

DIOVANI PISCOR

**ESTUDO DOS CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES
ALOCADAS EM *incertae sedis* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) COM O USO DE DIFERENTES
MARCADORES CITOGENÉTICOS**

The bottom half of the cover features a large, abstract geometric design. It consists of a series of overlapping triangles in various shades of blue and white, creating a complex, crystalline pattern that resembles a stylized globe or a molecular structure.

RIO CLARO-SP
2012

DIOVANI PISCOR

**ESTUDO DOS CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES
ALOCADAS EM *incertae sedis* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) COM O USO DE DIFERENTES
MARCADORES CITOGENÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise-Maltempi

RIO CLARO-SP
2012

597 Piscor, Diovani
P676 Estudo dos cromossomos de espécies alocadas em incertae
sedis (Characiformes, Characidae) com o uso de diferentes
marcadores citogenéticos / Diovani Piscor. - Rio Claro : [s.n.],
2012
126 f. : il., figs., tabs., fots. + 1 ICMBio

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise-Maltempi

1. Peixe. 2. DNAr. 3. FISH. 4. Evolução cariotípica. 5.
Cromossomos B. 6. Variações Ag-RONs. I. Título.

... dedico esse trabalho aos meus pais que me apoiaram sempre nos momentos mais difíceis ... a minha amada esposa, a qual me incentivou sempre quando eu não via mais saída para os problemas ...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial:

Primeiramente a Deus, que sempre esteve, está e estará do meu lado em todos os momentos da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise-Maltempi por acreditar em mim me dando a oportunidade de conquistar mais este título, pela amizade, pelos conhecimentos adquiridos durante estes anos e pelos ensinamentos que me conduziram para a concretização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sanae Kasahara pela amizade, atenção e gentileza que sempre me recebeu, ajudando-me nas diversas dúvidas, pelas dicas valiosas que me ajudaram muito no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Diogo C. Cabral-de-Mello pela ajuda no esclarecimento de diversas dúvidas, principalmente com relação à técnica de FISH, e pela paciência com que me recebeu todas as vezes.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade de Mundo Novo, pela gentileza com que me recebeu cedendo o Laboratório para a realização de parte da pesquisa deste trabalho.

Aos meus pais que sempre depositaram confiança nas minhas decisões e, principalmente, pelo carinho que me dedicam.

À minha querida esposa Daniela Bocagini Ribacinko Piscor pela paciência, pelo amor, pelo companheirismo e carinho dedicados a mim, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa e pelo incentivo em todos os momentos, TE AMO!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela estrutura cedida durante os dois últimos anos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, por toda ajuda quando necessária.

A todos meus professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular - (UNESP, Rio Claro-SP) que de forma direta auxiliaram na minha capacitação profissional.

À Cris, desenhista do Departamento de Biociências da UNESP-Rio Claro, pela ajuda com a organização das figuras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações sobre a ictiofauna Neotropical	02
1.2. O grupo <i>incertae sedis</i> dentro de Characidae.....	03
1.3. Estudos citogenéticos em espécies alocadas em <i>incertae sedis</i>	05
1.4. Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em <i>incertae sedis</i>	06
1.5. Comossomos B: Características gerais e perspectivas	08
1.6. Comossomos B em <i>incertae sedis</i>	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS.....	17
4. MÉTODOS.....	21
4.1. Estimulação de células mitóticas	21
4.2. Obtenção de cromossomos mitóticos	21
4.3. Montagem dos cariótipos.....	22
4.4. Localização da heterocromatina	23
4.5. Localização das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata.....	23
4.6. Dupla coloração CMA ₃ /DAPI com cromossomos desnaturados	24
4.7. Extração de DNA.....	25
4.8. Obtenção de sonda de DNAr 18S por PCR	26
4.9. Obtenção de sonda de DNAr 5S por PCR	26
4.10. Marcação das sondas de DNAr 18S e 5S.....	28
4.11. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	28
4.12. Amplificação do gene mitocondrial citocromo-b (<i>cyt-b</i>).....	30
4.13. Análise de PCR-RFLP	31
4.14. Sequenciamento de DNA	31
4.15. Análise das sequências	32

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1. CAPÍTULO I - MARCADORES CITOGENÉTICOS E MOLECULARES PARA ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Bryconamericus</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DISTINTAS	42
Referências do Capítulo I	64
6.2. CAPÍTULO II - VARIAÇÕES DE ATIVIDADE GÊNICA DE DNA RIBOSSOMAL ASSOCIADO ÀS RONS EM <i>Piabina argentea</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)	68
Referências do Capítulo II	80
6.3. CAPÍTULO III - OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO EM <i>Hyphessobrycon eques</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS.....	83
Referências do Capítulo III	94
6.4. CAPÍTULO IV - ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Astyanax</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS.....	98
Referências do Capítulo IV.....	120
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
ANEXO I.....	128

LISTA DE FIGURAS

MATERIAIS

Figura 1. As imagens representam os locais de coleta no Estado de São Paulo e no Estado de Mato Grosso do Sul, e suas respectivas coordenadas **a.** Afluente do rio Passa-Cinco (SP), 22°23'25,4"S; 47°50'47,8"O. **b.** Ribeirão Claro ponto1 (SP), 22°21'36"S; 47°30'42"O. **c.** Ribeirão Claro ponto2 (SP), 22°15'59,6"S; 0,47°32'27,5"O. **d.** Afluente do rio Corumbataí (SP), 22°16'6,2"S; 0,47°37'16,9"O. **e.** Afluente do rio Cabeça (SP), 22°18'39"S; 0,47°32'2,3"O. **f.** Córrego Guaçu, afluente da bacia do rio Igatemi (MS), 23°54'19,6"S e 54°21'43,4"O **19**

CAPÍTULO I

Figura 1. Coloração convencional com Giemsa. **a.** Cariótipo de *B. stramineus*. **b.** Cariótipo de *B. turiuba*. **c.** Cariótipo de *B. cf. iheringii*. Em evidência os pares Ag-RONs das respectivas espécies. Barra = 10 µm **56**

Figura 2. Bandamento C. **a.** Cariótipo de *B. stramineus*. **b.** Cariótipo de *B. turiuba*. **c.** Cariótipo de *B. cf. iheringii*. Barra = 10 µm..... **57**

Figura 3. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH). **a.** FISH com sondas de DNAr 5S no cariótipo de *B. stramineus*. Em destaque par marcado com sondas de DNAr 18S **b.** FISH com DNAr 5S no cariótipo de *B. turiuba*. Em destaque os pares marcados pelas sondas de DNAr 18S **c.** Double-FISH com sondas de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) no cariótipo de *B. cf. iheringii*. Barra = 10 µm..... **58**

Figura 4. Técnica de Double-FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). **a.** Marcações nos cromossomos de *B. turiuba*. **b.** Marcações nos cromossomos de *B. stramineus*. As setas indicam as marcações de rDNA 18S e as cabeças de seta indicam as marcações de DNAr 5S. Barra = 10 µm **59**

Figura 5. Idiograma representativo dos cromossomos de *B. stramineus* em **a.** *B. turiuba* em **b.** *B. cf. iheringii* em **c.** As caixas em vermelho representam as localizações de DNAr 18S e em verde as localizações de DNAr 5S. A caixa tracejada representa a região de constrição secundária **60**

Figura 6. Par cromossômico 24 de *B. cf. iheringii*. **a.** Representação de regiões de constrição secundária em tracejado. **b.** Representação do polimorfismo do par Ag-RON. **c.** Representação das localizações de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). A faixa hachurada representa a co-localização das duas sequências de DNAr **61**

Figura 7. Esquema representativo da digestão enzimática do gene *cyt-b* pelas enzimas de restrição *HpaII* e *BclI* em cinco indivíduos de cada espécie **62**

Figura 8. Árvore filogenética gerada no programa MEGA 4.0 pelo método de Máxima Parcimônia (MP). Os círculos pretos representam a hipótese do surgimento das características citogenéticas durante a evolução das três espécies **63**

CAPÍTULO II

Figura 1. Cariótipo de *P. argentea* em coloração convencional com Giemsa **77**

Figura 2. Cromossomos submetidos à técnica de impregnação por nitrato de prata. Em **A**, **B** e **C** variação de sistemas de RONS nas regiões terminais dos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos. **D.** Em destaque **1**, **2** e **3** variação dos cromossomos Ag-RONS e em **4** os pares oito e 16 ricos em bases GC **78**

Figura 3. **A.** Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S: as setas indicam cinco cromossomos marcados. **B.** FISH com sonda de DNAr 5S: as setas indicam quatro cromossomos marcados. **C.** Bandamento C. **D.** Dupla coloração CMA₃/DAPI evidenciando regiões GC ricas nos cromossomos portadores dos cístrons ribossomais 45S: a seta indica um cromossomo marcado e a cabeça de seta indica três marcações muito próximas **79**

CAPÍTULO III

Figura 1. **A.** Cariótipo de machos de *H. eques* sem a presença de cromossomo B. **B.** Cariótipo de fêmea de *H. eques* com a presença de um microcromossomo B em destaque **92**

Figura 2. **A.** Técnica de impregnação do nitrato de prata. As setas indicam as marcações Ag-RONs positivas. **B.** Cromossomos de machos de *H. eques* submetidos ao bandamento C. **C.** Metáfase de fêmea de *H. eques* corada com Giemsa. A seta indica cromossomo com constrição secundária (c.s.) e a cabeça de seta indica o microcromossomo B. **D.** Técnica de bandamento C sequencial. A seta indica a região C-positiva para a c.s. e a cabeça de seta indica marcação C-positiva para o microcromossomo **93**

CAPÍTULO IV

Figura 1. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. mexicanus*. Em evidência o microcromossomo B. **B.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum*. **C.** Cariótipo de *A. abramis*. Em evidência os pares Ag-RONs das respectivas espécies. Barra = 10 μ m. **112**

Figura 2. Bandamento C. **A.** Cariótipo de *A. mexicanus*. Em destaque o microcromossomo B. **B.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum*. **C.** Cariótipo de *A. abramis*. Barra = 10 μ m. **113**

Figura 3. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. fasciatus* do afluente do rio Cabeça. **B.** Cariótipo de *A. fasciatus* do Ribeirão Claro. **C.** Cariótipo de *A. fasciatus* do afluente do rio Corumbataí. Barra = 10 μ m. **114**

Figura 4. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. altiparanae* do córrego Guaçu. **B.** Cariótipo de *A. altiparanae* coletado no ICMBIO-CEPTA, Pirassununga-SP. Barra = 10 μ m **115**

Figura 5. Bandamento C. **A.** Metáfase de *A. fasciatus* do afluente do rio Cabeça. **B.** Metáfase de *A. fasciatus* do Ribeirão Claro. **C.** Metáfase de *A. fasciatus* do afluente do rio Corumbataí. Barra = 10 μ m. **116**

Figura 6. Coloração com cromomicina A₃. **A.** as setas indicam os braços curtos do par 2 CMA₃⁺ em *A. mexicanus*. **B.** As setas indicam as marcações CMA₃⁺ em *A. eigenmanniorum*. **C.** As setas indicam a região CMA₃⁺ do par 21 em *A. abramis*. **D.** DAPI-/CMA₃⁺ em cromossomos de *A. mexicanus*. **E.** DAPI-/CMA₃⁺ em cromossomos

de *A. eigenmanniorum*. **F.** Em destaque todos os marcadores citológicos utilizados marcaram a região de constrição secundária do par 21 de *A. abramis*..... **117**

Figura 7. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) **A.** Sítios de DNAr 18S em *A. mexicanus*. **B.** Sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. **C.** Sítios de DNAr 18S em *A. abramis*. **D.** Sítios de DNAr 5S em *A. mexicanus*. **E.** Sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. As setas indicam as regiões marcadas..... **118**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Dados citogenéticos no gênero <i>Bryconamericus</i> de diferentes localidades do Brasil	55
--	-----------

CAPÍTULO III

Tabela 1. Revisão bibliográfica de dados citogenéticos para espécies pertencentes ao gênero <i>Hyphessobrycon</i>	91
--	-----------

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Relação entre as espécies analisadas citogeneticamente, o número diploide, número fundamental (NF) e os respectivos locais de coleta.	111
---	------------

Tabela 2. Técnicas citogenéticas utilizadas nos cromossomos metafásicos das espécies do gênero <i>Astyanax</i> analisadas	111
--	------------

RESUMO

Dentre os Characiformes a família Characidae é o grupo com maior número de espécies da ordem apresentando peixes de pequeno e grande porte. A subfamília Tetragonopterinae, antes considerada como a subfamília com o maior número de espécies foi considerada como um grupo polifilético. A partir de então, somente o gênero *Tetragonopterus* foi mantido na subfamília e todos os demais gêneros de Tetragonopterinae foram alocados em *incertae sedis* dentro de Characidae. Muitos exemplares pertencentes a este grupo, já tiveram seus cromossomos estudados, demonstrando que o número diploide mais frequente é $2n=50/2n=52$ cromossomos. Outra característica marcante compartilhada por muitas espécies da família é o primeiro par metacêntrico maior do que os demais cromossomos do complemento A. Diante das problemáticas taxonômicas apresentadas na literatura para o grupo *incertae sedis* e considerando que ainda há muito que ser estudado sobre a citogenética dos mesmos, o presente trabalho constituiu em realizar análises dos cromossomos de espécies dos gêneros *Bryconamericus*, *Piabina*, *Hyphessobrycon* e *Astyanax*, visando detectar possíveis variações que permitam um melhor entendimento das relações evolutivas entre as populações desses gêneros em *incertae sedis*. Para tanto, os cromossomos das espécies *Bryconamericus stramineus* da bacia do rio Iguatemi - MS; *Bryconamericus turiuba*, *Bryconamericus* cf. *iheringii*, *Piabina argentea*, *Hyphessobrycon eques* e três populações de *Astyanax fasciatus* provenientes da bacia do rio Corumbataí - SP; *Astyanax abramis* do córrego Bento Gomes (MT); *Astyanax mexicanus* e *Astyanax eigenmanniorum* provenientes de loja de aquário e duas populações de *Astyanax altiparanae* provenientes do ICMBio-CEPTA - Pirassununga (SP) e córrego Guaçu (MS), foram analisados através de técnicas clássicas, como coloração com Giemsa, Ag-RON, banda-C e CMA₃ além da aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S. Análises moleculares também foram empregadas, tais como a técnica de PCR-RFLP e análise filogenética utilizando gene mitocondrial, para as espécies de *Bryconamericus*. São discutidas as variações citogenéticas encontradas em cada gênero, estabelecendo relações mais conclusivas entre as mesmas e formulando hipóteses evolutivas que serão importantes para o entendimento da citotaxonomia do grupo.

Palavras-chave: DNAr, FISH, evolução cariotípica, cromossomos B, variações Ag-RONs.

ABSTRACT

Among the Characiformes, the Characidae family is the largest group of the order involving large and small fish. The subfamily Tetragonopterinae, previously considered as the subfamily with the greatest number of species was considered as a polyphyletic group. Since then, only the genus *Tetragonopterus* was kept in the subfamily and all other Tetragonopterinae species were considered as *incertae sedis* within Characidae. Many specimens belonging this group had been their chromosomes studied, demonstrating that the most frequent diploid number is $2n=50/52$ chromosomes. Another striking feature shared by many species of the family is the first metacentric pair larger than the other chromosomes of the complement A. Given the taxonomic problems presented in the literature for the group *incertae sedis* and considering that much remains to be studied about the cytogenetics of these group, the present work was to perform analysis of chromosomes of the genus *Bryconamericus*, *Piabina*, *Astyanax* and *Hyphessobrycon*, to detect possible variations that allow a better understanding of evolutionary relationships among populations in these genus in *incertae sedis*. The chromosomes of *Bryconamericus stramineus* Iguatemi River basin - MS; *Bryconamericus turiuba*, *Bryconamericus* cf. *iheringii*, *Piabina argentea*, *Hyphessobrycon eques* and tree populations of *Astyanax fasciatus* from Corumbataí River basin – SP; *Astyanax abramis* from stream Bento Gomes (MT); *Astyanax mexicanus* and *Astyanax eigenmanniorum* from aquarium store and two populations of *Astyanax altiparanae* from the ICMBio-CEPTA - Pirassununga (SP) and stream Guaçu (MS) were analyzed using classical techniques such as Giemsa staining, Ag-RON, C-band and CMA₃ addition to applying the technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 18S and 5S rDNA probes. Molecular analysis, such as PCR-RFLP and phylogenetic analysis using mitochondrial gene for species *Bryconamericus* were also used. Chromosomes variations are discussed about all the genus studied, establishing more conclusive relationships among them and formulating evolutionary hypotheses that will be important for understanding the citotaxonomy group.

Keywords: rDNA, FISH, karyotype evolution, B chromosomes, Ag-NORs variations.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a ictiofauna Neotropical

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, aproximadamente 6.000 encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são descritas e cerca de 1.550 são reconhecidas como entidades taxonômicas, porém ainda não descritas formalmente. A fauna de peixes de águas continentais do Brasil é a mais rica do mundo com cerca de 2.587 espécies já descritas e existindo ainda, muitas desconhecidas (BUCKUP et al., 2007). Dentro desse universo de espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi, dentro da qual se encontra a ordem Characiformes, representando 71% da ictiofauna de água doce Neotropical (FINK; FINK, 1981; REIS et al., 2003).

