISSOV, Y. M.; BOGDANCHIKOVA, N.; BORODIN, P. M.; RUBTSOV, N. B. B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 96, p.154–160, 2002.
- KAWAGOSHI, T.; NISHIDA, C.; MATSUDA, Y. The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines). **Chromosome Research**, v. 20, p. 95–110 2012.
- KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMÁK, T.; KUBÁT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, p. 533–541, 2009.

- KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.
- KOEHLER, M. R.; HAAF, T.; GUTTENBAC, M.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. **Chromosome Research**, v. 5, p. 325-33, 1997.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, v. 52. p. 201–220, 1964
- LI, Y. C.; CHENG, Y. M.; HSIEH, L. J.; RYDER, O. A.; ANG, F.; LIAO, S. J.; HSIAO, K. M.; TSAI, F. J.; TSAI, C. H.; LIN, C. C. Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. **Chromosoma**, v. 114, n. 1, p. 28-38, 2005.
- LI, Y. C.; KORD, A. B.; FAHIMA, T.; BERLES, A.; NERO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- LIEW, W. C.; BARTFAI, R.; LIM, Z.; SREENIVASAN, R.; SIEGFRIED, K. R.; ORBAN, L. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. **Plos One**, v. 7(4), p. 1-12, 2012.
- LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 289, p. 317-324, 2001.
- LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, 36: 762–773, 1993.
- LUDECKE, H. J.; SENGER, G.; CLAUSSEN, U.; HORSTHEMKE, B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. **Nature**, v. 338, p. 348-350, 1989.

- MACHADO, T. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; PUCCI, M. B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**, v. 12, p. 65, 2011.
- MADALENA, C. R. G.; GORAB, E. A chromosome end satellite of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) resembling nematoceran telomeric repeats. **Insect Molecular Biology**, v. 14, p. 255–262, 2005.
- MADSEN, C. S.; DE KLOET, D. H.; BROOKS, J. E.; DE KLOET, S. R. Highly repeated DNA sequences in birds: the structure and evolution of an abundant, tandemly repeated 190-bp DNA fragment in parrots. **Genomics**, v. 14, p. 462–469, 1992.
- MAISTRO, E. L.; JESUS, C. M.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of A, B chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). **Cytologia**, v. 69, p. 181-186, 2004.
- MAISTRO, E. L.; MATA, E. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica**, v. 104, p. 1-7, 1998.
- MÄKINEM, A.; ZIJLSTRA, C.; DE HAAN, N. A.; MELLINK, C. H. M.; BOSMA, A. A. Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence *in situ* hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 78, p. 231-235, 1997.
- MANK, J. E.; PROMISLOW, D. E. L.; AVISE, J. C. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 83–93, 2006.
- MARCHAL, J. A.; ACOSTA, M. J.; BULLEJOS, M.; PUERMA, E.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. Distribution of L1-retrotransposons on the giant sex

- chromosomes of *Microtus cabreræ* (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. **Chromosome Research**, v. 14, p. 177–186, 2006.
- MARCHAL, J. A.; ACOSTA, M. J.; NIETZEL, H.; SPERLING, K.; BULLEJOS, M.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. **Chromosome Research**, v.12, n. 8, p. 767-776, 2004.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus Kner*, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 289–300, 2011.
- MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of Fish Biology**, v. 80, n. 3, p. 630-637, 2012.
- MARTINS, C.; GALETTI, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7 n. 5, p. 363-367, 1999.
- MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; UMEHARA, C. N.; AGATA, K.; MATSUDA, Y. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and stepwise differentiation of snake sex chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 18190–18195, 2006.
- MATSUDA, M. Sex Determination in the Teleost Medaka, *Oryzias latipes*. **Annual of Review of Genetics**, v. 39, p. 293-307, 2005. doi: 10.1146/annurev.genet.39.110304.095800
- MATSUDA, M.; KUSAMA, T.; OSHIRO, T.; KURIHARA, Y.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. **Genes & Genetic Systems**, v. 72, p. 263–268, 1997.
- MATSUDA, M.; NAGAHAMA, Y.; SHINOMIYA, A.; SATO, A.; MATSUDA, C.; KOBAYASHI, T.; MORREY, C. E.; SHIBATA, N.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.;

- HORIK, H.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. **Nature**, v. 417, p. 559–563, 2002.
- MAZZEI, F.; GHIGLIOTTI, L.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, J. P.; OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E. Chromosomal patterns of major 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae). **Polar Biology**, v. 28, p. 47-55, 2004.
- MELTZER, P. S.; GUAN, X. Y.; BURGESS, A.; TRENT, J. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nature Genetics**, v. 1, p. 24-28, 1992.
- MELTZER, P. S.; GUAN, X. Y.; SU, A. S.; GRACIA, E.; TRENT, J. M. Identification of region specific genes by chromosome microdissection. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 93, p. 29-32, 1997.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI JR, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R.G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1–9, 2000.
- MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD, O. A.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L.; MOYSIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, p. 3–10, 1990.
- MIYAZAWA, C. S.; GALETTI JR., P. M. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). **Cytologia**, v. 59, p. 73-79, 1994.
- MOLINA, W.; SCHMID, M.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, v. 94, p. 141-149, 1998.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, JR., P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, v. 46, p.115-125, 1993.

- MÜHLMANN-DIAZ, M. C.; ULSH, B. A.; WHICKER, F. W.; HINTON, T. G.; CONGDON, J. D.; ROBINSON, J. F. Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 92, n. 1-2, p. 139-43, 2001.
- NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZWZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, p. 31–39, 1994.
- NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M.; SCHRÖDER, J. H.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J.T. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **Journal of Molecular Evolution**, v. 30, p. 456–462, 1990.
- NANDA, I.; SCHARTL, M.; EPPLEN, J. T.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M. Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 301–308, 1993.
- NANDA, I.; SCHARTL, M.; FEICHTINGER, W.; EPPLEN, J. T.; SCHMID, M. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chromosoma**, v. 101, p. 301–310, 1992.
- NANDA, I.; VOLFF, J. N.; WEIS, S.; KORTING, C.; FROSCHAUER, A.; SCHMID, M.; SCHARTL.; M. Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. **Chromosoma**, v. 109, p. 173–180, 2000.
- NASCIMENTO, J.; QUINDERÉ, Y. R. S. D.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; LIMA, J. R. F.; LOURENÇO, L. B. Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, v. 138, p. 1127-1132, 2010.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**. Fourth ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 539.
- NEUSSER, M.; MÜNCH, M.; ANZENBERGER, G.; MÜLLER, S. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related

- Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 108, p. 191-196, 2005.
- NIEVES, M.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M. D. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 675-683, 2005.
- NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. Venezuela: Universidad de Oriente, 2006. p. 216.
- NISHIOKA, Y.; DOLAN, B. M.; ZAHED, L. Molecular characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence amplified in distantly related species in the genus *Mus*. **Genome**, v. 36, p. 588–593, 1993.
- NOLETO, R. B.; AMORIM, A. P.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 448–453, 2009.
- NUNTAKARN, L.; MEVATEE, U.; WITHYACHUMNARNUNKUL, B.; LEARDKAMOLKARN, V.; FUCHAREON, S. Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. **Science Asia**, v. 28, p. 1-9, 2002.
- OHNO, S. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. New York: Springer, 1967. p. 192.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAAPPOOR, B.G. (eds.). **Fish Citogenetics**. USA: Science Publisher, 2006. p.111-152.

- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 35, p. 81–100, 2009.
- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Research**, v. 6, p. 205-2011, 1998.
- OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KÖRTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, J. P.; VOLFF, J. N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2004.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34 (2), p. 208-213, 2011b.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; PAIVA, L. R. S.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 77-86, 2010.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; VICARI, M. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei: Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**, v. 78, p. 183-194, 2011a.
- PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 116, p. 218–223, 2007.
- PHILLIPS, B.; KONKOL, N. R.; REED, K. M.; STEIN, J. D. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus* (Salmonidae). **Genetica**, v. 111, p. 119-123, 2001.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934–2938, 1986.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3º ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 699.
- POULTER, R. T.; GOODWIN, T. J.; BUTLER, M. I. Vertebrate helitrons and other novel Helitrons. **Gene**, v. 313, p. 201–212, 2003.
- PRICE, D. J. Genetics of sex determination in fishes: A brief review. In: POTTS, G. W.; WOOTON, R. J. (eds.). **Fish Reproduction: Strategies and Tactics**. London: Academic Press, 1984. p. 77-89.
- RAMPIN, M.; BI, K.; BOGART, J. P.; COLLARES-PEREIRA, M. J. Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using Genomic *In Situ* Hybridization (GISH). **Comparative Cytogenetics**, v. 6(3), p. 287–300, 2012. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i3.3543
- REED, K. M.; BOHLANDER, S. K.; PHILLIPS, R. B. Microdissection of the Y chromosome and fluorescence *in situ* hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosome Research**, v. 3, p. 221-226, 1995.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. **Check List of freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 742.
- ROSA, R.; BELLAFRONTI, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica**, v. 128, p. 159-166, 2006.
- ROSS, J. A.; URTON, J. R.; BOLAND, J.; SHAPIRO, M. D.; PEICHEL, C. L. Turnover of Sex Chromosomes in the Stickleback Fishes (Gasterosteidae). **Plos Genetics**, v. 5(2), e1000391, 2009. doi:10.1371/journal.pgen.1000391
- RUBTSOV, N. B.; KARAMYSHEVA, T. V.; ANDREENKOVA, O. V.; BOCHKAEREV, M. N.; KARTAVTSEVA, I. V.; ROSLIK, G. V.; BORISSOV, Y. M. Comparative

- analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 106, p. 289-294, 2004.
- SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; TRAUT, W. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. **Chromosome Research**, v. 20, p. 83–94, 2012. doi 10.1007/s10577-011-9262-z
- SAIFITDINOVA, A. F.; DERJUSHEVA, S. E.; MALYKH, A. G.; ZHUROV, V. G.; ANDREEVA, T. F.; GAGINSKAYA, E. R. Centromeric tandem repeat from the chaffinch genome: isolation and molecular characterization. **Genome**, v. 44, p. 96–103, 2001.
- SAJDAK, S. L.; REED, K. M.; PHILLIPS, R. B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 6, p. 680-688, 1998.
- SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50-56, 1992.
- SCAVONE, M. D.; JULIO JR., H. F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish, *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae, Siluriformes). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 18, p. 31-35, 1995.
- SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of Neotropical cascudinhos (Siluroide: Loricariidae). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 375-400.
- SCHARTL, M. A. Comparative view on sex determination in medaka. **Mechanisms of Development**, v. 121, p. 639–645, 2004.
- SCHARTL, M. A. Sex chromosomal restriction-fragment-length marker linked to melanoma-determining Tu loci in *Xiphophorus*. **Genetics**, v. 19, n. 3, p. 679–685, 1988.

- SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; SCHÜHLI, G. S.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 11-12, p. 1499-1508, 2011.
- SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v. 95, p. 271-284, 1987.
- SCHUELER, M. G.; HIGGINS, A. W.; RUDD, M. K.; GUSTASHAW, K.; WILLARD, H. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, v. 294, p. 109–115, 2001.
- SENGER, G.; LUDECKE, H. J.; HORSTHEMKE, B.; CLAUSSEN, U. Microdissection of banded human chromosomes. **Human Genetics**, v. 84, p. 507-511, 1990.
- SHARBEL, T. F.; GREEN, D. M.; HOUBEN, A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome evolution. **Genome**, v. 41, p. 14-22, 1998.
- SHIBATA, F.; HIZUME, M.; KUROKI, Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. **Chromosoma**, v. 108, p. 266–270, 1999.
- SILVA, A. R.; MAISTRO, E. L. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado river, Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 459-463, 2006.
- SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, p. 240–244, 1990.
- SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, v. 76, p. 67-112, 1982.

- SINGH, L.; PURDOM, I. F.; JONES, K. W. Satellite DNA and evolution of sex chromosome. **Chromosoma**, v. 59, p. 43–62, 1976.
- SINGH, M.; KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; KUSHWAHA, B.; GOND, I.; LAKRA, W. S. Chromosomal localization of 18S and 5S rDNA using FISH in the genus *Tor* (Pisces, Cyprinidae). **Genetica**, v. 137, p. 245–252, 2009.
- SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; BROWN, L. G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, p. 825-837, 2003.
- SOLARI, A. J. Sex chromosomes and sex determination in fishes. In: SOLARI, A. J. (ed.). **Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates**. Tokyo: CRC Press, 1994. p. 233–247.
- STEIN, J.; REED, K. M.; WILSON, C. C.; PHILLIPS, R. A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 64, p. 211-216, 2002.
- STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 7591–7595, 1992.
- STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Y chromosomes: born to be destroyed. **BioEssays**, v. 27, p. 1076– 1083, 2005.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. **Chromosome Banding**. London: Academic Division of Unwin Hyman, 1990. p. 434.
- SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 72, p. 1–4, 1996.
- TAGUCHI, T.; AKIMARU, K.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; MWENDA, J. M.; TAGUCHI, K. Y. A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y