A ordem Characiformes é exclusivamente de água doce e seus representantes encontram-se distribuídos entre as Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens Neotropicais (BUCKUP, 1998). Essa ordem compreende 1.460 espécies distribuídas em 14 famílias, sendo quatro africanas e as demais Neotropicais (REIS et al., 2003). Os Characiformes apresentam 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 mais de um metro de comprimento total, até espécies cujas formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total (WEITZMAN; VARI, 1988).

Dentre os Characiformes a família Characidae é o grupo com maior número de espécies da ordem. De acordo com Reis et al. (2003), aproximadamente 12 subfamílias, 184 gêneros e 950 espécies são relatadas para a família. Seus representantes estão presentes em diversos ambientes de água doce e distribuem-se no continente americano desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina e também no continente Africano (LUCENA, 1993; FROESE; PAULY, 2004).

A família Characidae apresenta desde peixes de pequeno porte, como os lambaris, até peixes de grande porte, tais como os dourados que podem ultrapassar um metro de comprimento (BRITSKI, 1972). Ao longo dos anos, muitos integrantes dessa família vem sofrendo modificações na sua classificação. Sabe-se que as relações filogenéticas entre os membros do grupo é duvidosa, no aspecto de representar um grupo polifilético, o que é muito discutido até o presente momento.

De acordo com Fink e Fink (1981), a posição taxonômica de Characidae é a seguinte:

CLASSE: Osteichthyes

SUBCLASSE: Actinopterygii

INFRACLASSE: Teleostei

SUPERORDEM: Ostariophysi

ORDEM: Characiformes

FAMÍLIA: Characidae

1.2. O grupo *incertae sedis* dentro de Characidae

A subfamília Tetragonopterinae, antes considerada como a subfamília mais bem sucedida em Characidae (GÉRY, 1977), foi considerada como um grupo polifilético por Lima et al. (2003). Numa última revisão, somente o gênero *Tetragonopterus* foi mantido na subfamília e todos os demais gêneros de Tetragonopterinae foram considerados como *incertae sedis* dentro de Characidae (REIS et al., 2003). A partir de então, 88 gêneros e 620 espécies, anteriormente considerados como integrantes das subfamílias Tetragonopterinae, Cheirodontinae, Characinae, Bryconinae, Paragoniatinae e Aphyocharacinae foram alocados em *incertae sedis* na família Characidae (REIS et al., 2003).

Entre os gêneros alocados em *incertae sedis*, estão alguns dos grupos com maior quantidade de espécies e taxonomicamente muito confusos de Characidae, como *Hyphessobrycon* (97 espécies), *Astyanax* (86 espécies), *Moenkhausia* (58 espécies), *Bryconamericus* (51 espécies), *Hemigrammus* (43 espécies), entre outras (REIS et al.,

2003). Portanto, somente as subfamílias de Characidae que apresentavam alguma evidência de monofilia foram mantidas no grupo, sendo elas: Clupeacharacinae (Uma espécie), Agoniatinae (Duas espécies), Tetragonopterinae (Duas espécies), Roadsiinae (Seis espécies), Aphyocharacinae (Dez espécies), Stethaprioninae (12 espécies), Bryconinae (43 espécies), Cheirodontinae (46 espécies), Glandulocaudinae (50 espécies), Characinae (70 espécies) e Serrasalminae (72 espécies), num total de 79 gêneros e cerca de 325 espécies (REIS et al., 2003).

1.3. Estudos citogenéticos em espécies alocadas em *incertae sedis*

A maioria das espécies em Characidae apresenta $2n=50/2n=52$ cromossomos, sendo que uma característica marcante compartilhada por muitas espécies da família o primeiro par metacêntrico maior do que os demais cromossomos do complemento A. De acordo com Scheel (1973) a estrutura cariotípica dos integrantes da família Characidae pode ser caracterizada por apresentar o par metacêntrico grande, sendo tal característica compartilhada por grande parte das espécies da família. A partir desse trabalho, a constatação foi corroborada por diferentes autores como Salvador e Moreira-Filho (1992), Maistro et al. (1992), Margarido e Galetti (1996), Vicente et al. (1996), entre outros. Mais interessante ainda, é o compartilhamento de tal característica entre todas as espécies do gênero *Astyanax*, em exemplares de *Hyphessobrycon* que apresentam $2n=50$ cromossomos, em *Moenkhausia*, *Hemigrammus*, entre outros.

O gênero de *incertae sedis* mais estudado citogeneticamente é *Astyanax*. Diversas fórmulas cariotípicas entre diferentes populações de uma mesma espécie de *Astyanax* são características comumente relatadas na literatura para o gênero. Além disso, estudos citogenéticos no gênero mostram uma ampla variação do número diploide de $2n=36$ cromossomos em *Astyanax schubarti* (MORELLI et al., 1983) a $2n=50$ cromossomos para a maioria das espécies analisadas (JIN; TOLEDO, 1975; entre outros). Algumas espécies também são consideradas como complexos de espécies em *Astyanax*, tais como o “complexo *scabripinnis*” denominado por Moreira-Filho e Bertollo (1991) no qual o número

diploide varia em $2n=46$, 48 e 50 cromossomos e o “complexo *fasciatus*” onde o número diploide pode variar entre $2n=45$ a $2n=50$ cromossomos (CENTOFANTE et al., 2003).

A distribuição da macroestrutura da heterocromatina é bem estudada no gênero *Astyanax*. Por exemplo, Fernandes e Martins-Santos (2003) analisaram duas populações de *Astyanax scabripinnis* da bacia do rio Ivaí (Estado do Paraná, Brasil) e observaram um padrão similar de distribuição da heterocromatina constitutiva entre as duas populações, porém foi notada uma variação inter e intra-individual de blocos heterocromáticos. Segundo os autores blocos grandes e fortemente corados foram observados nas regiões teloméricas e subtelocêntricas e em cromossomos acrocêntricos. Mantovani et al. (2000) também relataram uma similar variação inter-individual em populações de *A. scabripinnis* provenientes dos córregos Centenário e Marrecas (Bacia do rio Paranapanema). Outras populações também apresentaram variação inter e intra-individual de blocos de heterocromatina assim como diferentes números de cromossomos Ag-positivos.

As regiões organizadoras de nucléolo (RONS) são bem estudadas no gênero, apresentando uma grande variação de número e posições marcadoras. Medrado et al. (2008) relataram, para três populações de *Astyanax fasciatus* pertencentes a rios de bacias nordestinas, três padrões de marcações Ag-RONS. Os autores descrevem que a população do rio Contas apresentou marcação na posição terminal do braço longo de um par subtelocêntrico e outro submetacêntrico, além de uma marcação na posição terminal do braço curto de um par metacêntrico. No entanto, as outras duas populações do rio Preto da Costa e córrego Mineiro apresentaram um par subtelocêntrico marcado pelo nitrato de prata, sendo que o mesmo parece ser o par Ag-RON principal. Vicari et al. (2008) relataram variações em número inter e intra-individual de cromossomos Ag-RONS marcados nas posições teloméricas para *Astyanax paranae* e *A. scabripinnis*.

Outros gêneros também são estudados citogeneticamente, tais como *Bryconamericus*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia*, *Hemigrammus*, *Piabina*, entre outros, ainda que não tão bem como as espécies do gênero *Astyanax*. Porém os dados existentes

na literatura ainda são pequenos frente ao grande número de informações que um estudo citogenético pode proporcionar.

1.4. Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em *incertae sedis*

Dentre as espécies do gênero extensivamente estudadas estão *Astyanax altiparanae*, *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*. A sequência repetitiva mais conhecida para o gênero é o DNA ribossomal (DNAr) 18S, parte da família multigênica do DNAr 45S. Esta apresenta uma grande variedade de localizações cromossômicas, principalmente entre as populações estudadas. Por exemplo, Fernandes e Martins-Santos (2006) relataram para quatro populações de *A. altiparanae* proveniente da bacia do rio Paraná, quatro sítios de DNAr 18S para as populações do rio Paraná, córrego Tatupeba e córrego Maringá, e sete sítios de DNAr 18S para a população do córrego Keçaba. Por outro lado, uma população de *A. altiparanae* do córrego Monjolinho (Bacia do Alto Paraná, São Carlos, SP) apresentou apenas dois sítios de DNAr 18S (PERES et al., 2008). Além desse trabalho, há muitos outros relatando diferentes números e posições de sítios de DNAr 18S para as espécies de *Astyanax* (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006a,b; KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007; HASHIMOTO et al., 2008; PERES et al., 2008).

Outra sequência repetitiva bem conhecida para o gênero *Astyanax* é o DNAr 5S, mostrando ser conservada para algumas espécies do gênero. Esse padrão conservado pode ser compartilhado entre *A. scabripinnis*, *A. paranae* e *A. bockmanni*, as quais apresentaram um par metacêntrico marcado na porção pericentromérica e um par acrocêntrico marcado na porção subterminal (MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008; KAVALCO et al., 2009). Foi possível notar ainda que em *A. altiparanae* as sequências de DNAr 5S estão localizadas em um par submetacêntrico assim como em outras diferentes populações estudadas citogeneticamente. (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006a; DOMINGUES et al., 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009).

Outros gêneros em *incertae sedis* também apresentam estudos de mapeamento do DNAr 18S para algumas espécies. Paintner-Marques et al. (2002) estudaram uma população

de *Bryconamericus* aff. *exodon* coletada no córrego Três Bocas (Bacia do rio Tibagi, PR) e verificaram oito sítios de DNAr 18S. Os mesmos autores relataram em 2003 dois sítios de DNAr 18S para *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Água da Floresta (Bacia do rio Tibagi, Paraná. Mais tarde, Capistano et al. (2008) relataram para três populações de *B.* aff. *iheringii* de dois sistemas hidrográficos (Rio Paranapanema e rio Ivaí), três citótipos diferentes além de uma notável variação em número de RONS. Nesse estudo, o Citótipo I (Córrego Maringá) mostrou seis sítios de DNAr 18S, o Citótipo II (Rio Keller) mostrou dez sítios de DNAr 18S e o Citótipo III (Córrego Tatubepa) apresentou dois sítios de DNAr 18S.

No gênero *Hyphessobrycon* a localização desse tipo de sequência repetitiva é menos conhecida ainda frente ao número de espécies descritas. Centofante et al. (2003) analisaram duas populações de *Hyphessobrycon anisitsi* e verificaram treze sítios de DNAr 18S para os exemplares do rio Piracuama (Afluente do rio Paraíba do Sul) e dez sítios para os exemplares do Ribeirão dos Perdizes (Afluente do rio Sapucaí).

Para o gênero *Piabina*, Peres et al. (2008) relataram para uma população de *Piabina argentea* do rio São Francisco (MG) seis sítios de DNAr 18S e quatro sítios de DNAr 5S. Embora existam dados sobre o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas, principalmente DNAr 18S e 5S, em alguns gêneros em *incertae sedis*, estas ainda não são descritas para muitas espécies, como por exemplo, para espécies dos gêneros *Moenkhausia* e *Hemigrammus*.

Além das sequências repetitivas mais comuns, como o DNAr 18S e 5S, outras sequências repetitivas vem sendo estudadas em diferentes espécies alocadas em *incertae sedis* de Characidae, como por exemplo o DNA satélite As51, que foi caracterizado para os cromossomos de algumas espécies de *Astyanax*. De acordo com Mantovani et al. (2004) duas populações de *A. scabripinnis* com os números diploides $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos demonstraram, através da técnica de FISH, certa similaridade de posição dessa família de DNA repetitivo com a heterocromatina constitutiva anteriormente revelada pela técnica de banda-C. Os autores verificaram que os grandes blocos heterocromáticos localizados na posição terminal, principalmente em cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos,

apresentaram homologia com as sequências As51. Também foram notadas variações de número e quantidade de heterocromatina distal e de marcações As51 em ambas as populações (MANTOVANI et al., 2004).

O padrão de distinção da heterocromatina constitutiva é um dos melhores marcadores cromossômicos para distinção das populações de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MAISTRO et al., 1998) e *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006), e estudos com sequências As51 apresentaram similaridade com grandes blocos de heterocromatina constitutiva, indicando que o processo de diferenciação da heterocromatina-As51 pode estar envolvido na ação de especiação em *Astyanax* (KANTEK et al., 2009). As sequências As51 também foram observadas em outras espécies, tais com *A. paranae*, *Astyanax janeiroensis*, *Astyanax* sp. D e *Astyanax hastatus* (VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009; KAVALCO et al., 2009).

Além dessas sequências repetitivas, outras sequências não muito estudadas para *Astyanax*, tais como genes de histona e o retrotransposon *Rex*, ainda que este último publicado somente nos formatos de teses e resumos de eventos científicos, vêm apresentando interessantes atribuições. Recentemente, Hashimoto et al. (2011) estudaram a localização cromossômica da histona H1 em três espécies de *Astyanax*, mostrando que os genes de DNAr 5S e histona H1 apresentavam sintonia em um par metacêntrico em *A. bockmanni* (Par 2) e *A. fasciatus* (Par 3) e um par submetacêntrico em *A. altiparanae* (Par 12). Esses estudos recentes envolvendo sequências repetitivas, apresentados por diferentes autores para espécies em *incertae sedis* em Characidae, vêm confirmando ser estes bastante interessantes para estudos evolutivos em peixes, assim como a importância delas para comparações citotaxonômicas do grupo.

1.5. Cromossomos B: Características gerais e perspectivas

O termo “cromossomo B” inclui uma variedade de cromossomos extras que mostram heterogeneidade em sua natureza, comportamento e dinâmica evolutiva. Por essa razão, não existe uma definição propriamente dita sobre o que é cromossomo B, mas um consenso

de propriedades proposto por diversos pesquisadores durante a primeira conferência internacional, *First B-Chromosome Conference* (Espanha, 1993), e publicado por Beukeboom em 1994. Nesta publicação foi considerado que “cromossomos B são cromossomos adicionais dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações em algumas espécies, que provavelmente se originaram dos cromossomos A, mas seguem sua própria evolução”.

Muitos trabalhos foram publicados sobre a ocorrência e a frequência dos cromossomos B em fungos, plantas e animais, porém pouco se sabe sobre seu comportamento meiótico. É sabido que durante a meiose, cada cromossomo A emparelha-se com seu homólogo para formar um bivalente na primeira divisão, com base nas leis de segregação mendeliana. Porém, os cromossomos B nem sempre formam pares e mantêm seu próprio comportamento meiótico como um univalente durante a meiose. Dessa forma, os univalentes são livres para segregarem preferencialmente para um polo meiótico específico e por esse motivo, resultam numa alta transmissão (50%) proporcionada pela lei mendeliana (CAMACHO, 2005).

O processo de transmissão dos cromossomos B durante a divisão celular parece não seguir o padrão de segregação comum, tendo um comportamento estável durante as divisões mitóticas ou meióticas, geralmente apresentando não-disjunção na anáfase (JONES, 1975). Não se sabe ao certo quais são as vantagens proporcionadas na transmissão do cromossomo B para a prole, mas a variedade de processos incluindo distorção de segregação é usualmente conhecida como “mecanismos de acumulação” ou simplesmente “direção”, que pode ocorrer em qualquer estágio durante o ciclo de vida (CAMACHO et al., 2000).

Outra característica muito discutida é a natureza heterocromática dos cromossomos B, suportando uma ideia geral de que esses elementos são inertes. Por outro lado, estudos demonstraram que cromossomos B podem apresentar atividade transcricional, como tem sido apresentado em cromossomos no estado plumoso na rã *Leiopelma hochstetteri* (GREEN, 1988) ou no estado politênico do mosquito *Simulium juxtacrenobium*

(BROCKHOUSE et al., 1989). Além disso, muitos cromossomos B foram encontrados carregando genes ribossomais. López-Leòn (1994) e Delgado (1995) juntamente com seus colaboradores demonstraram que os cromossomos B podem interferir na atividade normal do DNA ribossômico. Foram verificados pelos autores inativações de cístrons ribossomais em células de centeio, enquanto que no gafanhoto *Euprepocnemis plorans* foram identificadas mudanças no padrão das RONS quando constatada a presença desses cromossomos. Entretanto, por mais que estudos demonstrem algumas particularidades em suas propriedades, essas não seguem uma regra comum aos organismos que os possuem, tornando difícil sua caracterização.

Hipóteses a respeito da origem dos cromossomos B têm sido propostas na tentativa de elucidar tal enigma. Uma delas é a origem intraespecífica na qual os cromossomos B surgiram do complemento A, porém seguem um caminho evolutivo independente (JAMILENA et al., 1994, 1995; HOUBEN et al., 1996; CAMACHO et al., 2000). De acordo com Camacho et al. (2000), a caracterização molecular da sequência de DNA repetitivo específica para cromossomos B e que são compartilhadas também por cromossomos A de outras espécies, fornecem subsídios que reforçam tal hipótese de origem destes elementos genômicos.

Outra hipótese é a de origem interespecífica no qual os cromossomos B surgiram a partir de cruzamentos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização (SAPRE; DESHPANDE, 1987; EICKBUSH et al., 1992; MCVEAN, 1995; SCHARTL et al., 1995; CAMACHO et al., 2000; PERFECTTI; WERREN, 2001; VUJOSEVIC; BLAGOJEVIC, 2004). A origem do cromossomo B como decorrência desse processo foi comprovada por Perfectti e Werren (2001) ao observarem a presença de cromossomos B em uma linhagem de vespas do gênero *Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre duas espécies diferentes, *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

Cromossomos sexuais também foram previamente propostos como ancestrais dos cromossomos B, desde que possam ser tolerados no estado polissômico (HEWITT, 1973). Um exemplo de cromossomo sexual que pode ter originado um cromossomo B é o caso do

cromossomo B₂ do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, no qual o rearranjo de duas sequências repetitivas de DNA em seu respectivo centrômero coincide especificamente com a do cromossomo X (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994). Isso sugere que o cromossomo B de *E. plorans* tenha sido derivado da região paracentromérica do cromossomo X, com subsequente amplificação de dois tipos de sequências contidas nela (CAMACHO et al., 2000).

Foresti (1998) sugere, em outra hipótese, que os cromossomos B poderiam ter sua origem em um processo denominado “de novo”, em tentativas da natureza de formar constantemente novas unidades genômicas. De acordo com o autor, sequências de nucleotídeos formadas continuamente pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados, com a adição ao acaso de sequências centroméricas e teloméricas, permitiriam a formação e manutenção dessas estruturas no genoma. Tais segmentos seriam neutros e sem produtos gênicos, até que elementos transponíveis ativos pudessem ser agregados.

Posteriormente, diferentes postulações têm sido formuladas para explicar a evolução independente dos cromossomos B no genoma de seus organismos portadores. Camacho et al. (2000) afirmam que, subsequentemente ao isolamento sináptico do cromossomo B e independente de sua origem, também processos de evolução molecular, passaram a ocorrer, determinando uma morfologia degenerada para esses segmentos genômicos. Dessa forma, as suas características morfológicas e estruturais seriam mais um reflexo de processos de evolução molecular do que a forma em que foram originados. Diante disso, é visível que os cromossomos supranumerários não apresentam um modelo de origem comum, ou seja, podem ter se originado de forma independente seguindo diferentes vias evolutivas.

1.6. Cromossomos B em *incertae sedis*

Os cromossomos B são encontrados em aproximadamente 40 espécies de peixes Neotropicais de diferentes táxons (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; OLIVEIRA et al.,

1997). Esses podem ter diferentes tamanhos e morfologias entre os indivíduos de uma mesma espécie como é o caso do trabalho apresentado por Fernandes e Martins-Santos (2005) que analisaram citogeneticamente exemplares de *Astyanax scabripinnis* do córrego Tatupeba, bacia do rio Ivaí e encontraram três citótipos distintos referentes à presença de cromossomos supranumerários. No primeiro citótipo os indivíduos exibiram um macrocromossomo B do tipo metacêntrico totalmente heterocromático, no segundo citótipo os animais portavam macrocromossomos B dos tipos metacêntrico e acrocêntrico, parcialmente heterocromáticos e no terceiro citótipo, diferentemente do segundo, os exemplares apresentaram a mais macrocromossomos B do tipo submetacêntrico.

Ao estudarem a espécie *A. scabripinnis*, Mestriner et al. (2000) e Néo et al. (2000a), detectaram a presença de sequências repetitivas em ambos os braços de um macrocromossomo B, semelhante à heterocromatina do par 24 do complemento A, reforçando, dessa forma, argumentos favoráveis sobre a hipótese de origem desses macrocromossomos extras a partir de isocromossomos. Os isocromossomos são cromossomos com braços homólogos, podendo surgir de várias formas, uma delas pode ser através da fusão de dois cromossomos acrocêntricos idênticos (SUMNER, 2003). Por outro lado, Salvador e Moreira-Filho (1992) realizaram o estudo da origem dos cromossomos B em uma população de *A. scabripinnis*, proveniente do município de Campos do Jordão e, segundo os autores, o elemento B nessa população poderia estar associado à não-disjunção mitótica do primeiro par cromossômico durante a divisão celular, seguida por um processo de heterocromatização comprovado pela técnica de bandamento C.

Porto-Foresti et al. (1997) analisaram a ocorrência de cromossomos B na espécie *Astyanax scabripinnis paranae* em três trechos distintos do córrego Cascatinha, um pequeno tributário do rio Tietê, Botucatu, SP, onde o primeiro trecho analisado correspondia à cabeceira do córrego localizado a 880 metros acima do nível do mar, o segundo trecho compreendia o curso médio a 860 metros acima do nível do mar e o terceiro trecho correspondia ao final do curso do córrego antes de desaguar no rio Tietê com 820 metros de altitude. As análises dos exemplares desta espécie coletados nessas três localidades

apresentaram um número diploide de $2n=50$ cromossomos, além da presença de um macrocromossomo extra em 60% dos animais provenientes do primeiro trecho analisado, enquanto nos demais trechos a frequência foi cerca de 30%. Assim, foi considerada que as condições ambientais poderiam conferir uma vantagem seletiva para os peixes habitantes da cabeceira do córrego em relação aos peixes dos outros dois trechos.

Segundo Néo et al. (2000b) estudos realizados em três populações de *A. scabripinnis*, provenientes de localidades em diferentes altitudes de um mesmo riacho na região de Campos do Jordão, SP, revelaram a presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1.920 metros e 1.800 metros), e sua ausência na população de baixa altitude (700 metros). Portanto, a presença desses elementos poderia ser determinada por características ambientais favoráveis para a espécie (NÉO et al., 2000b).

Mesmo que o número de estudos sobre cromossomos B seja relativamente grande em gêneros alocados em *incertae sedis*, não foram descritos a presença até o presente momento deste tipo de elemento genômico extra em outros gêneros diferente de *Astyanax*, tais como *Bryconamericus*, *Hemigrammus*, *Piabina*, entre outros. Contudo, considerando que a maioria dos estudos em peixes é baseada em técnicas citogenéticas convencionais, análises moleculares adicionais podem levar a um melhor entendimento da composição, estrutura, origem e evolução desses elementos genômicos peculiares. Embora o número de trabalhos baseados em técnicas citogenéticas moleculares tenha sido ampliado com certa frequência nos últimos anos, o entendimento a respeito dos cromossomos B ainda não é inteiramente claro.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho constituiu em realizar análises dos cromossomos de espécies dos gêneros *Bryconamericus*, *Piabina*, *Hyphessobrycon* e *Astyanax*, visando detectar possíveis variações permitindo um melhor entendimento das relações evolutivas entre as diferentes espécies dos gêneros, objetos deste estudo, alocadas em *incertae sedis*. Assim os objetivos principais deste trabalho foram:

- a) Analisar citogeneticamente representantes dos quatro gêneros citados acima, através da montagem de kariótipos;
- b) Comparar os marcadores citogenéticos entre as diferentes espécies dos gêneros *Bryconamericus* e *Astyanax*, afim de um melhor esclarecimento das relações evolutivas entre as mesmas;
- c) Analisar diferentes marcadores citogenéticos em *P. argentea* e *H. eques*;
- d) Investigar a estrutura dos cromossomos quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina banda-C positiva;
- e) Verificar o mapeamento físico das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) pelo nitrato de prata e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S , assim como a localização do DNAr 5S nos cromossomos das espécies analisadas;
- f) Identificar através de técnicas moleculares, tais como a análise de fragmentos de restrição e sequenciamento de DNA, as espécies de *Bryconamericus*;

Materials

3. MATERIAIS

As coletas foram iniciadas após a concessão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio – através da autorização para atividades com finalidade científica: SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Anexo I).

Os exemplares de *Bryconamericus turiuba* Langeani et al., 2005, e *Piabina argentea* Reinhardt, 1866, foram coletados no afluente do rio Passa-Cinco (Figura 1a); os exemplares de *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882, foram coletados no Ribeirão Claro ponto 1 (Figura 1b); *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 no Ribeirão Claro ponto 2, afluentes dos rios Corumbataí e Cabeça (Figura 1c,e); os exemplares de *Bryconamericus* cf. *iheringii* Boulenger, 1887 no afluente do rio Corumbataí (Figura 1d); *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 no ICMBio-CEPTA (Centro Especializado do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade) do município de Pirassununga (SP) e no córrego Guaçu pertencente ao município de Mundo Novo (MS) (Figura 1f); *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 no córrego Guaçu (MS) (Figura 1f). Foram também coletados exemplares de *Astyanax abramis* Jenyns, 1842 no córrego Bento Gomes em Mato Grosso (MT) e *Astyanax mexicanus* De Filippi, 1853 e *Astyanax eigenmanniorum* Cope, 1894 foram obtidos em loja de aquário.

Para as coletas foram utilizados aparelhos de pesca variados como redes de arrasto, covos, peneiras e equipamento de pesca elétrica. Os exemplares coletados no Estado de São Paulo foram mantidos em aquários no Laboratório de Citogenética Geral da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro, SP. Para cada exemplar foi fornecido um número de identificação e foi obtido o sexo, o qual foi identificado com o auxílio de microscópio óptico. Os exemplares foram narcotizados, utilizados para preparações citogenética, fixados em álcool a 70%, enviados para o Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu e identificados pelo mestrando Ricardo Britski, do Programa de Pós-Graduação em Zoologia daquele Instituto, e posteriormente depositados na coleção ictiológica do Departamento de Biologia da UNESP-Rio Claro. As espécies nas

quais a identificação permaneceu duvidosa foram encaminhadas ao Dr. Francisco Langeani Neto do Departamento de Zoologia da UNESP de São José do Rio Preto para identificação.

Os exemplares coletados no córrego Guaçu, MS foram levados para o laboratório de Citogenética e Mutagenese da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), usados para obtenção de preparações citogenéticas e depositados na coleção do Departamento de Biologia da UNESP-Rio Claro.



Figura 1. As imagens representam os locais de coleta no Estado de São Paulo e no Estado de Mato Grosso do Sul **a.** Afluentes do rio Passa-Cinco (SP), 22°23'25,4"S; 47°50'47,8"O. **b.** Ribeirão Claro ponto 1 (SP), 22°21'36"S; 47°30'42"O. **c.** Ribeirão Claro ponto 2 (SP), 22°15'59,6"S; 0,47°32'27,5"O. **d.** Afluentes do rio Corumbataí (SP), 22°16'6,2"S; 0,47°37'16,9"O. **e.** Afluentes do rio Cabeça (SP), 22°18'39"S; 0,47°32'2,3"O. **f.** Córrego Guaçu, afluentes da bacia do rio Iguatemi (MS), 23°54'19,6"S e 54°21'43,4"O.

Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Estimulação de células mitóticas

Para aumentar a quantidade de células mitóticas nas preparações, foi utilizada a técnica de injeção prévia de uma solução de fermento biológico nos animais, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para répteis e anfíbios e adaptada por Oliveira et al. (1988) para peixes. O protocolo foi o seguinte:

- 1) Preparar de uma solução de fermento biológico na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 mL de água destilada. Encubar em estufa por aproximadamente 20 minutos;
- 2) Injetar esta solução na região dorso-lateral do animal, na proporção de 1 mL para 100 g de peso vivo. Manter o animal em um aquário bem aerado e com a temperatura em torno de 26 °C por um período de aproximadamente 48 horas.

4.2. Obtenção de cromossomos mitóticos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células extraídas das porções anterior e posterior do rim, segundo a metodologia de Foresti et al. (1981), com algumas modificações. O procedimento consiste em:

- 1) Injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 mL para cada 100 g de peso do animal;
- 2) Deixar o peixe em aquário bem aerado, por 50 minutos;
- 3) Efetuar uma excisão abdominal, utilizando uma tesoura, partindo do ânus do animal até a região anterior. Logo após, realizar um corte lateral e paralelo às brânquias, e por último retirar a porção anterior e posterior do rim, e quando necessário as brânquias;
- 4) Colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo 7 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075 M;

- 5) Fragmentar bem o material com o auxílio de pinças de dissecação e completar esse processo com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha para se obter uma suspensão celular homogênea;
- 6) Colocar a suspensão obtida a 37 °C, em estufa, durante 21 minutos;
- 7) Retirar da estufa, ressuspender cuidadosamente o material com o auxílio de pipeta Pasteur, e transferir a solução para um tubo de centrífuga. Adicionar 7 gotas de fixador gelado (Metanol e Ácido Acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 8) Adicionar cerca de 6 mL de fixador gelado e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga durante 9 minutos a 1.000 rpm; descartar o sobrenadante com pipeta Pasteur;
- 9) Ressuspender o precipitado em 7 mL de fixador gelado e centrifugar por 9 minutos a 1.000 rpm;
- 10) Repetir o item 9 por duas ou três vezes;
- 11) Após a última centrifugação, retirar o sobrenadante e adicionar 1,5 mL de fixador, transferindo a solução para um microtubo do tipo Ependorf.
- 12) Pingar o material em lâmina e deixar secar ao ar;
- 13) Corar com corante Giemsa a 10% diluída em solução tampão com pH ajustado em 6,8 por 10 minutos.
- 14) Lavar em água corrente e deixar secar ao ar, analisar a lâmina em microscópio óptico.

4.3. Montagem dos cariótipos

De acordo com a classificação frequentemente utilizada para cromossomos de peixes, a morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão de braços, onde o braço longo (q) é dividido pelo braço curto (p). Os cromossomos com dois braços foram classificados como metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*) e subtelocêntricos (*st*), com as

razões compreendidas entre 1,0 a 1,70 para *m*, 1,71 a 3,0 para *sm* e 3,01 a 7,0 para *st*. Os cromossomos com um braço foram considerados como acrocêntricos (*a*) com a razão acima de 7,0. Para o cálculo do número fundamental (NF) os cromossomos homólogos *m*, *sm* e *st* foram considerados como cromossomos de dois braços e os *a* com um braço.

4.4. Localização da heterocromatina

Para o estudo da heterocromatina foi utilizada a técnica de Summer (1972), seguindo os procedimentos abaixo:

- 1) Tratar a lâmina já contendo as gotas do material para análise, com HCl a 0,2 N em temperatura ambiente, por 15 minutos;
- 2) Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.
- 3) Incubar em solução salina de 2xSSC, a 60 °C em banho-maria por 15 minutos.
- 4) Lavar em água corrente e secar ao ar;
- 5) Incubar a lâmina por 30 segundos em solução de hidróxido de bário (Ba(OH)_2) a 5%, sendo recém preparada e filtrada, em banho-maria a 42 °C;
- 6) Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl 0,2 N, e depois em água destilada, deixar secar ao ar;
- 7) Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60 °C, por 1 hora;
- 8) Lavar em água destilada e secar ao ar;
- 9) Corar com Giemsa tamponada (pH 6,8) a 5% durante 5-10 minutos;
- 10) Lavar com água destilada e secar ao ar, analisar a lâmina em microscópio.

4.5. Localização das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata:

A metodologia para detecção das regiões organizadoras de nucléolo com uso de nitrato de prata (AgNO_3), foi realizada de acordo com a técnica de Howell e Black (1980) abaixo descrita:

- 1) Hidrolisar o material contido na lâmina por 3 minutos em HCl 1 N a 60 °C, em estufa;

- 2) Lavar em água corrente e secar ao ar;
- 3) Pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina, sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada;
- 4) Adicionar sobre as gotas anteriores, duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3), e cobrir a lâmina com lamínula;
- 5) Incubar em estufa a 60 °C por um período de 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada;
- 6) Lavar em água corrente e secar ao ar, analisar em microscópio.

4.6. Dupla coloração CMA_3 /DAPI com cromossomos desnaturados

As regiões cromossômicas ricas em bases GC e AT foram detectadas utilizando a metodologia frequentemente utilizada no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro, descrita abaixo:

- 1) Colocar as lâminas em solução de formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 2 minutos;
- 2) Preparar duas cubas com 2xSSC gelado e colocar as lâminas em cada cuba por 2 minutos cada;
- 3) Passar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100%, 2 minutos cada. Deixar as lâminas secarem bem;
- 4) Montar as lâminas com 30 μL de cromomicina A_3 (CMA_3), deixar atuar por 1 hora em câmara escura na geladeira;
- 5) Passar as lâminas por três banhos de PBS 1x por 2 minutos cada;
- 6) Não deixar secar, montar as lâminas com 30 μL de DAPI+*antifading*, deixar atuar por 30 minutos. Após analisar em microscópio de fluorescência.

4.7. Extração de DNA

A metodologia de extração de DNA foi empregada de acordo com a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico de Sambrook (2001), com modificações realizadas no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro:

1ª etapa

Para cada amostra a ser extraída, usar 300 μ L TNE 1x, 30 μ L Tris-HCL 1mL (pH 8,0) e 20 μ L SDS 10%. Estes reagentes são colocados em tubos do tipo Eppendorf (1 tubo para cada extração) juntamente com 500 μ L de Proteinase K (10 mg/mL) em cada um. Passar os tubos no vórtex por cerca de 15 segundos e colocar em estufa à 37 °C *overnight* (aproximadamente 14 horas).