- chromosome evolution in Old World monkeys. **Chromosome Research**, v. 11, n. 2, p. 147-52, 2003.
- TAKEHANA, Y.; NARUSE, K.; ASADA, Y.; MATSUDA, Y.; SHIN, I. T.; KOHARA, Y.; FUJIYAMA, A.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of medaka fishes. **Chromosome Research**, v. 20, p. 71–81, 2012.
- TAKEHANA, Y.; NARUSE, K.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. **Chromosoma**, v. 116, p. 463-470, 2007.
- TAKEHANA, Y.; NARUSE, K.; SAKAIZUMI, M.; Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Beloniformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 417–428, 2005.
- TERUEL, M.; CABRERO, J.; MONTIEL, E. E.; ACOSTA, M. J.; SÁNCHEZ, A.; CAMACHO, J. P. M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, v. 17, p. 11-18, 2009a.
- TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, v. 118, p. 291–301, 2009b.
- TRASK, B. J. **Fluorescence *in situ* hybridization**. Trends in Genetics. 1991. p. 149-154.
- VALENTE, T. G.; SCHNEIDER, H. C.; GROSS, C. M.; FELDBERG, E.; MARTINS, C. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic *in situ* hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, v. 17, 791–799, 2009. doi: 10.1007/s10577-009-9067-5
- VARI, R. P. Higher level phylogenetic concepts within Characiformes (Ostariophysi), a historical review. In : MALABARBA, L. R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA,

- Z.M.; LUCENA, C. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 111-122.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, v. 134, p. 311-317, 2008.
- VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 114, p. 163–168, 2006.
- VICENTE, V. E.; BERTOLLO, L. A. C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae) satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**, v. 119, p. 115-120, 2003.
- VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 74, p. 70–75, 1996.
- VOLFF, J. N.; BOUNEAU, L.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISCHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetics**, v. 19, 74-678, 2003.
- VOLFF, J. N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. **Heredity**, v. 94, p. 280-294, 2005.
- VOLFF, J. N.; NANDA, I.; SCHMID M.; SCHARTL M. Governing Sex Determination in Fish: Regulatory Putsches and Ephemeral Dictators. **Sexual Development**, v. 1, p. 85–99, 2007.
- VOLFF, J. N.; SCHARTL, M. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. **Genetica**, v. 111, p. 101–110, 2001.

- WEILER, K. S.; WAKIMOTO, B. T. Chromosome rearrangements induce both variegated and reduced uniform expression of heterochromatic genes in a development specific manner. **Genetics**, v. 149, p. 1451-1464, 1995.
- WEINER, A. M.; DEININGER, P. L.; EFSTRATIADIS, A. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 631-661, 1986.
- WEITZMAN, S. H.; VARI, R. P. Miniaturização in South America freshwater fishes; an overview and discussion. **Proceedings of Biological Society of Washington**, v. 101, n. 2, p. 444-465, 1988.
- WILTSHIRE, R. N.; DENNIS, T. R.; SONDAK, V. K.; MELTZER, P. S.; TRENT, J. M. Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 131, n. 2, p. 97-103, 2001.
- WITZANY, G. The Viral Origins of Telomeres and Telomerases and their Important Role in Eukaryogenesis and Genome Maintenance. **Biosemiotics**, v. 1, n. 2, p. 191-206, 2008.
- YAMADA, K.; UMEHARA, C.; MATSUDA, Y. Molecular and cytogenetic characterization of site specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research**, v. 13, p. 33-46, 2005.
- YANG, F.; O'BRIEN, P. C.; MILNE, B. S.; GRAPHODATSKY, A. S.; SOLANKY, N.; TRIFONOV, V.; RENS, W.; SARGAN, D.; FERGUSON-SMITH, M. A. A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. **Genomics**, v. 62, p. 189-202, 1999.
- YOSHIDA, K.; TERAII, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; KUROIWA, A.; *et al.* B Chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PLoS Genetics** 7:e1002203, 2011.

- YOSHIMOTO, S.; IKEDA, N.; IZUTSU, Y.; SHIBA, T.; TAKAMATSU, N.; ITO, M. Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW type sex-determining system. **Development**, v. 137, p. 2519-2526, 2010.
- YOSHIMOTO, S.; OKADA, E.; UMEMOTO, H.; TAMURA, K.; UNO, Y.; NISHIKIDA-UMEHARA, C.; MATSUDA, Y.; TAKAMATSU, N.; SHIBA, T.; ITO, M. A. W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 2469-2474, 2008.
- ZHANG, Q.; NAKAYAMA, I.; FUJIWARA, A.; KOBAYASHI, T.; OHARA, I.; MASAOKA, T.; KITAMURA, S.; DEVLIN, R. H. Sex identification by male-specific growth hormone pseudogene (*GH-*) in *Oncorhynchus masou* complex and a related hybrid. **Genetica**, v. 111, p. 111–118, 2001.
- ZHOU, Q.; FROSCHAUER, A.; SCHULTHEIS, C.; SCHMIDT, C.; BIENERT, G. P.; WENNING, M.; DETTAI, A.; VOLFF, J. N. Helitron Transposons on the Sex Chromosomes of the Platyfish *Xiphophorus maculatus* and Their Evolution in Animal Genomes. **Zebrafish**, v. 3(1), p. 39-52, 2006.
- ZHU, H. P.; GUI, J. F. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture**, V. 265, p. 109–117, 2007. doi: 10.1016/j.aquaculture. 2006.10.026

Anexo 1

Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae)

Marlon F. Pazian · Cristiane Kioko Shimabukuro-Dias · José Carlos Pansonato-Alves · Claudio Oliveira · Fausto Foresti

Received: 11 May 2012 / Accepted: 17 January 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Some species of the genus *Characidium* have heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes with a totally heterochromatic W chromosome. Methods for chromosome microdissection associated with chromosome painting have become important tools for cytogenetic studies in Neotropical fish. In *Characidium* cf. *fasciatum*, the Z chromosome contains a pericentromeric heterochromatin block, whereas the W chromosome is completely heterochromatic. Therefore, a probe was produced from the W chromosome through microdissection and degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction amplification. FISH was performed using the W probe on the chromosomes of specimens of this species. This revealed expressive marks in the pericentromeric region of the Z chromosome as well as a completely painted W chromosome. When applying the same probe on chromosome preparations of *C.* cf. *gomesi* and *Characidium* sp., a pattern similar to *C.* cf. *fasciatum* was found, while *C.* cf. *zebra*, *C.* cf. *lagosantense* and *Crenuchus spilurus* species showed no hybridization signals. Structural changes in the chromosomes of an ancestral sexual system in the group that includes the species *C.* cf. *gomesi*, *C.* cf. *fasciatum* and *Characidium* sp., could have contributed to the process of speciation and could represent a causal mechanism of chromosomal diversification in this group. The heterochromatinization process possibly began in homomorphic and homologous chromosomes of an ancestral form, and this process could have given rise to the

current patterns found in the species with sex chromosome heteromorphism.

Keywords Microdissection · FISH · DOP-PCR · Cytogenetic · Sex chromosomes · Freshwater fishes

Introduction

Crenuchidae is a small freshwater fish family with two subfamilies: Characidiinae and Crenuchinae (Buckup 1998). The genus *Characidium* is the most diverse in the family Crenuchidae. Widely distributed in the Neotropical region (Buckup 2003), *Characidium* is considered the most specious group of the Characidiinae subfamily, consisting of approximately 52 recognised species (Buckup 1999; Buckup and Hahn 2000).