2ª etapa

Passar os tubos novamente no vórtex e adicionar em cada um 8 μ L de RNase (10 mg/mL). Passar os tubos mais uma vez no vórtex. Colocar em estufa à 37 °C por 1 hora. Adicionar 400 μ L de fenol clorofórmio em cada tubo e agitar para misturar o material. Transferir o sobrenadante para outro tubo (fase aquosa contendo DNA) e adicionar 60 μ L de acetato de sódio (NaAc) 3 M pH 5,3, e 600 μ L de álcool absoluto. Inverter o tubo lenta e repetidamente para a mistura do material. Retirar a “nuvem” de DNA e colocar em outro tubo. Adicionar 1.000 μ L de etanol 100%.

3ª etapa

Centrifugar o material por 30 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante . Adicionar 150 μ L de etanol 70% gelado, centrifugar o material novamente por 30 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante. Adicionar 150 μ L de etanol 70% gelado, centrifugar o material novamente por 30 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante. Deixar os tubos para secar na estufa a 37 °C por aproximadamente 30 minutos. Reidratar o DNA com 100 μ L de água milli Q e deixar os tubos na

estufa a 37 °C por 40 minutos. Armazenar o material em freezer -20 °C para conservar a longo prazo.

4.8. Obtenção da sonda de DNAr 18S por PCR

A sonda de DNAr 18S foi amplificada através do teste de PCR usando DNA genômico de *Astyanax* e/ou *Bryconamericus* e *primers* específicos (NS1 = 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8 = 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') descritos por White et al. (1990), de acordo com a seguinte reação:

Componentes	Volume (μL)	Concentração
DNA	1	2 ng/μL
PCR <i>buffer</i> 10x (Tampão)	5	
MgCl ₂	8	25 mM
<i>Primers</i> – NS1 NS8	1 1	0,6 ng/μL 0,6 ng/μL
dNTPs	1	2 mM cada
<i>Taq</i> Polimerase	0,5	5 U/μL
Água	29	

Volume final = 46,5 μL

- O programa das reações de amplificação consiste em:

Desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos

Desnaturação a 95 °C por 1 minuto	} 35 ciclos
Anelamento a 60 °C por 1 minuto	
Extensão a 72 °C por 1 min. e 30 segundos	

Extensão final a 72 °C por 7 minutos

4.9. Obtenção da sonda 5S por PCR

A sonda 5S foi amplificada através do teste de PCR usando DNA genômico de *Astyanax* e/ou *Bryconamericus* com os *primers* (A= 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e

B= 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') descritos por Pendás et al. (1994) e Martins e Galetti Jr. (1999), de acordo com a reação descrita abaixo:

Componentes	Volume (μL)	Concentração
DNA	1	50 ng/μL
PCR <i>buffer</i> 10x (Tampão)	5	
MgCl ₂	8	25 mM
Primers A	1	10 mM
B	1	10 mM
dNTPs	1	2 mM cada
Taq Polimerase	0,5	5 U/μL
Água	29	

Volume final = 46,5 μL

- O programa das reações de amplificação consiste em:

Desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos

Desnaturação a 95 °C por 1 minuto	}	2 ciclos
Anelamento a 61 °C por 30 segundos		
Extensão a 72°C por 45 segundos		

Desnaturação a 95 °C por 1 minuto	}	2 ciclos
Anelamento a 59 °C por 30 segundos		
Extensão a 72 °C por 45 segundos		

Desnaturação a 95 °C por 1 minuto	}	2 ciclos
Anelamento a 57 °C por 30 segundos		
Extensão a 72 °C por 45 segundos		

Desnaturação a 95 °C por 1 minuto	}	25 ciclos
Anelamento a 61 °C por 30 segundos		
Extensão a 72 °C por 45 segundos		

Extensão final a 72 °C por 7 minutos

4.10. Marcação das sondas 18S e 5S

As sondas foram marcadas com Biotina-11-dUTP (Roche) e Digoxigenina-11-dUTP (Roche) por PCR, de acordo com a seguinte reação:

Água	29 µL
Tampão	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	8 µL
dATP (2mM)	1 µL
dGTP (2mM)	1 µL
dCTP (2mM)	1 µL
dTTP (2mM)	0,7 µL
D* ou B** (1mM)	0,6 µ
Primer 1 (10mM)	1 µL
Primer 2 (10mM)	1 µL
DNA (produto de PCR)	1 µL
Taq Polimerase	0,5 µL

*D = Digoxigenina-11-dUTP, **B = Biotina-11-dUTP.

- Observação: Os programas utilizados para a marcação das sondas 18S e 5S foram os mesmos utilizados para a amplificação das sondas.

4.11. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) com modificações feitas no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro:

1º) Tratamento das lâminas: Desidratar as lâminas em série alcoólica: 5 minutos em álcool 70%, 5 minutos em álcool 90% e 5 minutos em álcool 100%. Deixar as lâminas em temperatura ambiente para secar. Logo em seguida, mergulhar em formamida 70% (em 2xSSC) a 70 °C por aproximadamente 4 minutos e desidratar em etanol gelado: 70%, 90% e 100% por 5 minutos cada. Deixar as lâminas secarem.

2º) Solução de hibridação: Preparar o tampão de hibridação: 10 µL de formamida (*CF=50%), 6 µL de sulfato de dextrano 50% (*CF=10%) e 2 µL de 20xSSC. Em um tubo Eppendorf, adicionar 6 µL da sonda marcada e 24 µL do tampão de hibridação. Levar a solução de hibridação + sonda ao termociclador a 95 °C por 10 minutos. Após, armazenar a solução no gelo até o uso. *CF=Concentração Final

3º) Hibridação: Colocar 30 µL de solução de hibridação + sonda desnaturada sobre a lâmina, cobrir com lamínula. Manter a lâmina invertida sobre um suporte dentro de uma câmara úmida (2xSSC) a 37 °C *overnight*.

4º) Lavagens: Retirar as lamínulas com cuidado. Lavar as lâminas em solução de estringência (50% de formamida + 50% de 2xSSC) a 45 °C por 5 minutos, duas vezes. Lavar em solução 1xSSC a 45 °C por 5 minutos, duas vezes. Por último, lavar em solução 4xTriton (10 mL de 20xSSC + 25 µL de Triton-100x + 40 mL de água Milli Q) a temperatura ambiente por uma vez. Colocar 30 µL de tampão de bloqueio (1.000 µL 2xSSC; 0,05g de leite em pó desnatado; 10 µL de Triton20x), cobrir com lamínula por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, enxaguar brevemente em 2xSSC.

5º) Detecção: Colocar o anticorpo sobre cada lâmina na seguinte proporção: 4 µL de anti-digoxigenina-rodamina + 26 µL de tampão de bloqueio para a sonda marcada pela Digoxigenina-11-dUTP e deixar por 1 hora a 37 °C em um recipiente escuro. Logo após, lavar as lâminas uma vez em 2xSSC por 2 minutos à 43 °C e duas vezes em 2xSSC + 0,1% Triton20x por 2 minutos à 43 °C.

Para a sonda marcada pela Biotina-11-dUTP colocar sobre a lâmina 6 µL de Avidina-FITC + 24 µL de tampão de bloqueio e deixar a 37 °C em um recipiente escuro por 30 minutos. Lavar uma vez em 2xSSC por 2 minutos à 43 °C e duas vezes em 2xSSC + 0,1% Triton por 2 minutos à 43 °C. Para amplificar o sinal colocar sobre a lâmina 2 µL de anti-avidina-biotinilada + 38 µL de tampão de bloqueio por 30 minutos em recipiente escuro à 37 °C. Lavar uma vez em 2xSSC por 2 minutos à 43 °C e duas vezes em 2xSSC + 0,1% Triton por 2 minutos à 43 °C. Repetir todo esse processo por mais uma vez.

6º) Montagem das lâminas: Colocar sobre o material uma gota de *antifading* com DAPI (Vectashield). Cobrir a lâmina com uma lamínula e colocar em uma caixa na geladeira por 30 minutos antes da análise ao microscópio de fluorescência.

4.12. Amplificação do gene mitocondrial citocromo-b (*cyt-b*)

O gene mitocondrial *cyt-b* foi amplificado utilizando os *primers*: L-GluDG-CitF: 5' - TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3' e H-16460-CitR: 5' - CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC - 3' (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>) através de reações preparadas utilizando o MIX PCR (Qiagen) contendo: 5U de *Taq* polimerase, tampão de enzima 10x, MgCl₂ a 1,5 mM e dNTP a 200 µM , água Mili Q autoclavada, *primer forward* (F) 10 µM, *primer reverse* (R) 10 µM e DNA. O programa de PCR utilizado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos, 68 °C por 90 segundos, e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

4.15. Análise de PCR-RFLP

A reação de digestão foi realizada seguindo as recomendações da empresa fabricante das enzimas *HpaII* (5'...C↓CGG...3'; 3'...GGC↑C...5') e *BclI* (5'...A↓CTAGT...3'; 3'...TGATC↑A...5') (FERMENTAS *Life Sciences*). A visualização dos resultados foi feita em gel de agarose 1,5% e o tamanho dos genes mitocondriais e dos fragmentos de restrição obtidos foram confirmados através de um marcador de peso molecular (*Ladder*) de 2.000 pares de bases (pb).

4.13. Sequenciamento de DNA

Foram amplificadas apenas as amostras que continham 50 ng/μL de DNA, e depois purificadas através do tratamento com a enzima EXOSAP (GE Healthcare), de acordo com o protocolo abaixo:

1. Limpar 10 μL do produto de PCR, adicionando 2 μL de EXOSAP e 2 μL de água Milli Q autoclavada;
2. Levar os tubos recém preparados ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37 °C e 15 minutos a 80 °C;
3. Retirar os tubos do termociclador e fazer 2 novos tubos, aliquotando em um tubo 5 μL do produto já limpo com 2,5 μL de *primer* F e em outro tubo *primer* R, seguindo os mesmos volumes do tubo um.

O DNA purificado foi enviado para o sequenciamento na Macrogen na Korea, onde foi realizada a reação de PCR de sequenciamento, a limpeza deste PCR e o sequenciamento num sequenciador automático de DNA modelo MEGABACE 1.000 (GE HealthCareT) com o kit DYEnamic ET terminator reagent premix para MEGABACE (Amersham Biociences).

4.14. Análise das sequências

As sequências foram alinhadas no programa BioEdit utilizando o algoritmo ClustalW vinculado ao programa e a análise filogenética foi conduzida pelo método de Máxima Parcimônia (MP) realizada no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). A filogenia foi testada utilizando o método de *bootstrap* com 1.000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). Para o grupo externo foram utilizadas duas espécies, *Serrapinnus heterodon* (Characidae: Cheirodontinae) obtida no presente trabalho e *Pimelodella chagresi* (Siluriformes: Heptapteridae) obtida no banco de genes do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o número de protocolo AY036751.1.

Referências

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper Tibagi river basin of Paraná, Brazil. **Neotropical Ichthyology**. v. 4, p.197-202, 2006.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. **Heredity**. v. 73, p. 328-336, 1994.

BRITSKI, M. A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática**. In: Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e Piscicultura, São Paulo: CIBPU. 1972. p. 84-86.

BROCKHOUSE, C.; BAS, J. A. B.; FEREDAY, R. M.; STRAUSS, N. A. Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). **Genome**. v. 32, p. 516-521, 1989.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and Phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). 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. 603.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Eds). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Museu Nacional, Rio de Janeiro. 195 p., 2007.

CAMACHO, J. P. M. **B chromosomes**. In: Gregory, T.R. The evolution of the genome. San Diego, California, USA. 2005. p. 223-286.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 355, p. 163-178, 2000.

CAPISTANO, T. G.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO Jr., H. F. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 203-207, 2008.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). **Ichthyology Exploration of Freshwaters**. v. 14, p. 361-368, 2003.

COLE, C. J.; LEVANS, C. R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetological Review**. v. 49, p.102, 1971.

DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WANSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. v. 5, p. 37-44, 2007.

EICKBUSH, D. G.; EICKBUSH, T. H.; WERREN, J. H. Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. **Chromosoma**. v. 101, p. 575-583, 1992.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. **Systematic Zoology**. v. 34, p. 152-161, 1985.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. **Cytologia**. v. 68, p. 289-293, 2003.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, p. 1-5, 2006a.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. **Caryologia**. v. 59, p. 253-259, 2006b.

FERREIRA-NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, p. 792-796, 2009.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 724, p. 297-353, 1981.

FORESTI, F. **Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes**. Resumos do VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicals. Londrina-PR. 1998.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.

FROESE, R. & PAULY, D. (Eds). 2004. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. (acesso em 27/12/2011).

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

GREEN, D. M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma**. v. 97, p. 55-70, 1988.

HASHIMOTO, D. T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. Published online: 19 de janeiro, 2011.

HEWITT, G. M. Variable transmission rates of a B chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.). **Chromosoma**, v. 40, p. 83-106, 1973.

HOUBEN, A.; KYNAST, R. G.; HEIM, U. Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). **Chromosoma**. v. 105, p. 97-103, 1996.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JAMILENA, M.; RUÍZ-REJÓN, C.; RUÍZ-REJÓN, M. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. **Journal of Cell Science** v. 107, p. 703-708. 1994.

JAMILENA, M.; GARRIDO-RAMOS, M.; RUÍZ-REJÓN, M.; RUÍZ-REJÓN, C.; PARKER, J. S. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. **Chromosoma**. v. 104, p. 113-120, 1995.

JIN, S. M.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetraodonopterae). **Ciência Cultural**. v. 27, p. 1122-1124, 1975.

JONES, R. N. B chromosome systems in flowering plants and animal species. **International Review of Cytology**. v. 40, p. 1-100, 1975.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: An ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**. v. 136, p. 135-139, 2009.

KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A. M.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**. v. 75, p. 408-421, 2009.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS Jr., C. J., (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. 2003. p. 106-169.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, J. S.; HESLOP-HARRISON, J. S.; HEWITT, G. M.; CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double fish technique. **Chromosome Research**. v. 2, p. 87-92, 1994.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 1993.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**. v. 87, p.101-106, 1992.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 21, p. 201-206, 1998.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**. v. 109, p. 161-168, 2000.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, p. 536-542, 2004.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. v. 123, p. 211-216, 2005.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI Jr., P. M. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**. v. 85, p. 219-228, 1996.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. v. 7, p. 363-367, 1999.

MCVEAN, G. T. Fractious chromosomesöhybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. **BioEssays**. v. 17, p. 579-582, 1995.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 208-214, 2008.

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.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**. v. 14, p. 331-357, 1991.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, A. S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae): Karyotypic variability. **Caryologia**. v. 36, p. 235-244, 1983.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. v. 108, p. 211-215, 2000a.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**. v. 85, p. 136-141, 2000b.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**. v.11, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; SABOYA, S. M. R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A.; BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**. v. 79, p. 473-476, 1997.

PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**. v. 137, p. 107-112, 2002.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 67, p. 31-36, 1994.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 222-226, 2008.

PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosome: experimental evidence. **Evolution**. v. 55, p. 1069-1073, 2001.

PINKEL, D.; STRUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E. L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 20, p. 377-380, 1997.

REIS, R. R.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs. 2003. 729 p.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**. v. 69, p. 50-56, 1992.

SAMBROOK, J **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. vol. 3. Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher, 2001.

SAPRE, A. B.; DESPHANDE, D. S. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. **Journal of Heredity**. v. 78, p. 191-196, 1987.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae), p. 375-400. 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. 603 p.

SCHARTL, M.; NANDA, I.; SCHLUPP, I. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature**. v. 373, p. 68-71, 1995.

SCHEEL, J. J. **Fish chromosomes and their evolution**. In: Internal Report of Danmarts Akvarium. Charløtherlund, Denmark, 1973. 22 p.

SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2007.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: na overview, In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 1998. p. 1-11.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janaeensis*. **Cytogenetic and Genome Reseach**. v. 122, p. 67-72. 2008.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-rat distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Cell Genetics**. v. 74, p. 70-75, 1996.

VUJOSEVIC, M.; BLAGOJEVIC, J. B chromosomes in populations of mammals. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 106, p. 247-256, 2004.

WEITZMAN, S. H.; VARI, R. P. Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. v. 101, p. 444-465, 1988.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA. 1990. 315-322 p.

Resultados e Discussão

6.1. CAPÍTULO I

**MARCADORES CITOGENÉTICOS E MOLECULARES PARA
ESPÉCIES DO GÊNERO *Bryconamericus* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DISTINTAS**

PISCOR, D.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. (submetido para publicação).
Cytogenetic and molecular markers for species of *Bryconamericus* genus (Characiformes,
Characidae) of distinct hydrographic basins. **Genetica**.

Resumo

O gênero *Bryconamericus* encontra-se alocado em *incertae sedis* dentro da família Characidae, assim como outros gêneros. A falta de evidências morfológicas e moleculares faz do gênero um grupo incerto e polifilético. Frente ao grande número de espécies descritas, são poucos os dados citogenéticos para esse grupo, assim o objetivo do presente trabalho foi buscar marcadores citológicos e moleculares, que pudessem ser úteis para uma melhor compreensão dos processos evolutivos e citogenéticos do gênero. Para tanto, os cromossomos de três espécies de *Bryconamericus* de localidades diferentes (*Bryconamericus stramineus* da bacia do rio Iguatemi, MS; *Bryconamericus turiuba* e *Bryconamericus* cf. *iheringii* da bacia do rio Corumbataí, SP) foram analisados através de técnicas convencionais e hibridação *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S, além da técnica de PCR-RFLP e análise filogenética utilizando gene mitocondrial. O cariótipo de *B. stramineus* apresentou 6m+10sm+16st+20a cromossomos (NF=84), um par Ag-RON, um par portador de sítios de DNAr 18S e outro par portador de sítios de DNAr 5S, além de poucas bandas C-positivas. *B. turiuba* apresentou um cariótipo com 8m+10sm+14st+20a cromossomos (NF=84), com um par Ag-RONs, dois pares portadores de sítios de DNAr 18S e dois pares portadores de sítios de DNAr 5S, além de poucas regiões de heterocromatina banda-C+. Para *B. cf. iheringii* o cariótipo foi de 10m+14sm+18st+10a cromossomos (NF=94), além de um par portador de constrição secundária, o qual foi Ag-RON+, apresentando também, pela FISH, sítios de DNAr 18S e 5S co-localizados. Os dados obtidos no presente trabalho permitiram visualizar relações mais conclusivas entre as três espécies e formular hipóteses evolutivas que serão importantes para entender a citotaxonomia do grupo.

Palavras-chave: Cromossomos, DNAr 18S e 5S, heterocromatina, *incertae sedis*, RONS.

INTRODUÇÃO

Bryconamericus é um gênero da família Characidae amplamente distribuído entre a América Central e a América do Sul e anteriormente incluído como membro da subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977). De acordo com Román-Valencia et al. (2008) cerca de 70 espécies são descritas para o gênero *Bryconamericus* que, assim como muitos outros gêneros da família, foi considerado como *incertae sedis* por Lima et al. (2003). Novas espécies vem sendo descritas, como é o caso de uma nova espécie que foi validada na Guiana Francesa e denominada como *Bryconamericus guyanensis* sp. n. por Zarske et al. (2010), o que torna este número ainda maior.

A filogenia de gêneros em *incertae sedis*, tal como *Bryconamericus*, é discutida por diversos autores, como Mirande (2009, 2010), Javonillo et al. (2010) e mais recentemente por Oliveira et al. (2011), os quais mostram que *Bryconamericus* forma um grupo polifilético. Román-Valencia e Vanegas-Ríos (2009) estudaram as relações filogenéticas envolvendo caracteres morfológicos e moleculares em cinco espécies do gênero *Bryconamericus* da América Central (*B. emperador*, *B. gonzalezo*, *B. bayano*, *B. terrabensis* e *B. scleroparius*) e demonstraram que seus resultados coincidem com inferências morfológicas citadas por Román-Valencia (2002). Esses estudos mostraram ainda, que as espécies de *Bryconamericus* da baixa América Central formam um clado intimamente relacionado ao grupo das populações do noroeste da Colômbia (ROMÁN-VALENCIA, 2002; ROMÁN-VALENCIA; VANEGAS-RÍOS, 2009).

Dados citogenéticos para o gênero *Bryconamericus* referentes ao cariótipo, colorações diferenciais, tais como, Banda-C, Banda-G e CMA₃, e detecção de DNA ribossômico são descritos na literatura por alguns autores (WASKO; GALETTI Jr., 1998; PORTELA-CASTRO, 1999; PAINTNER-MARQUES et al., 2003; PORTELA-CASTRO et al., 2008; FERNANDES et al., 2010, entre outros). Nesses trabalhos o número diploide mais frequente relatado foi de 2n=52 cromossomos, sendo que diversas fórmulas cariotípicas e sistemas de RONS foram relatados. Por exemplo, Capistano et al. (2008) mostraram para três populações de *B. aff. iheringii*, três citótipos distintos além de uma notável variação de

número de RONS. Nesse estudo, o Citótipo I (Córrego Maringá) mostrou um cariótipo com $12m+18sm+8st+14a$, quatro cromossomos Ag-RON positivos e seis cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S, o Citótipo II (Rio Keller) mostrou um cariótipo composto por $8m+28sm+6st+10a$, quatro cromossomos Ag-RON positivos e dez cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S e o Citótipo III (Córrego Tatubepa) apresentou um cariótipo com $8m+20sm+8st+16a$, dois cromossomos Ag-RON positivos e dois cromossomos portadores de sítios de DNAr 18S.

No mesmo ano, Portela-Castro et al. (2008) analisaram uma população *B. aff. iheringii* do rio Keller na bacia do rio alto Paraná (Estado do Paraná, Brasil) através da coloração convencional com Giemsa e diversos bandamentos (C, G e R), e mostraram dois citótipos: citótipo I com um cariótipo com $12m+18sm+8st+14a$ e citótipo II com $8m+28sm+6st+10a$. Também foi relatada a presença de dois citótipos numa população de *Bryconamericus aff. exodon* do córrego Três Bocas (Bacia do rio Tibagi, PR): citótipo I apresentou um cariótipo composto por $16m+12sm+6st+18a$ e um NF=86; o citótipo II apresentou $10m+24sm+6st+12a$ e um NF=92 (PAINTNER-MARQUES et al., 2002).

Diante das informações expostas sobre as relações filogenéticas do gênero *Bryconamericus* dentro de família Characidae, associadas aos poucos dados relacionados a marcadores cromossômicos para espécies do gênero, o presente trabalho teve como objetivo buscar outros marcadores citogenéticos que possam caracterizar espécies do gênero *Bryconamericus* e identificar as espécie analisadas, através de técnicas moleculares, tais como a análise de fragmentos de restrição e sequenciamento de gene mitocondrial contribuindo para o entendimento das relações citogenéticas destas espécies em Characidae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

No presente estudo, sete exemplares de *Bryconamericus turiuba* (cinco machos e duas fêmeas) e cinco exemplares machos de *Bryconamericus* cf. *iheringii* foram coletados, respectivamente, no afluente do rio Passa-Cinco (22°23'25,4"S e 47°50'47,8"O) e no afluente do rio Corumbataí (22°16'6,2"S e 0,47°37'16,9"O), pertencentes à bacia do rio Corumbataí no Estado de São Paulo (SP). Os exemplares de *Bryconamericus stramineus* (12 machos e nove fêmeas) foram coletados no córrego Guaçu (23°54'19,6"S e 54°21'43,4"O) pertencente à bacia do rio Iguatemi, Estado de Mato Grosso do Sul (MS).

Análises citogenéticas

As preparações mitóticas foram obtidas de células extraídas das porções anterior e posterior do rim, de acordo com a metodologia proposta por Foresti et al. (1981). As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram analisadas pela técnica de impregnação pelo íon prata descrita por Howell e Black (1980) e a heterocromatina foi observada pelo tratamento da técnica de Banda-C proposta por Sumner (1972). De acordo com a classificação frequentemente utilizada para cromossomos de peixes, a morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão de braços, onde o comprimento do braço longo (q) é dividido pelo comprimento do braço curto (p). Os cromossomos com dois braços foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st) e os cromossomos considerados com um braço como acrocêntrico (a).

Obtenção de sondas e Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR utilizando os *primers* (NS1=5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8=5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') descritos por White et al. (1990); e a sonda de DNAr 5S obtida por PCR com os *primers* (A=5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B=5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') descritos por Pendás et al. (1994) e Martins e Galetti (1999). A técnica de hibridação *in situ*

fluorescente utilizando as sondas de DNAr 18S e 5S marcadas por PCR com digoxigenina (Roche) e biotina (Roche) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) com modificações feitas no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro. Lâminas com cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/mL) por 1h a 37 °C e desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%). O DNA cromossômico foi desnaturado por 4 minutos em formamida 70%/2x SSC a 70 °C e desidratado logo em seguida em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%). A solução de hibridação (20 µL de formamida 50% em 2x SSC e 10% sulfato de dextran + 6 µg/mL de sonda de DNAr) foi incubada por 10 minutos a 95 °C e aplicada em cada lâmina. Após a hibridação a 37 °C *overnight*, as lâminas foram lavadas em formamida 50%/2xSSC (pH 7.0) duas vezes por 5 minutos a 45 °C, 1xSSC duas vezes por 5 minutos a 45 °C e 4xT (1 20xSSC: 4 H₂O + 250 µL de triton100x) uma vez por 5 minutos. Os sinais foram detectados com rodamina-antidigoxigenina (Roche) para digoxigenina e avidina-FITC (Sigma) para biotina. Os cromossomos foram contra-corados com Vectashield *Mounting Medium* com DAPI e analisados com microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital modelo D71. As imagens foram capturadas usando o *software* DP-Controler.

Análises de PCR-RFLP

Para as análises de fragmentos de restrição do gene mitocondrial citocromo-b (*cyt-b*) foram utilizados DNA de cinco indivíduos de *B. turiuba*, cinco de *B. cf. iheringii* e cinco de *B. stramineus*. O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de nadadeira, utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico de acordo com Sambrook (2001). O gene mitocondrial *cyt-b* foi amplificado utilizando os *primers*: L-GluDG-CitF: 5' - TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3' e H-16460-CitR: 5' - CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC - 3' (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers>) através de reações preparadas utilizando o MIX PCR (Qiagen) contendo: 5U de *Taq* polimerase, tampão de enzima 10x, MgCl₂ a 1,5 mM e dNTP a 200 µM, água Mili Q autoclavada, *primerF* 10 µM, *primerR* 10µM e DNA. .

Para o gene mitocondrial *cyt-b*, o programa de PCR utilizado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos, 68 °C por 90 segundos, e extensão final de 72 °C por 5 minutos. A reação de digestão foi realizada seguindo as recomendações da empresa fabricante das enzimas *HpaII* (5'...C↓CGG...3'; 3'...GGC↑C...5') e *BclI* (5'...A↓CTAGT...3'; 3'...TGATC↑A...5') (FERMENTAS *Life Sciences*). A visualização dos resultados foi feita em gel de agarose 1,5% e o tamanho dos genes mitocondriais e dos fragmentos de restrição obtidos foram confirmados através de um marcador de peso molecular (*Ladder*) de 2.000 pares de base (pb).

Sequenciamento de DNA e Análises das sequências

Para as análises das sequências entre as três espécies do presente estudo, o *cyt-b* foi amplificado, como descrito acima, a partir do DNA genômico proveniente de nadadeiras de sete exemplares de *B. stramineus*, sete de *B. turiuba* e cinco de *B. cf. iheringii*. As sequências de *cyt-b* foram limpas com a enzima EXOSAP (USB) e enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen, Korea. As sequências foram alinhadas no programa BioEdit utilizando o algoritmo ClustalW vinculado ao BioEdit e as análises das sequências foram conduzidas pelo método de Máxima Parcimônia (MP) realizadas no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), utilizando o método de *bootstrap* com 1.000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). Para o grupo externo foram utilizadas duas espécies, *Serrapinnus heterodon* (Characidae: Cheirodontinae) obtida no presente trabalho e *Pimelodella chagresi* (Siluriformes: Heptapteridae) obtida no banco de genes do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o número de protocolo AY036751.1.

RESULTADOS

Análises citogenéticas

Todos os exemplares de todas as espécies analisadas apresentaram número diploide de $2n=52$ cromossomos e diferentes fórmulas cariotípicas entre as espécies. Não foram observadas diferenças cariotípicas entre os sexos.

Os exemplares de *Bryconamericus stramineus* apresentaram o cariótipo composto por $6m+10sm+16st+20a$ e número fundamental (NF) igual a 84, sendo o par Ag-RON positivo os cromossomos homólogos de número 14 (Figura 1a). Regiões de heterocromatina banda-C+ foram detectadas em porções centroméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 2a). A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S detectou sítios de DNAr 18S na porção terminal do braço curto do par 14 subtelocêntrico, e sítios de DNAr 5S na porção pericentromérica do par 5 submetacêntrico (Figura 3a e 5a). A técnica de *Double-FISH* foi empregada confirmando que os dois *clusters* de DNAr (18S e 5S) têm localizações físicas em pares cromossômicos distintos (Figura 4b).

Todos os exemplares de *Bryconamericus turiuba* apresentaram cariótipo composto por $8m+10sm+14st+20a$, com NF=84, sendo que o íon prata impregnou na região terminal do braço curto do par 14 subtelocêntrico (Figura 1b). A heterocromatina detectada pela técnica de banda-C foi evidente nas porções centroméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 2b). A técnica de FISH utilizando sondas de DNAr 18S marcou dois pares subtelocêntricos no braço curto: o par 14, coincidente com o par Ag-RON, e o par 10, o maior do complemento cariotípico (Figura 3b e 5b). Sítios de DNAr 5S foram evidenciados na região pericentromérica dos pares acrocêntricos 17 e 24. A técnica de *Double-FISH* mostrou que esses dois *clusters* de DNAr não são sintênicos para esta espécie (Figura 4a).

A estrutura cariotípica dos exemplares de *Bryconamericus cf. iheringii* consiste em $10m+14sm+18st+10a$ e NF=94, sendo o par acrocêntrico de número 24 portador de constrição secundária, o qual apresentou heteromorfismo de tamanho de marcação Ag-RON em todos os indivíduos analisados (Figura 1c). A heterocromatina foi evidenciada após o tratamento pela técnica de banda-C nas regiões centroméricas de quase todos os

cromossomos e pericentromérica de alguns (Figura 2c). A técnica de FISH com sondas de DNAr 18S detectou sítios no braço curto do par 24 (Figura 3c e 5c), mostrando que essa região não apresenta diferença de tamanho, como apresentado para o par Ag-RON. Ainda no par 24 os sítios de DNAr 5S foram detectados no braço curto do par 24 (Figura 3c). Com a técnica de *Double-FISH* foram observados que os *clusters* de DNAr 45S e 5S estão co-localizados em sintenia (Figura 6).

Análises de PCR-RFLP

Os indivíduos amostrados tiveram seu DNA total extraído e o gene mitocondrial *cyt-b* amplificado. Para todos os indivíduos os fragmentos de DNA amplificados apresentaram o mesmo tamanho, cerca de 1200 pb. A digestão do produto de amplificação do gene *cyt-b* com a enzima *HpaII* apresentou um padrão de banda para todos os indivíduos de *B. stramineus* e *B. cf. iheringii*, com duas bandas de aproximadamente 700 pb e 500 pb, respectivamente; e para os indivíduos de *B. turiuba* a enzima não encontrou nenhum sítio de restrição (Figura 7). A digestão com a enzima *BclI*, gerou um padrão de banda para todos os indivíduos de *B. stramineus* e *B. turiuba*, com bandas de 850 pb e 350 pb; e para *B. cf. iheringii* a enzima não encontrou nenhum sítio de restrição (Figura 7).

Análises das sequências

A partir dos dados gerados pelo método de MP foi possível constatar que os exemplares das três espécies de *Bryconamericus* analisadas dividiam-se em dois grupos com clados bem estruturados: Grupo I: clado *B. stramineus* e clado *B. cf. iheringii*; Grupo II: clado *B. turiuba*. No Grupo I o clado composto pelos exemplares de *B. stramineus* e *B. cf. iheringii* estão mais relacionados tendo como grupo irmão o clado formado pelos exemplares de *B. turiuba* (Grupo II). Na base de cada clado foram encontrados altos valores de *bootstrap*, os quais fornecem mais confiabilidade aos dados (Figura 8).

DISCUSSÃO

Como alguns exemplares identificados com base em caracteres morfológicos que permaneciam duvidosos, o uso da técnica de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição *BcuI* e *HpaII*, juntamente com as análises das sequências e os dados citogenéticos apresentados no presente trabalho, permitiram agrupar os exemplares que permaneciam em dúvida, mostrando que os dados citogenéticos aliados aos dados moleculares podem auxiliar no entendimento da taxonomia de cada entidade taxonômica.

Os cariótipos obtidos no presente trabalho, para *B. stramineus* e *B. turiuba*, apresentaram similaridade em número de cromossomos acrocêntricos, culminando em um mesmo NF (84). Diferentemente, *B. cf. iheringii* apresentou a metade do número de cromossomos acrocêntricos, implicando num NF com valor mais alto (94) em comparação às outras duas espécies. Algumas características são relevantes, quando regiões de heterocromatina banda-C+ são comparadas, tais como blocos na porção pericentromérica de alguns pares submetacêntricos que parecem ser conservados entre as três espécies analisadas no presente trabalho. Por exemplo, os blocos de heterocromatina dos pares 5 e 6 de *B. stramineus*, 5 e 6 de *B. turiuba* e 6 e 7 de *B. cf. iheringii*, assim como nos pares 11 e 13 de *B. turiuba* e 14 e 18 de *B. cf. iheringii*, apresentam similaridade em posição, podendo compartilhar, sob uma hipótese, uma constituição de DNA repetitivo específico que poderia estar se acumulando ou se dispersando no genoma destas espécies.