Teleost fishes are a good model for studying the early evolutionary process of sex chromosome differentiation because their sex chromosomes differ in their origin and degeneration level (Takehana et al. 2012). Cytogenetic studies involving representatives of the genus *Characidium* were initiated by Miyazawa and Galetti (1994), who characterized the karyotypes of the species *C.* cf. *zebra*, *C.* *lagosantense* and *C.* *pterostictum*. When analyzing the species *Characidium* cf. *fasciatum*, Maistro et al. (1998) described the sexual heteromorphic chromosome system ZZ/ZW. Later, this system was described in the species *C.* *gomesi* (Centofante et al. 2001), *C.* cf. *alipioi* (Centofante et al. 2003) and *C.* cf. *gomesi* (Vicari et al. 2008). The presence of sex chromosomes was also described by Pansonato-Alves et al. (2010) in *C.* *schubarti*, *Characidium* sp., *C.* *pterostictum*, *C.* *oiticicaí*, *C.* *lanei*, and *C.* *lauroi*. Cytogenetic studies in *Characidium* are restricted to ten species (Miyazawa and Galetti 1994; Maistro et al. 1998,

M. F. Pazian (✉) · C. K. Shimabukuro-Dias · J. C. Pansonato-Alves · C. Oliveira · F. Foresti
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior S/N, Rubião Júnior, Botucatu, SP CEP 18618-000, Brazil
e-mail: pazian@ibb.unesp.br

2004; Centofante et al. 2001, 2003; Vicari et al. 2008; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011). Considering the fact that 52 species exist in this genus, these studies can be considered scarce. The ten species analyzed to date have conserved karyotype macrostructures with a constant diploid number of 50 chromosomes that are predominantly meta-centric and submetacentric (Maistro et al. 1998, 2004; Centofante et al. 2001, 2003; Vicari et al. 2008; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010, 2011; Machado et al. 2011). The ZZ/ZW sex chromosomes were observed in the majority of species analysed to date except for *C. cf. zebra* and *C. cf. lagsantense*. The *Characidium* specimens analysed showed possible homeologous sex chromosomes in some species. This group proved to be an important model for studying the evolution of sex chromosomes due to the presence or absence of sex chromosomes in phylogenetically close species (Machado et al. 2011).

Micro-FISH (Microdissection, DOP-PCR 'degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction' and fluorescence in situ hybridization) has been used successfully in vertebrates to identify the chromosomal rearrangements involved in the evolutionary process of primates (Taguchi et al. 2003; Neusser et al. 2005; Nieves et al. 2005), cervids (Li et al. 2005) and rodents (Fagundes et al. 2000; Marchal et al. 2004). Chromosome microdissection is a direct method for analysing the molecular composition of sex-linked chromosomes, and the information it provides is of paramount importance for understanding the processes involved in sex chromosome differentiation. A great success to infer the origin and evolution of fish sex chromosomes was obtained using the micro-FISH in some species of salmonids (Reed et al. 1995; Phillips et al. 2001); the cichlid *Oreochromis niloticus* (Harvey et al. 2002); and Neotropical fishes of the *Eigenmannia* (Henning et al. 2008a), *Triporthus* (Diniz et al. 2008b), *Characidium* (Machado et al. 2011), *Apareidon* and *Parodon* genera (Schemberger et al. 2011).

In the present study, we used micro-FISH analysis to better understand the composition, structure and mechanisms involved in the origin and evolution of sex chromosomes in species of the genera *Characidium* (a representative of Characidiinae) and *Crenuchus* (a representative of Crenuchinae). We obtained a specific probe for the W-chromosome of *C. cf. fasciatum* by chromosome microdissection and DOP-PCR. Using the FISH technique, the probe was applied to chromosome preparations from individuals bearing different W-chromosomes (*C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp.) and specimens without sex chromosomes (*C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* and *Crenuchus spilurus*) to identify similarities in the structure and composition of the sex chromosomes. The studied species differed in relation to the presence or absence of morphologically differentiated sex chromosomes and to the degree of sex chromosome differentiation.

The results indicated the occurrence of evolutionary transformations in the heteromorphic sex chromosomes.

Materials and methods

Fish specimens and chromosome preparation

Five species of fishes from the *Characidium* genus and the species *Crenuchus spilurus* originating from different hydrographic basins of Southeastern, Midwest and Northern Brazil were analyzed (Table 1). The analyzed specimens were fixed in 10 % formaldehyde and then preserved in 70 % ethanol. After identification, they were added to the fish collection of the Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP-11443; 9607; 9606; 11442; 11444; 9424).

In vivo mitotic chromosome preparations were obtained from the renal tissue and gills of the animals anesthetized with benzocaine, using the "air-drying" technique (Foresti et al. 1981). The metaphase chromosomes were analyzed with an optical photomicroscope (Olympus BX61), and images were captured with Image Pro Plus 6.0 software (MediaCybernetics). C-banding was performed following the protocol described by Sumner (1972).

Chromosome microdissection, DOP-PCR amplification and probe preparation

For microdissection, we used the following protocol: An aliquot of the final cell suspension was diluted in a mixture of methanol and acetic acid at a 3:1 ratio. The suspension was dripped onto coverslips, and C-banding was performed to identify the W chromosome. The material was air-dried and stained for 10 min with 5 % Giemsa solution in a phosphate buffer (0.06 M of KH_2PO_4 and 0.449 M of Na_2HPO_4 , pH 6.8), washed with distilled water and air-dried. The coverslip was then placed under an inverted microscope (Axiovert 100-Zeiss), and microdissection of the chromosomes was performed using glass capillaries of a 70 μm diameter. Needles were attached to a mechanical micromanipulator (Eppendorf). All equipment was exposed to UV light prior to use.

The six microdissected chromosomes were deposited into PCR tubes. Amplification of the microdissected material was optimized in a thermal cycler (PTC-100TM; MJ Research, Inc.) following the protocol described by Muhlmann-Diaz et al. (2001): 5 μl of water were added to the collected material and heated for 10 min at 95 °C. Then, 20 μl of PCR mix was added (2 \times buffer = 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0.2 % Triton-100 \times , 3 mM MgCl_2 , 500 μM of each dNTP, 2.5 μM primer (DOP

Genetica

Table 1 Collection sites of *Characidium* and *Crenuchus* species analyzed

Species	F	M	Sample site	Coordinates
<i>C. cf. fasciatum</i>	1	–	Stream of Rio das Velhas basin São Francisco River basin—Curvelo, Minas Gerais	19°38'18.50"S 44°07'17.60"W
<i>C. cf. gomesi</i>	9	5	Stream Rio da Cachoeira, Upper Paraná River basin—Itumirin, Goiás	18°34'50.80"S 52°05'52.80"W
<i>Characidium</i> sp.	5	3	Formoso river, Upper Paraná River basin—Chapadão do Céu, Goiás	18°16'17.00"S 52°50'34.40"W
<i>C. cf. zebra</i>	2	1	Stream Ribeirão Claro, Tietê River Basin— Rio Claro, São Paulo	22°22'42.99"S 47°32'04.08"W
<i>C. cf. lagsantense</i>	7	9	Amendoim stream, Rio das Velhas River basin—Curvelo, Minas Gerais	18°43'14.60"S 44°20'47.30"W
<i>Crenuchus spilurus</i>	5	12	Cajueirinho stream, Caeté River Basin—Tracuateua, Pará	01°05'07.80"S 46°51'44.30"W

Numbers and sex of individuals sampled are indicated

F female, M male

5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') and 2 units of *Taq* polymerase). The PCR program consisted of 10 cycles of low stringency (94 °C for 1.5 min, 37 °C for 3 min, and 72 °C for 4 min), followed by 30 cycles of high stringency (94 °C for 1.5 min, 56 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min). The lengths of the PCR products were checked on a 1 % agarose gel. Next, 3 µl of the initial PCR products were used to perform a new amplification reaction in a final volume of 50 µl mixture containing 1X *Taq* polymerase buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 3 µl of 10 µM DOP primer, 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3', and 2 units of *Taq* polymerase, according to the following conditions: an initial cycle of 90 °C for 5 min; followed by 30 cycles of 90 °C for 1.5 min, 56 °C for 1.5 min, 72 °C for 1.5 min and one final cycle of 72 °C for 7 min. The lengths of the PCR products were verified on a 1 % agarose gel.

Another PCR was performed to increase the amount of DNA, and a subsequent labelling PCR was performed using digoxigenin (digoxigenin 11-dUTP; Roche). Through this process of DNA amplification, a probe of the W chromosome was obtained. The DCf (DOP-PCR *Characidium cf. fasciatum*) probe was prepared from the W chromosomes of *C. cf. fasciatum* (Figs. 1a, 2a) collected in the Rio das Velhas basin, a tributary of the Rio São Francisco in Curvelo/MG. Negative controls were performed in all steps of the probe production, and the resulting probe showed fragments that were 100–550 bp in size.

A FISH technique, using the DCf probe, was performed following the protocol by Pinkel et al. (1986). The probe was produced by PCR and labelled with digoxigenin-11-dUTP (Roche), according to manufacturer's instructions. Then, 700 ng of the probe in a hybridization solution (50 % formamide, 10 % dextran sulphate, 2 × SSC, at 37 °C for 18 h) was added per slide. The detection of hybridization signals was carried out using FITC-conjugated anti-digoxigenin coupled antibody (Roche). Chromosomes were

counterstained with DAPI and embedded in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

Results

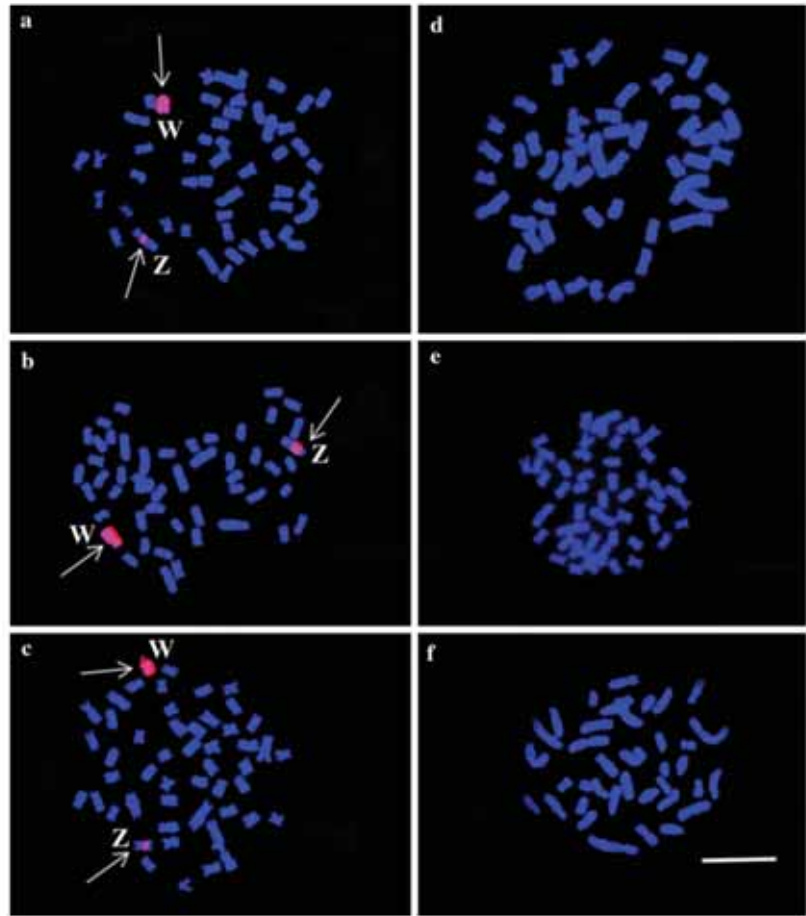
Cytogenetic analysis revealed that all species of the genus *Characidium* had a diploid chromosome number of 50, while *Crenuchus spilurus* had 38 chromosomes. The metaphase chromosomes of the species *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* and *Characidium* sp. showed a sex-linked chromosomal polymorphism of the ZZ/ZW type. The W chromosome is slightly smaller than the Z chromosome. *In situ* hybridization with the DCf probe (Fig. 1) and C-banding (Fig. 2) showed the W chromosome was entirely marked in *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* and *Characidium* sp.; additionally, all three species showed pericentromeric fluorescent signals on the Z chromosome. However, in individuals of the species *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* and *C. spilurus*, the chromosome polymorphisms linked to sex were not observed, and FISH with the DCf probe showed no hybridization with any chromosomes in these three species.

C-banding revealed a differential staining pattern in *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, and *C. sp.*, mainly concerning the conspicuous heterochromatic blocks found in the Z centromeric and terminal regions, and totally heterochromatic W chromosomes. This staining pattern was not found in *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* and *C. spilurus* (Fig. 2); in these species, heterochromatin is mainly located in the centromeric region.