Adicionalmente, diferentes pares Ag-RONs foram relatados, os quais diferiram em tamanho para *B. stramineus* e *B. turiuba*, e em morfologia em *B. cf. iheringii*. As RONS detectadas tanto pelo íon prata como pelas sondas de DNAr 18S, demonstraram que em *B. stramineus* e *B. cf. iheringii* um único par Ag-RON foi detectado, porém *B. turiuba* apresentou, além do par 14 Ag-RON, outro par (nº 10) marcado pela sonda de DNAr 18S, mostrando que o par 10 estava inativo, e portanto não foi detectado pela impregnação do íon prata. Como já é conhecido, as marcações detectadas após a técnica de Ag-RON se restringem às marcações dos sítios que estiveram previamente ativos na transcrição de

RNAr nucleolar e isto explica o resultado obtido para *B. turiuba*. O sistema de RONS múltiplas é a condição mais frequente encontrada no gênero *Bryconamericus* (Tabela 1).

O heteromorfismo de tamanho Ag-RON encontrado no par 24 do cariótipo de *B. cf. iheringii*, coincidente com a constrição secundária, pode tratar-se de uma diferença de transcrição de genes de DNAr 45S, uma vez que após a técnica de FISH com sondas de DNAr 18S foi detectado para estas regiões sinais com praticamente o mesmo tamanho. Assim como observado por Arruda e Morielle-Versute (2008) o heteromorfismo de tamanho de constrição secundária e marcação Ag-RON localizados no par cromossômico 8 do anfíbio *Leptodactylus podicipinus*, pode ser atribuído principalmente à diferença no grau de condensação entre os homólogos deste par e à atividade gênica diferencial de segmentos de DNAr (45S), sendo que tal heteromorfismo não foi observado na intensidade do sinal de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr.

A localização nos cromossomos das sequências de DNAr 5S mostrou-se também um interessante marcador citológico para o gênero *Bryconamericus*. Do ponto de vista evolutivo, os dados são intrigantes e os diferentes pares portadores dos sítios de DNAr 5S em *B. stramineus*, *B. turiuba* e *B. cf. iheringii* podem ter surgido por ações de elementos transponíveis que podem ter se inserido nestes *loci* e posteriormente levado estas sequências para outros cromossomos durante a evolução destas espécies, culminando na reorganização dessas sequências em pares cromossômicos diferentes. De acordo com Raskina et al. (2004) elementos de transposição foram propostos como um dos mecanismos responsáveis pelo processo de “mobilidade” de sequências de DNAr para novos sítios.

Os genes da família 45S são transcritos no nucléolo, enquanto os genes da família 5S são transcritos longe do nucléolo, sugerindo que tais divergências funcionais exigiriam diferentes localizações físicas para estas duas famílias multigênicas (MARTINS; GALETTI, 2000). Além disso, a conversão de genes e o *crossing-over* desigual podem ser importantes processos na manutenção de uma sequência conservada em matrizes repetidas em *tandem* (DOVER, 1986). Tais mecanismos podem ser mais eficientes e independentes se os *clusters* 5S e 45S permanecem separados uns dos outros em vez de uma ligação conjunta,

evitando interferências perturbadoras, tais como translocação de sequências 5S dentro do *cluster* 45S ou vice-versa (MARTINS; GALETTI, 1999).

Os resultados para *B. stramineus* e *B. turiuba* obtidos no presente trabalho demonstraram que os dois *clusters* de DNAr (45S e 5S) estão localizados em cromossomos diferentes. Como sugerido por Martins e Galetti (2000), o menor *cluster* de DNA ribossômico parece evoluir independentemente, pois a localização desses *loci*, observada para a maioria dos vertebrados, está em cromossomos diferentes. Assim, as tendências de divergência evolutiva podem existir em um único genoma e diferentes dinâmicas funcionais destas sequências requeiram, portanto, distanciamento físico (MARTINS; GALETTI, 2000).

Diferente das duas outras espécies analisadas nesse estudo, os cromossomos de *B. cf. iheringii* apresentaram co-localização física dos genes de DNAr 18S e 5S no par 24, mostrando ser sintênicos para a população analisada desta espécie. Tal característica de sintenia foi também relatada por Mantovani e colaboradores (2005) em uma população de *Astyanax scabripinnis*, a qual mostrou que um dos pares cromossômicos que carregavam os genes de DNAr 5S é também portador de RONS. Os autores explicam que de acordo com o modelo de Rabl proposto por Schweizer e Loidl (1987), o fato das regiões teloméricas se organizarem muito próximas no núcleo interfásico, estando propícias a transferência de material genético, poderia ter facilitado a transferência de DNAr 45S no complemento cariotípico de *A. scabripinnis*. Esta seria mais uma hipótese na tentativa de explicar a co-localização das sequências de DNAr (18S e 5S), uma vez que estas estão localizadas adjacentes na região terminal do braço curto do par 24 em *B. cf. iheringii*.

Diniz et al. (2009) mostram que em *Triportheus nematurus*, outro caracídeo, há três pares portadores de RONS, dois dos quais mostraram co-localização adjacente com o DNAr 5S. Espécies da família Salmonidae, tais como *Salmo salar* e *Oncorhynchus mykiss*, mostraram sintenia dos sítios 5S e 45S supondo que provavelmente podem ter evoluído juntos (PENDÁS et al., 1994; MORÁN et al., 1996). Subsequentemente, os autores discutem que tal sintenia poderia ser explicada por translocação de sequências de DNAr 18S dentro do DNAr 5S ou vice-versa em *T. nematurus*, ou rearranjos cromossômicos em *S. salar* e *O.*

mykiss, depois da divergência entre as duas espécies, poderiam ter contribuído para esta característica.

Características citológicas, tais como RON simples e condições não sintênicas dos *clusters* de DNAr 45S e 5S, parecem hipoteticamente ser condições mais primitivas, encontradas para muitas espécies de Characidae, assim como para espécies do gênero *Bryconamericus*. A visualização da análise filogenética baseada em caracteres moleculares entre as três espécies analisadas e os dados citogenéticos plotados na árvore filogenética, culminaram na hipótese de que *B. stramineus* e *B. turiuba* compartilham mais caracteres ancestrais do que *B. stramineus* e *B. cf. iheringii*. Por exemplo, a condição de não sintenia dos *clusters* de DNAr 18S e 5S e o mesmo número de cromossomos de um braço (NF = 84) observados para os indivíduos de *B. stramineus* e *B. turiuba*, parecem ser condições mais ancestrais do que a condição de sintenia (DNAr 18S e 5S) encontrada para *B. cf. iheringii*.

Nessa perspectiva, os marcadores citogenéticos estudados nesse trabalho, indicam que a evolução cariotípica entre espécies de peixes demonstram padrões conservativos dentro de determinados táxons e que estes padrões são, sob uma análise comparativa, muito interessantes para o entendimento da dinâmica das particularidades encontradas em cada genoma. Por outro lado, algumas características não muito comuns, tal como a sintenia, permitem o levantamento de hipóteses evolutivas que podem esclarecer o dinamismo das sequências de DNA ribossomal. Dessa forma, os dados são interessantes e poderão contribuir para o entendimento da citotaxonomia do grupo.

Tabela 1. Dados citogenéticos no gênero *Bryconamericus* de diferentes localidades do Brasil.

Espécies	Localidades	Fórmula cariotípica	2n	NF	Ag-RONS**	DNAr 18S**	Referências
<i>B. stramineus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	26m/sm+26st/a	52	-	-	-	Portela et al. (1988)
<i>Bryconamericus</i> sp. A	Rio Piracicaba (SP)	6m+30sm+6st+10a	52	94	2-3	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Rio Piracicaba (SP)	6m+10sm+20st+16a	52	88	3-4	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Córrego Três Bocas (PR)	6m+18sm+14st+14a	52	90	4-6	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Córrego Avoadeira (MT)	8m+14sm+16st+14a	52	90	4	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Córrego Avoadeira (MT)	10m+16sm+22st+6a	54	102	-	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>B. ornaticeps</i>	Rio Roncador e Rio Suruí (RJ)	32m/sm+14st+6a	52	98	-	-	Melo et al. (1999)
<i>B. aff. exodon</i> cit-I*	Córrego Três Bocas (PR)	16m+12sm+6st+18a	52	86	2-5	8	Paintner-Marques et al. (2002a,b)
<i>B. aff. exodon</i> cit-II*	Córrego Três Bocas (PR)	10m+24sm+6st+12a	52	92	2-5	-	Paintner-Marques et al. (2002a,b)
<i>B. aff. iheringii</i>	Rio Água Floresta (PR)	8m+22sm+10st+12a	52	92	2	2	Paintner-Marques et al. (2003)
<i>B. aff. iheringii</i> cit-I*	Rio Keller (PR)	12m+18sm+8st+14a	52	90	-	-	Portela-Castro et al. (2008)
<i>B. aff. iheringii</i> cit-II*	Rio Keller (PR)	8m+28sm+6st+10a	52	94	-	-	Portela-Castro et al. (2008)
<i>B. aff. iheringii</i> cit-I*	Córrego Maringá (PR)	12m+18sm+8st+14a	52	90	2-4	6	Capistano et al. (2008)
<i>B. aff. iheringii</i> cit-II*	Rio Keller (PR)	8m+28sm+6st+10a	52	94	2-4	10	Capistano et al. (2008)
<i>B. aff. iheringii</i> cit-III*	Córrego Tatupeba (PR)	8m+20sm+8st+16a	52	88	2	2	Capistano et al. (2008)
<i>B. stramineus</i>	Córrego Guaçu (MS)	6m+10sm+16st+20a	52	84	2	-	Fernandes et al. (2010)
<i>B. stramineus</i>	Córrego Guaçu (MS)	6m+10sm+16st+20a	52	84	2	2	Presente estudo
<i>B. turiuba</i>	Afluente do rio Passa-Cinco (SP)	8m+10sm+14st+20a	52	84	2	4	Presente estudo
<i>B. cf. iheringii</i>	Afluente do rio Corumbataí (SP)	10m+14sm+18st+10a	52	94	2	2	Presente estudo

*Cit, citotipo; m, metacêntrico; sm, submetacêntrico; st, subtelocêntrico; a, acrocêntrico; NF, número fundamental. **Número de cromossomos.

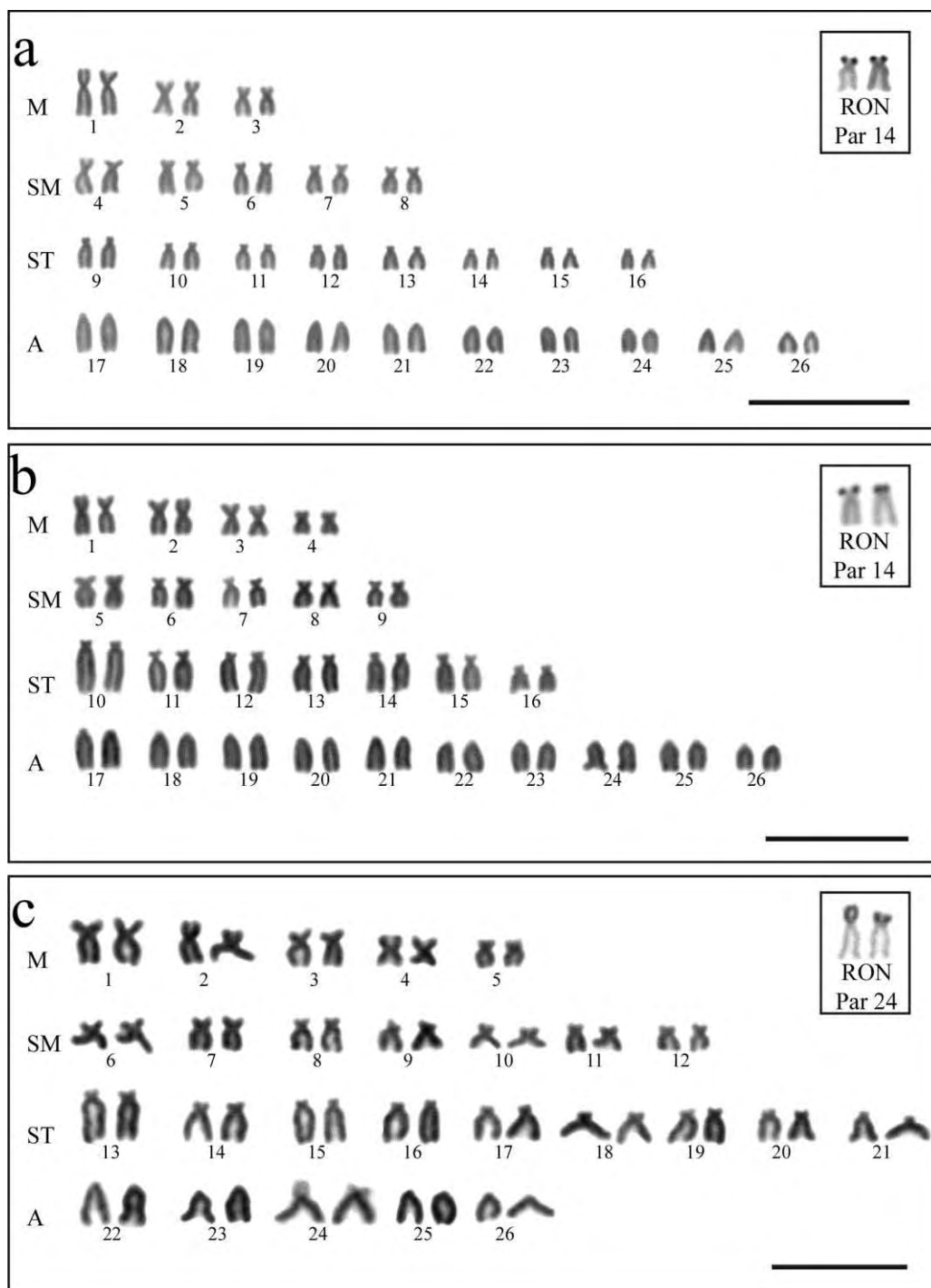


Figura 1. Coloração convencional com Giemsa. **a.** Cariótipo de *B. stramineus*. **b.** Cariótipo de *B. turiuba*. **c.** Cariótipo de *B. cf. iheringii*. Em evidência os pares Ag-RONs das respectivas espécies. Barra = 10 µm.

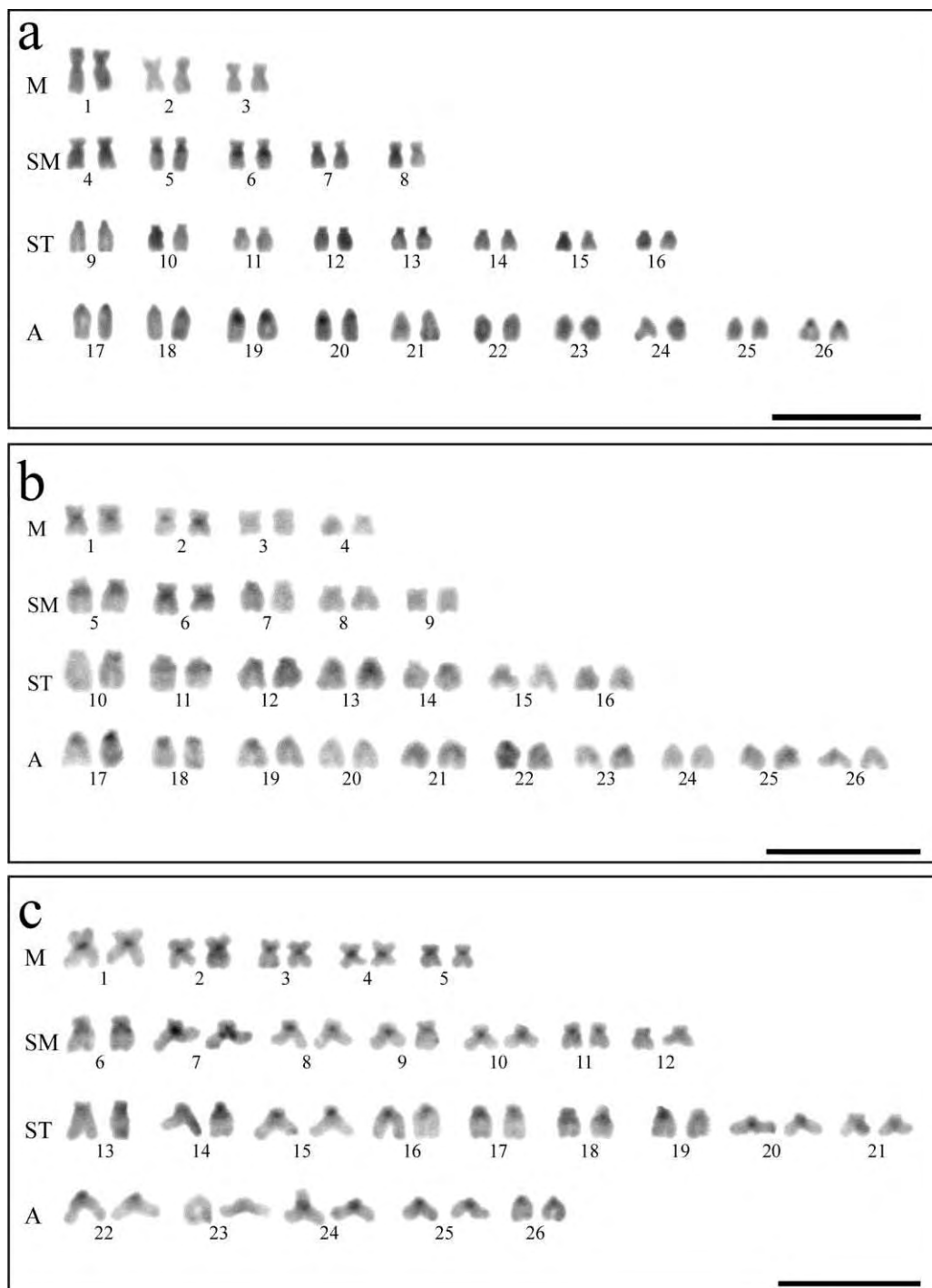


Figura 2. Bandamento C. **a.** Cariótipo de *B. stramineus*. **b.** Cariótipo de *B. turiuba*. **c.** Cariótipo de *B. cf. iheringii*. Barra = 10 μ m.