Discussion

The genus *Characidium* presents a stable karyotype with 2n = 50 metacentric and submetacentric chromosomes in

Fig. 1 Somatic metaphases of *Characidium* and *Crenuchus* female specimens after in situ hybridization with DCF probe. **a** *C. cf. fasciatum*; **b** *C. cf. gomesi*; **c** *Characidium* sp.; **d** *C. cf. zebra*; **e** *C. cf. lagsantense*; **f** *Crenuchus spilurus*. Arrows indicate sex chromosomes Z and W. Bar represents 10 μ m



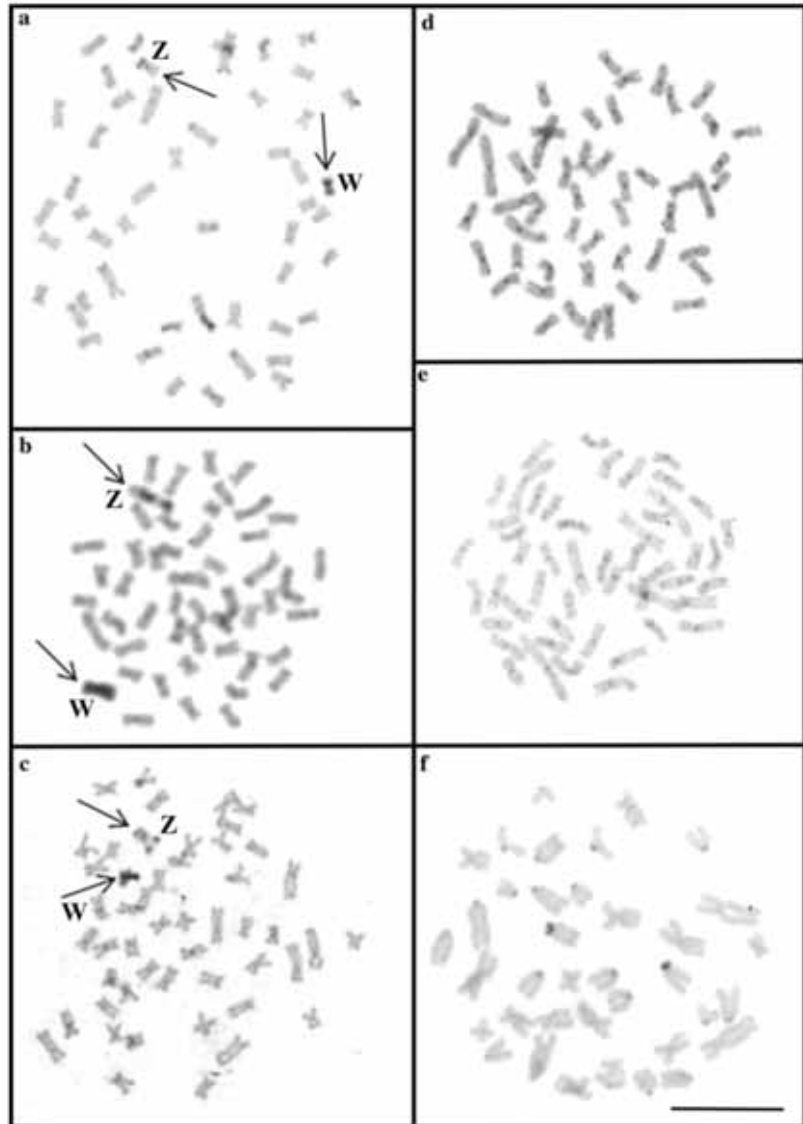
the majority of species (Vicari et al. 2008; Noletto et al. 2009; Pansonato-Alves et al. 2010). Among the previously studied species as well as the ones in the present study, only *C. cf. zebra* and *C. cf. lagsantense* do not show a sex chromosome-associated polymorphism. Specimens of *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp. and one female specimen of *C. cf. fasciatum* examined here presented the heteromorphic sexual chromosomes of the ZZ/ZW system. FISH performed here with a DCF probe revealed the following expected pattern of association: a complete hybridization of the probe on the W chromosome and hybridization in the pericentromeric region of the Z chromosome. This indicates a partial homology between the W and Z chromosomes. The fact that the probe had the same pattern of hybridization in different species is evidence that the W and Z chromosomes of these species are homeologous. The same probe, when tested on *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* and *Crenuchus spilurus* chromosomes, showed no signs of hybridization. One possible conclusion from these results is that the

system of sex chromosomes originated in the ancestral form of the group to which the species *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, and *Characidium* sp. belong and has undergone several changes during the differentiation process. The heterochromatinization of these chromosomes most likely began in the homologous and homomorphic chromosomal forms in the ancestral group of the species that possess sex chromosomes today (Fig. 3), and the heterochromatinization process must have occurred after the speciation that separated the ancestors of the *C. cf. zebra* group (*C. cf. zebra* and *C. cf. lagsantense*) and *C. cf. gomesi* group (*C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* and *Characidium* sp.). This can be explained by the fact that the DCF probe did not hybridize with the chromosomes of the three species, *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* and *C. spilurus*.

The majority of the cases of sex chromosome heteromorphisms described in fishes are related to morphology, size or differential presence of heterochromatin (Cioffi et al. 2012). In some fish species, sex chromosomes can be

Genetica

Fig. 2 Somatic metaphases of *Characidium* and *Crenuchus* female specimens after C banding. **a** *C. cf. fasciatum*; **b** *C. cf. gomesi*; **c** *Characidium* sp.; **d** *C. cf. zebra*; **e** *C. cf. lagosantense*; **f** *Crenuchus spilurus*. Arrows indicate sex chromosomes Z and W. Bar represents 10 μ m



distinguished by different heterochromatic patterns; this has been observed in some species of *Characidium*. More recently, new approaches have been used to identify heteromorphic sex chromosomes in fish such as specific chromosome painting, mapping of sequences of repetitive DNA and genes related to sex differentiation; this has been performed in Salmonidae (Devlin et al. 2001; Zhang et al. 2001), Gasterosteidae (Ross et al. 2009), *Orzias latipes* (Matsuda et al. 2002; Matsuda 2005; Takehana et al. 2012), and *Danio rerio* (Liew et al. 2012). In the case of *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, and *C. sp.*, heteromorphic sex

chromosomes were readily detected by conventional techniques (C-banding) and were confirmed by FISH with the DCF probe on the single pair of chromosomes.

The differential accumulation of repetitive elements in a pair of chromosomes, as observed in *Chionodraco hamatus*, which features repetitive elements in the Y chromosome (Ozouf-Costaz et al. 2004), is strong evidence for the presence of sex chromosomes. This is also observed in the chromosomes of the genera *Hoplias* (Cioffi et al. 2012), *Eigenmannia* (Henning et al. 2008a, b), *Leporinus* (Galetti and Foresti 1986; Koehler et al. 1997; Parisi-Maltempi

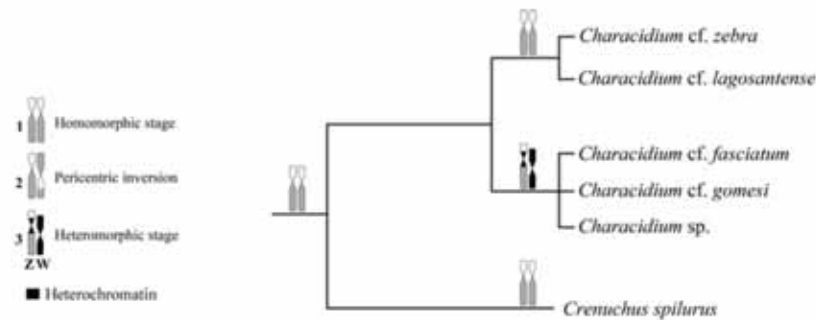


Fig. 3 Possible origin process of sex chromosomes and schematic cladogram involving the *Characidium* species analyzed in the present study. 1 represents a basic ancestral homomorphic chromosome pair;

2 the occurrence of a pericentric inversion in one of the homologs; 3 Differential heterochromatinization involving the chromosomes of heteromorphic pair, gene erosion and Z-W morphological differentiation

et al. 2007; Marreta et al. 2012), *Paradon* (Vicente et al. 2003; Schemberger et al. 2011), *Triporthus* (Artoni and Bertollo 2002; Diniz et al. 2008a, b), and *Pocilidae* (Nanda et al. 1993, 2000), as well as in the order Anura (Nascimento et al. 2010) and in the Y chromosome of the class Mammalia (including *Homo sapiens*) (Skaletsky et al. 2003). It is proposed that during the differentiation and evolution of sex chromosomes, several genetic changes contributed to the differentiation of X and Y (Z and W) chromosomes, one of which is the appearance of regions that are rich in repetitive DNA (Ohno 1967; Volff et al. 2007; Cioffi et al. 2012). In the current study, the accumulation of repetitive DNA segments (heterochromatin) was observed in *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, and *Characidium sp.*, leading to a clear distinction between the two sex chromosomes and the autosomes as observed in other species of the genus.

From the observations of the evolution of different sex chromosomes, it was hypothesized that sex chromosomes are derived from a pair of autosomes (Ohno 1967; Volff et al. 2007). In this case, one of the initial steps in the evolution of sex chromosomes is the emergence of a new single *locus* on an autosome. Heterozygosity at this *locus* leads to the development of one sex and homozygosity to the development of the other sex, thereby establishing a proto-sex chromosome system (Graves 2006; Takehana et al. 2007; Volff et al. 2007). Therefore, at this stage of evolution, the two sex chromosomes are morphologically homomorphic. Heteromorphic sex chromosomes are thought to arise through the suppression of recombination around the sex determination gene. This keeps the non-recombinant region in a constant state of heterozygosity that leads to numerous deletions of functional genes and the accumulation of repetitive sequences in a specific sex chromosome (Y or W) (Charlesworth et al. 2005). This degeneration process spreads from a specific region of the sex chromosome (Y or W) to eventually cover almost the

entire chromosome, and beneficial sex-specific genes (such as spermatogenesis genes) accumulate in the chromosome, as observed in the human Y chromosome (mammals) (Skaletsky et al. 2003; Graves 2006).

The likely ancestral condition, without morphologically differentiated sex chromosomes, seems to be present in *C. cf. zebra* (Machado et al. 2011) and *C. cf. lagosantense*. The occurrence of an inversion in Z or W chromosomes was observed by Pansonato-Alves et al. (2010) using Ag-NORs in *C. schubarti*, *Characidium sp.*, *C. pterostictum*, *C. oiticicae*, *C. lanei*, and *C. lauroi*. Machado et al. (2011) also suggest that the occurrence of a pericentric inversion in the initial steps of differentiation of sex chromosomes in the species of *Characidium* would limit the recombination between Z and W chromosomes during meiosis. This may have allowed heterochromatinization, subsequent accumulation of repetitive sequences and subsequent degeneration in this non-recombinant chromosomal region of the W chromosome. This process is associated with the morphological differentiation of Z and W chromosomes of *Characidium* which progressed to a stage of cytogenetic identifiability (condition observed in *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi*, *Characidium sp.* and in other species/populations of *Characidium* studied). Similarly, this situation is observed in mammals and birds where Y/W chromosomes are highly differentiated and are smaller than the X or Z chromosomes (Matsubara et al. 2006; Takehana et al. 2007).

According to Vicari et al. (2008), Noletto et al. (2009), Pansonato-Alves et al. (2010, 2011) and Machado et al. (2011), the genus *Characidium* has a sex chromosome system with a single origin. A single origin of sex chromosomes is also proposed in the genera *Triporthus* (Artoni et al. 2001; Diniz et al. 2008a, b) and *Leporinus* (Galetti and Foresti 1986; Koehler et al. 1997; Marreta et al. 2012) and some species of Parodontidae (*Apareiodon* and *Parodon* genus) (Schemberger et al. 2011). This differs

from the findings in other fish groups such as *Eigenmannia* (Henning et al. 2008b), *Oryzias* (Takehana et al. 2007, 2012), *Xiphophorus* (Nanda et al. 2000; Volff and Schartl 2001) and species of the family Gasterosteidae (Ross et al. 2009), which present sex chromosomes that possibly originated from multiple sources. Most karyotyped species of the genus *Characidium* present a heterogametic female system in which the absence of undifferentiated sex chromosomes can be considered a plesiomorphic feature (Vicari et al. 2008). This is observed in *C. cf. zebra*, which belong to a group considered morphologically basal in the genus *Characidium* (Buckup 1993). The absence of sex chromosomes in *Crenuchus spilurus* reinforces the hypothesis that sex chromosomes appeared in some species of the genus *Characidium*.

Specimens of *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* and *Characidium* sp. studied after C-banding, contained a terminal heterochromatin segment in the long arm of the Z. The larger amount of heterochromatin was observed in the pericentromeric region of the Z chromosomes in the *C. cf. gomesi* specimens as compared to the same segment of the Z chromosomes in the *C. cf. fasciatum* and *Characidium* sp. specimens. This suggests that this region originated by duplication of the segment either by intra or interchromosomal rearrangements.

Among the *Characidium* species already studied cytogenetically, the occurrence of two different systems of sex determination (sex determination controlled by sex chromosomes and systems with morphologically undifferentiated sex chromosomes) suggests that sex chromosome differentiation is a recent evolutionary event as observed in other groups of Neotropical fishes such as the family Anostomidae and the subfamily Hypoptopomatinae (Oliveira et al. 2009). It also suggests that the heteromorphic Z and W chromosomes of *Characidium* are homoplastic in relation to the Z and W chromosomes found in other fish genera. The homoplastic nature that is related to recurrent events of sex chromosome differentiation in fish has been recognized by several authors (Takehana et al. 2007; Volff et al. 2007; Oliveira et al. 2009), and it is an interesting condition that is also observed in anurans (Nascimento et al. 2010) and reptiles (Ezaz et al. 2009; Kawagoshi et al. 2012). This contrasts with the heteromorphic condition observed in birds (ZZ/ZW) and mammals (XX/XY), where systems that have sex chromosomes are apparently well established (Ezaz et al. 2006; Graves 2006; Volff et al. 2007). This makes the study of sex chromosomes on these vertebrates very important.