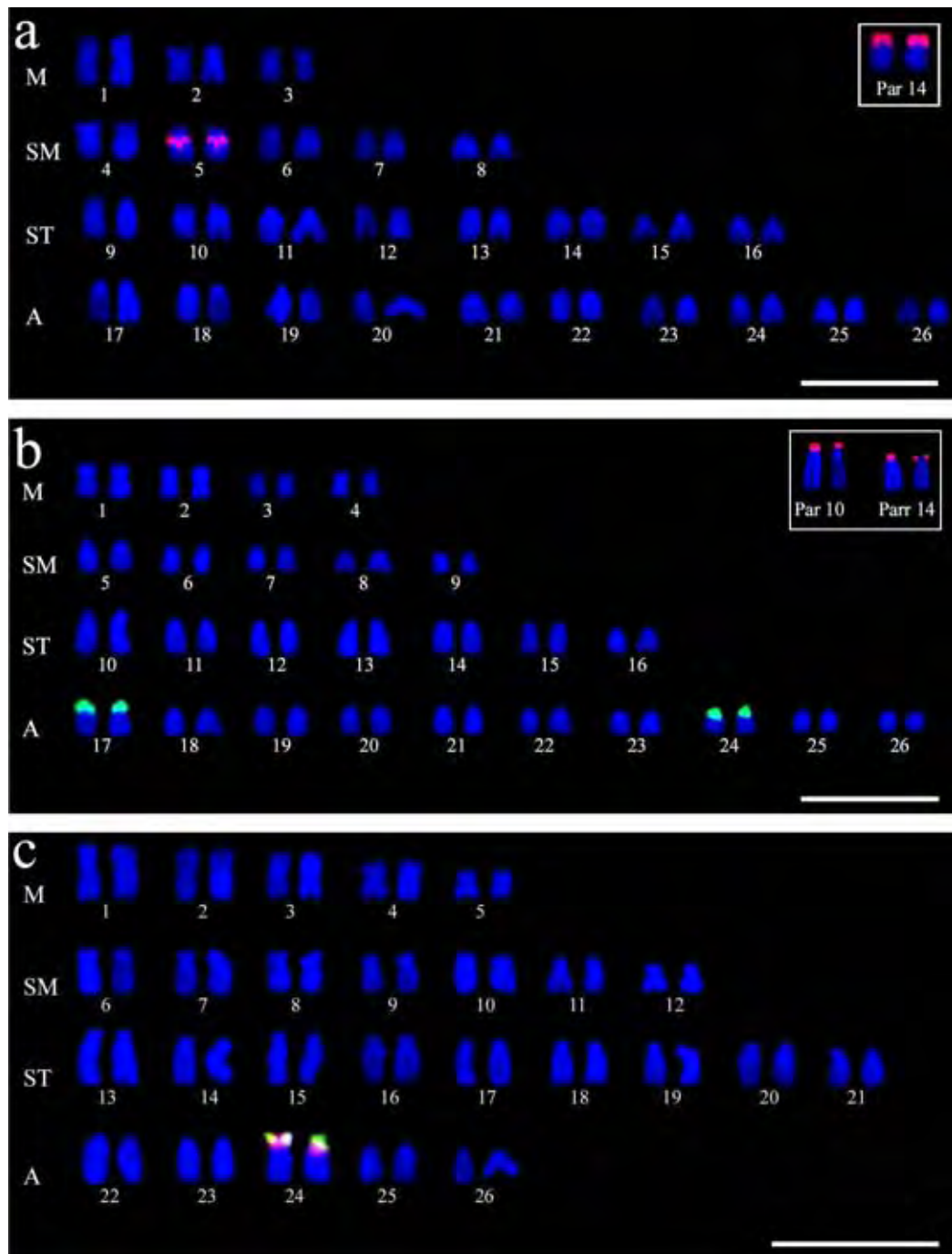


Figura 3. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH). **a.** FISH com sondas de DNAr 5S no cariótipo de *B. stramineus*. Em destaque par marcado com sondas de DNAr 18S **b.** FISH com DNAr 5S no cariótipo de *B. turiuba*. Em destaque os pares marcados pelas sondas de DNAr 18S **c.** Double-FISH com sondas de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) no cariótipo de *B. cf. iheringii*. Barra = 10 µm.

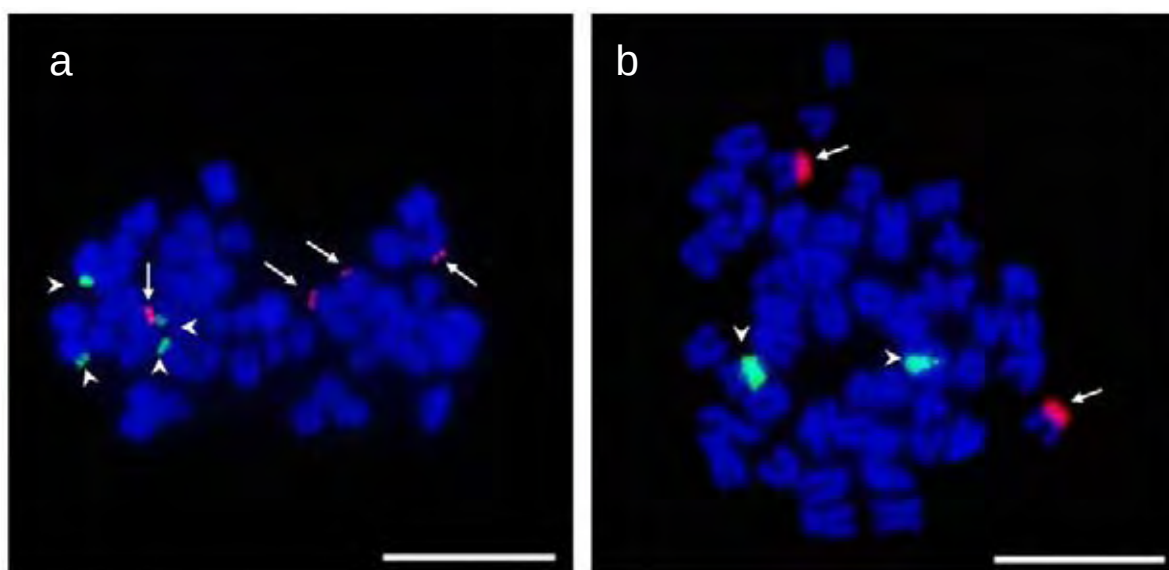


Figura 4. Técnica de *Double-FISH* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). **a.** Marcações nos cromossomos de *B. turiuba*. **b.** Marcações nos cromossomos de *B. stramineus*. As setas indicam as marcações de DNAr 18S e as cabeças de seta indicam as marcações de DNAr 5S. Barra = 10 μm .

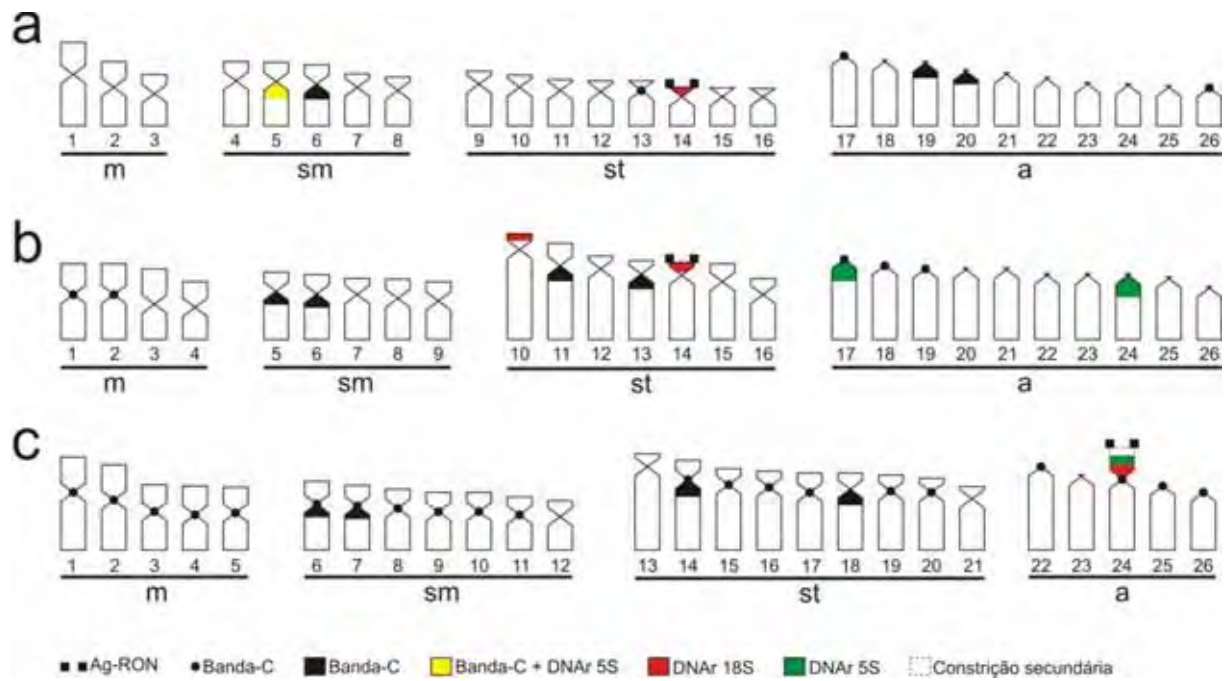


Figura 5. Idiograma representativo dos cariótipos de *B. stramineus* em **a**, *B. turiuba* em **b**, *B. cf. iheringii* em **c**.

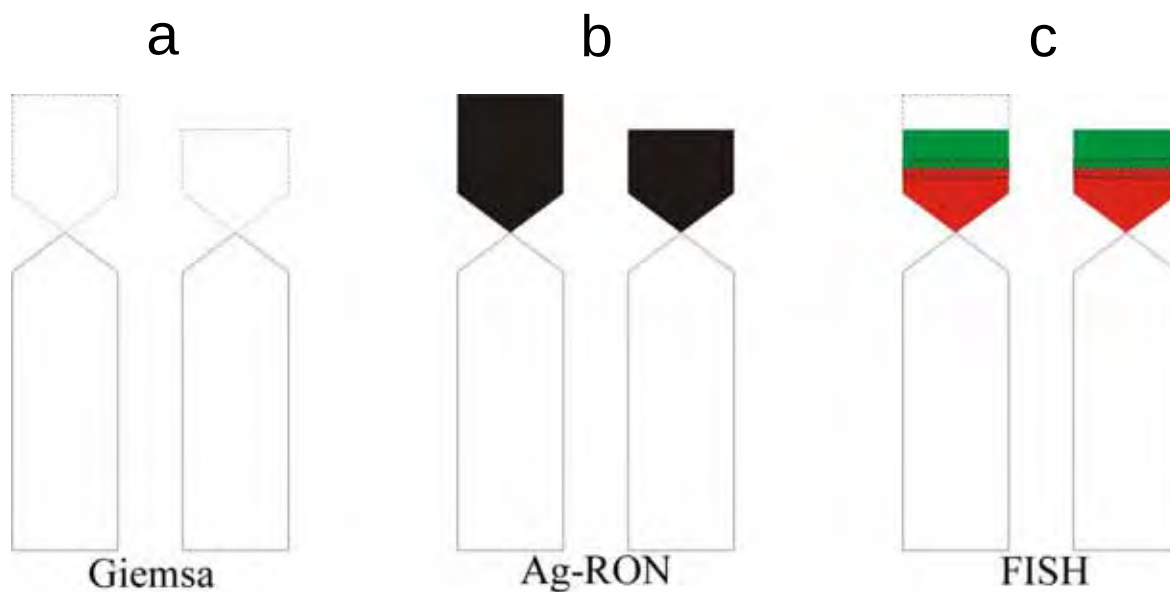


Figura 6. Par cromossômico 24 de *B. cf. iheringii*. **a.** Representação de regiões de constrição secundária em tracejado. **b.** Representação do polimorfismo do par Ag-RON. **c.** Representação das localizações de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). A faixa hachurada representa a co-localização das duas sequências de DNAr.

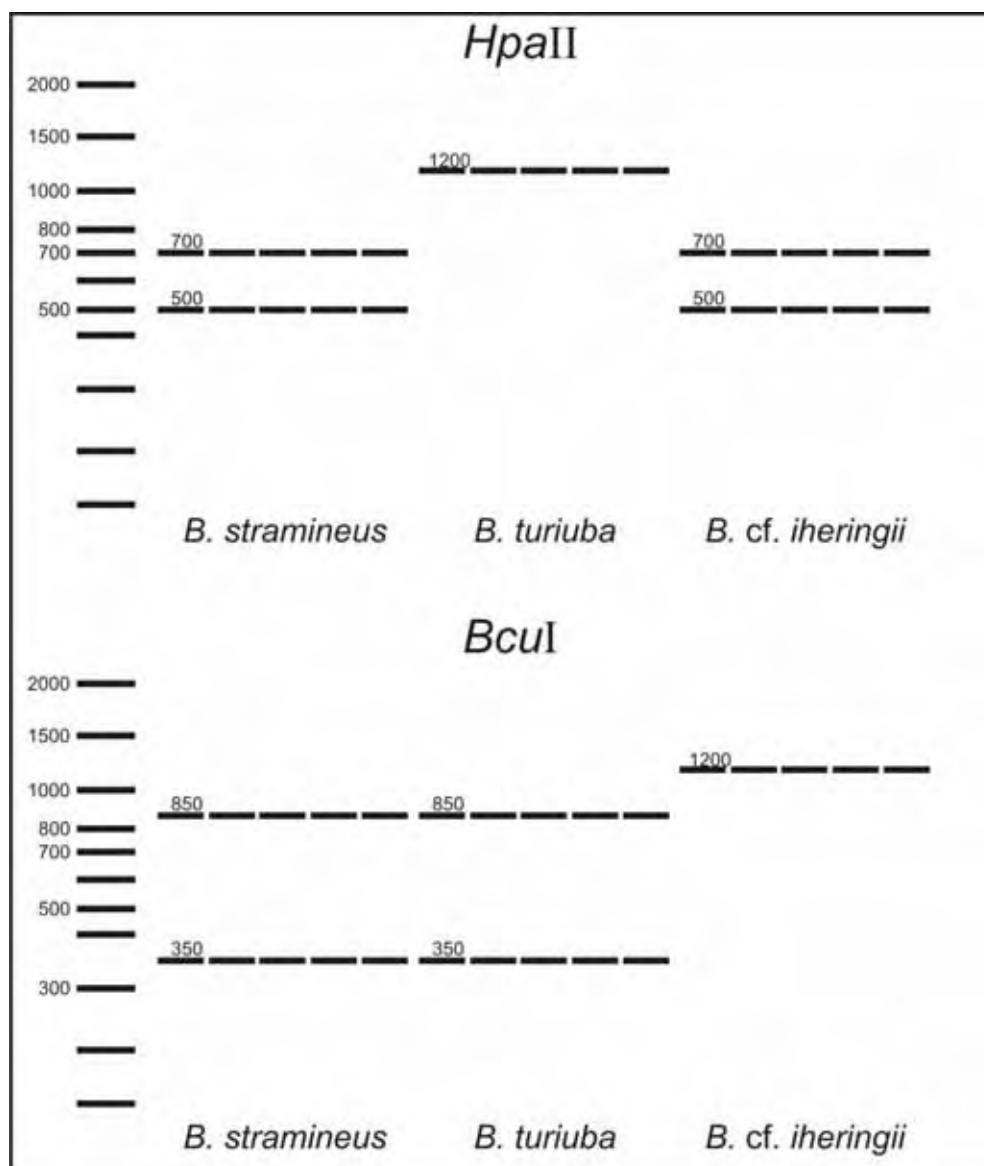


Figura 7. Esquema representativo da digestão enzimática do gene *cyt-b* pelas enzimas de restrição *HpaII* e *BcuI* em cinco exemplares de cada espécie.