In conclusion, the ZZ/ZW sex chromosome system is a common feature for the *C. cf. fasciatum*, *C. cf. gomesi* and *Characidium* sp. species. Most *Characidium* species and populations have been analyzed and possess a well differentiated ZZ/ZW system. The occurrence of Z/W chromosomes

in this group may correspond to a sinapomorphic condition for some species. Thus, additional cytogenetic and molecular phylogenetic relationship studies among species of *Characidium* should be performed to provide a better understanding of chromosomal evolution of this fish group.

Acknowledgments We are grateful to Renato Devidé and Ricardo Britzke for their help in sampling. Financial support for this study was provided by FAPESP (2009/50952-2) and CNPq. We also thank one anonymous reviewer for the proposed suggestions.

References

- Artoni RF, Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triporthus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89:15–19
- Artoni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triporthus*. *Chromosome Res* 9:449–456
- Buckup PA (1993) Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical characidiin fishes (Teleostei, Characiformes). *Cladistics* 9:305–341
- Buckup PA (1998) Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CA (eds) *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, pp 123–144
- Buckup PA (1999) Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: Caramaschi EP, Mazzoni R, Peres-Neto PR (eds) *Ecologia de peixes de riachos brasileiros*. Série Oecologia Brasiliensis vol. VI, PPGÉ-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 91–138
- Buckup PA (2003) Family Crenuchidae (South American darters). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (eds) *Check list of the freshwater fishes of south and central America*. Edipucrs, Porto Alegre, pp 87–95
- Buckup PA, Hahn L (2000) *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. *Copeia* 1:150–155
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2001) Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54:253–260
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138:213–218
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012) The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *J Fish Biol* 80:2125–2139
- Devlin RH, Biagi CA, Smailus DE (2001) Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111: 43–58
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a) Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triporthus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica* 133:85–91
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008b) Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome

- analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 122:163–168
- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM (2006) Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. *Curr Biol* 16:736–743
- Ezaz T, Sarre SD, O'Meally D, Marshall Graves JA, Georges A (2009) Sex Chromosome Evolution in Lizards: Independent Origins and Rapid Transitions. *Cytogenet Genome Res* 127:249–260
- Fagundes V, Christoff AU, Scalzi-Martin J, Hozier J, Moreira-Filho CA, Yonenaga-Yassuda Y (2000) X;Y translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 88:124–129
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31:137–144
- Galetti PM, Foresti F (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet Cell Genet* 43:43–46
- Graves JAM (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124:901–914
- Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LA, Bromage NR, Penman DJ, Griffin DK (2002) Molecular cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex chromosome differentiation. *Cytogenet Genome Res* 97(1–2):76–80
- Henning F, Trifonov V, Almeida-Toledo LF (2008a) Use of Chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genet Mol Biol* 31(1):279–283
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008b) Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res* 121:55–58
- Kawagoshi T, Nishida C, Matsuda Y (2012) The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines). *Chromosome Res* 20:95–110
- Kochler MR, Haaf T, Guttenbac M, Scharl M, Schmid M (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Chromosome Res* 5:325–331
- Li YC, Cheng YM, Hsieh LJ, Ryder OA, Ang F, Liao SJ, Hsiao KM, Tsai FJ, Tsai CH, Lin CC (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma* 114:28–38
- Liew WC, Bartfai R, Lim Z, Sreenivasan R, Siegfried KR, Orban L (2012) Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS ONE* 7:1–12
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genet* 12:65
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F (1998) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica* 104:1–7
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F (2004) Cytogenetic analysis of A-B chromosomes and ZZ-ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69:181–186
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, de la Díaz Guardia R, Sánchez A (2004) X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Res* 12:767–776
- Marreta ME, Faldoni FLC, Parise-Maltempi PP (2012) Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *J Fish Biol* 80:630–637
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Umehara CN, Agata K, Matsuda Y (2006) Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18190–18195
- Matsuda M (2005) Sex determination in the Teleost Medaka, *Oryzias latipes*. *Annu Rev Genet* 39:293–307
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Horik H, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563
- Miyazawa CS, Galetti PM (1994) First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia* 59:73–79
- Mühlmann-Diaz MC, Ullsh BA, Whicker FW, Hinton TG, Congdon JD, Robinson JF (2001) Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. *Cytogenet Cell Genet* 92:139–143
- Nanda I, Scharl M, Epplen JT, Feichtinger W, Schmid M (1993) Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences. *J Exp Zool* 265:301–308
- Nanda I, Volff JN, Weis S, Korting C, Froschauer A, Schmid M, Scharl M (2000) Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 109:173–180
- Nascimento J, Quinderé YRSD, Recco-Pimentel SM, Lima JRF, Lourenço LB (2010) Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). *Genetica* 138:1127–1132
- Neusser M, Münch M, Anzenberger G, Müller S (2005) Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res* 108:191–196
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry MD (2005) Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genet Mol Res* 4:675–683
- Noieto RB, Amorim AP, Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM (2009) An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *J Fish Biol* 75:448–453
- Ohno S (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem* 35:81–100
- Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau JP, Volff JN (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarctic Sci* 16:51–57
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotrop Ichthyol* 8:77–86
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F (2011) Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei: Crenuchidae). *J Fish Biol* 78:183–194
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae):

Genetica

- new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res* 116:218–223
- Phillips B, Konkol NR, Reed KM, Stein JD (2001) Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 111:119–123
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938
- Reed KM, Bohlander SK, Phillips RB (1995) Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosome Res* 3:221–226
- Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapiro MD, Peichel CL (2009) Turnover of Sex Chromosomes in the Stickleback Fishes (Gasterosteidae). *Plos Genet* 5: page 1000391. doi:10.1371/journal.pgen.1000391
- Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR (2011) Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* 11–12:1499–1508
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou S, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin P, Rock S, Rohlfling T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang S, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825–837
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306
- Taguchi T, Akimaru K, Hirai H, Hirai Y, Mwenda JM, Taguchi KYA (2003) probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Res* 11:147–152
- Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2007) Evolution of ZZZW and XX/XY sex determination systems in the closely related medaka species *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma* 116:463–470
- Takehana Y, Naruse K, Asada Y, Matsuda Y, Shin IT, Kohara Y, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2012) Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the W chromosomes of medaka fishes. *Chromosome Res* 20:71–81
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Diversification of a ZZZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311–317
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae) satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119:115–120
- Volff JN, Scharl M (2001) Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111:101–110
- Volff JN, Nanda I, Schmid M, Scharl M (2007) Governing sex determination in fish: regulatory pushes and ephemeral dictators. *Sex Dev* 1:85–99
- Zhang Q, Nakayama I, Fujiwara A, Kobayashi T, Ohara I, Masaoka T, Kitamura S, Devlin RH (2001) Sex identification by male-specific growth hormone pseudogene (GH- ψ) in *Oncorhynchus masou* complex and a related hybrid. *Genetica* 111:111–118