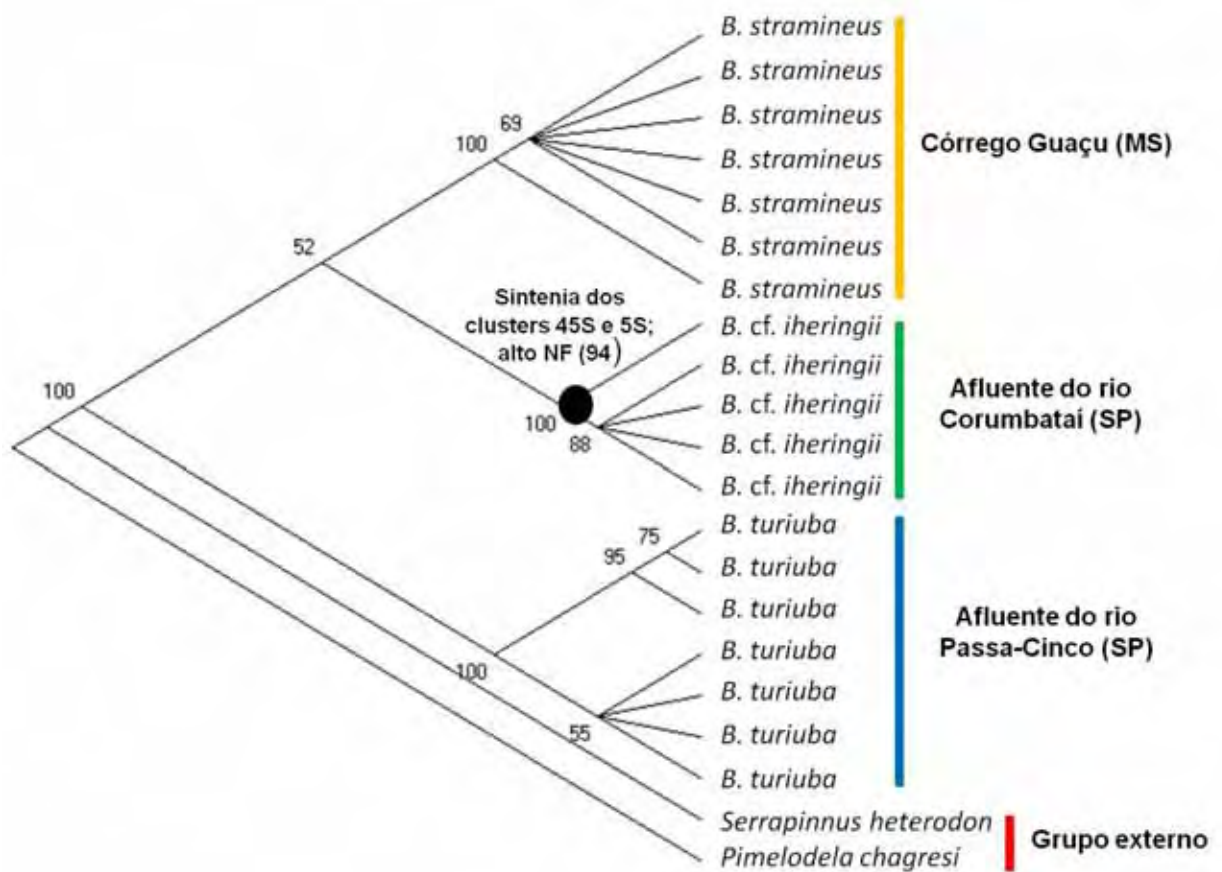


Figura 8. Análises das sequências de *cyt-b* de três entidades taxonômicas do gênero *Bryconamericus*, geradas no programa MEGA 4.0 pelo método de Máxima Parcimônia (MP). O círculo preto representa a hipótese do surgimento de características citogenéticas durante a evolução das três espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, M. P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 161-176, 2008.

CAPISTANO, T. G.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO Jr., H. F. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 203-207, 2008.

DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, p. 37-41, 2009.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families; how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**. v. 2, p. 159-165, 1986.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, C. A.; PISCOR, D.; BAILLY, D.; BATISTA-SILVA, V. F.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies comparing three Characidae fish species from the Iguatemi river basin, Brazil. **Cytologia**. v. 74, p. 329-333, 2010.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.

GÉRY, J. Characoids of the World. **Neptune City**, New Jersey, T.F.H. Publications, p. 672, 1977.

GRAVES, J. E. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. **Journal of Heredity**. v. 89, p. 427-437, 1998.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 54, p. 498-511, 2010.

KING, M. C. banding studies on Australian hyliid frogs: Secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma**. v. 80, p. 191-217, 1980.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS Jr., C. J., (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M. Jr. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. v. 7, p. 363-367, 1999.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M. Jr. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**. v. 8, p. 353-355, 2000.

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas**. v. 133, p. 39-46, 2000.

MELO, F. A. G.; BRUM, M. J. I.; BUCKUP, P. A. Cariótipos de *Deuterodon* sp e *Bryconamericus ornaticeps* de riachos costeiros do estado do Rio de Janeiro. XIII Encontro Brasileiro de Ictiologia, São Carlos, São Paulo, Brasil. Resumo, p. 145. 1999.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**. v. 8, p. 385-568, 2010.

MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**. v. 25, p. 1-40, 2009.

MORÁN, P.; MARTÍNEZ, J. L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A. M. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 75, p. 145-150, 1996.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.; VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. E. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-25, 2011.

PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**. v. 137, p. 107-112, 2002.

PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, p. 145-149, 2003.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 67, p. 31-36, 1994.

PINKEL, D.; STRUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**. v. 11, p. 307-316, 1988.

PORTELA-CASTRO, A. L. B. Citogenética de Peixes da Subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Aspectos Citotaxômicos e Evolutivos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil. 1999.

PORTELA-CASTRO, A. L. DE B.; JULIO Jr., H. F.; MARTINS-SANTOS, I. C.; PAVANELLI, C. S. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica**. v. 133, p. 113-118, 2008.

ROMÁN-VALENCIA, C. Description of a new species of *Bryconamericus* (Teleostei, Characidae) from the basin of the Golfo de Paria, northeastern Venezuela. – **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales** “Bernardino Rivadavia”, n.s. v. 4, p. 209-214, 2002.

ROMÁN-VALENCIA, C.; VANEGAS-RIOS, J. A.; RUIZ, C. R. I. Una nueva especie de pez del género *Bryconamericus* (Ostariophysi: Characidae) del río Magdalena, con una clave para las especies de Colombia. **Revista de Biología Tropical**. v. 56, p. 1749-1763. 2008.

ROMÁN-VALENCIA, C.; VANEGAS-RÍOS, J. A. Análisis filogenético y biogeográfico de las especies del género *Bryconamericus* (Characiformes, Characidae) de la baja América Central. **Caldasia**. v. 31, p. 393-406, 2009.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Volume 3. Set.** Cold Spring Harbor Laboratory Publisher, 2001.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today**. v. 9, p. 61-74, 1987.

SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2007.

WASKO, A. P.; GALETTI Jr., P. M. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**. v. 94, p. 185-193, 1998.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: p. 315-322, 1990.

ZARSKE, A.; BAIL, P. Y.; GÉRY, J. New and poorly known Characiform fishes (Teleostei: Characiformes: Characidae) from French Guyana. A new Tetra of the genus *Bryconamericus*. **Vertebrate Zoology**. v. 60, p. 3-10, 2010.

6.2. CAPÍTULO II

**VARIAÇÃO DE ATIVIDADE GÊNICA DE DNA RIBOSSOMAL
ASSOCIADO ÀS RONS EM *Piabina argentea* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE)**

(Em preparação para publicação)

Resumo

O gênero *Piabina*, anteriormente alocado na subfamília Tetragonopterinae, em uma última revisão foi considerado como membro do grupo *incertae sedis* dentro da família Characidae. Estudos citogenéticos são descritos na literatura para a espécie *Piabina argentea*, porém novos estudos envolvendo outras populações são necessários para um melhor entendimento da dinâmica cromossômica de diferentes populações. O objetivo do presente trabalho foi analisar indivíduos de uma população de *P. argentea* que ainda não tiveram seus cromossomos analisados, focando principalmente na localização e relação entre as sequências do DNAr 18S e do DNAr 5S. Os exemplares de *P. argentea* analisados no presente trabalho apresentaram número diploide de $2n=52$ cromossomos e um cariótipo composto por 6m, 8sm, 24st e 14a cromossomos e $NF=90$, dois a quatro cromossomos Ag-RON positivos, sinais CMA3+ coincidentes com as marcações Ag-RONs, regiões banda-C+ nas posições centroméricas da maioria dos cromossomos e terminais de alguns, além de cinco sítios de DNAr 18S e quatro sítios de DNAr 5S. Neste trabalho é discutida a variação intra-individual e intra-populacional de marcações Ag-positivas, assim como as marcações de DNAs ribossomais comparadas às outras populações citadas na literatura.

Palavras-chave: *Incertaine sedis*, DNAr, cromossomos, FISH, RONS.

INTRODUÇÃO

O gênero *Piabina*, anteriormente alocado na subfamília Tetragonopterinae, foi inserido no grupo “*incertae sedis*” dentro de Characidae por Reis et al. (2003) devido à incerteza do monofiletismo da subfamília. O gênero e a espécie tipo, *Piabina argentea*, foram descritos por Reinhardt em 1867. Em 1910, Eigenmann descreveu uma nova espécie pertencente ao gênero *Piabina* que recebeu o nome de *Piabina piquira*. Posteriormente, *Piabina piquira* foi considerada sinônimo de *P. argentea* (EIGENMANN; MYERS, 1929). As outras duas espécies descritas até então como pertencentes ao gênero *Piabina*, *Piabina analis* (REIS et al., 2003) e *Piabina beni* (PEARSON, 1924), hoje pertencem, respectivamente, aos gêneros *Piabarchus* e *Creagrutus* (REIS et al., 2003). Vari e Harold (1998, 2001) chegaram à conclusão de que *Piabina* é um gênero monotípico, grupo irmão do gênero *Creagrutus*.

Dados citogenéticos obtidos para diferentes populações de *P. argentea* mostram número diploide de $2n=52$ cromossomos, porém diferentes fórmulas cariotípicas e padrões de RONS foram relatados (PORTELA et al., 1988; PERES et al., 2008; FERNANDES et al., 2010). Portela et al. (1988) descreveram o cariótipo com $26m/sm+26st/a$ para exemplares de *P. argentea* provenientes do rio Mogi Guaçu (SP). PERES et al. (2007) e Peres et al. (2008) realizaram uma análise citogenética em exemplares dessa espécie e descreveram um cariótipo com $8m+14sm+16st+14a$ e número fundamental (NF) igual a 90 para as duas populações analisadas pertencentes à bacia do rio São Francisco (MG). Mais tarde, Fernandes et al. (2010) estudaram exemplares de *P. argentea* da bacia hidrográfica do rio Iguaçu (MS) e relataram uma fórmula cariotípica composta por $6m+24sm+12st+10a$ e NF = 94.

De acordo com os trabalhos descritos na literatura, as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) em *P. argentea*, podem ser simples ou múltiplas (PORTELA et al., 1988; PERES et al., 2007; PERES et al., 2008; FERNANDES et al., 2010). Portela et al. (1988) descreveram pela primeira vez o sistema Ag-RONS em *P. argentea*, tendo esta população proveniente do rio Mogi Guaçu (SP) quatro cromossomos marcados pelo nitrato de prata.

Outros sistemas Ag-RONs foram também relatados para outras localidades como descrito nos trabalhos de PERES et al. (2007) e Fernandes et al. (2010) para *P. argentea* com procedência da bacia do rio São Francisco (MG) e bacia do rio Iguatemi (MS), respectivamente, dois cromossomos Ag-RONs positivos.

Duas famílias multigênicas repetidas em *tandem* para DNA ribossomal (DNAr) são encontradas em eucariotos, as famílias 45S e 5S. Enquanto o *cluster* 45S corresponde ao maior DNAr e faz parte das RONS, o *cluster* 5S corresponde ao menor DNAr e não faz parte das RONS. Essas sequências têm sido utilizadas como sondas na técnica de hibridação *in situ* para determinar o mapeamento físico cromossômico e verificação da atividade gênica das mesmas em diversos grupos de organismos.

De acordo com dados da literatura, diferentes números de cromossomos Ag-RON positivos detectados para diferentes populações de *P. argentea* são descritos, porém o número total de RONS, detectado pela técnica de FISH, somente foi relatado para a população de *P. argentea* estudada por Peres et al. (2008). Os autores mostraram que a população por eles analisada (bacia do rio São Francisco, MG) apresentou seis sítios de DNAr 18S na posição terminal de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, além de quatro sítios de DNAr 5S na posição terminal de um par submetacêntrico e outro par subtelo/acrocêntrico.

Considerando a variação de número de RONS e fórmulas cariotípicas encontradas para as populações de *P. argentea* descritas na literatura, o presente trabalho teve como objetivo analisar exemplares de *P. argentea* provenientes da bacia do rio Corumbataí (SP) que ainda não tiveram seus cromossomos analisados, focando principalmente na localização e relação entre as sequências do DNAr 18S e do DNAr 5S.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

No presente estudo 11 exemplares de *Piabina argentea* (5 machos e 6 fêmeas) foram coletados no afluente do rio Passa-Cinco (22°23'25,4"S; 47°50'47,8"O) pertencente à bacia do rio Corumbataí no Estado de São Paulo (SP), Brasil. Os exemplares foram identificados por pesquisadores do Departamento de Zoologia de UNESP-Rio Claro e depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da mesma instituição.

Técnicas Citogenéticas

As preparações mitóticas foram obtidas de células extraídas das porções anterior e posterior do rim, de acordo com a metodologia de Foresti et al. (1981). As RONS foram analisadas após a técnica de impregnação pelo íon prata descrita por Howell e Black (1980) e a heterocromatina foi observada após o tratamento da técnica de Banda-C proposta por Sumner (1972). A detecção de regiões ricas em bases AT e GC foi realizada de acordo com a técnica de desnaturação dos cromossomos em formamida a 70 °C frequentemente utilizada no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro. De acordo com a classificação frequentemente utilizada para cromossomos de peixes, a morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão de braços e classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a).

Obtenção de sondas e Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A sonda de DNAr 18S foi obtida pelo teste de PCR utilizando os *primers* (NS1=5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8=5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') descritos por White et al. (1990); e a sonda de DNAr 5S obtida por PCR com os *primers* (A=5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B=5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') descritos por Pendás et al. (1994) e Martins e Galetti (1999). A técnica de hibridação *in situ* utilizando

as sondas de DNAr 18S e 5S marcadas por PCR com digoxigenina (Roche) ou biotina (Roche) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) com modificações feitas no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro. Lâminas com cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/mL) por 1h a 37 °C e desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%). O DNA cromossômico foi desnaturado por 4 minutos em formamida 70%/2xSSC a 70 °C e desidratado logo em seguida em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%). A solução de hibridação (20 µL de formamida 50% em 2xSSC e 10% sulfato de dextran + 6 µg/mL de sonda de DNAr) foi incubada por 10 minutos a 95 °C e aplicada em cada lâmina. Após a hibridação a 37 °C *overnight*, as lâminas foram lavadas em formamida 50%/2xSSC (pH 7,0) duas vezes por 5 minutos a 45 °C, 1xSSC duas vezes por 5 minutos a 45 °C e 4xT (1 20xSSC: 4 H₂O + 250 µL de triton100x) uma vez por 5 minutos. Os sinais foram detectados com rodamina-antidigoxigenina (Roche) para digoxigenina e avidina-FITC (Sigma) para biotina. Os cromossomos foram contra-corados com Vectashield *Mounting Medium* com DAPI e analisados com microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital modelo D71. As imagens foram capturadas usando o *software* DP-Controller.

RESULTADOS

Os exemplares de *Piabina argentea* apresentaram número diploide de $2n=52$ cromossomos e um cariótipo composto por 6m, 8sm, 24st e 14a cromossomos e NF igual a 90 para ambos os sexos (Figura 1). As RONS que estavam ativas foram observadas após a impregnação do nitrato de prata, sendo que dois exemplares apresentaram variação no número de cromossomos marcados intraindividualmente, demonstrando células com três e células com quatro cromossomos marcados (Figura 2a,b). Os outros nove exemplares analisados apresentaram um par Ag-RON positivo (Figura 2c). Essas se localizam na região terminal do braço curto de cromossomos do tipo subtelocêntrico (Figura 2d-1,2,3).

A técnica de dupla coloração CMA₃/DAPI mostrou-se positiva para o fluorocromo CMA₃ e negativa para o DAPI nos locais coincidentes as posições Ag-RON positivas nos

pares oito e 16 de todos os exemplares analisados (Figura 2d-4, 3d). A técnica de FISH com sonda de DNAr 18S detectou cinco cromossomos marcados (Figura 3a), enquanto as regiões de DNAr 5S foram detectadas em quatro cromossomos, um par submetacêntrico e um par acrocêntrico (Figura 3b). As regiões de heterocromatina foram observadas nas porções centroméricas da maioria dos cromossomos e na porção terminal de alguns (Figura 3c).

DISCUSSÃO

O número diploide de $2n=52$ cromossomos para *P. argentea* é conservado, porém diferentes fórmulas cariotípicas e sistemas de RONS discutidos na literatura indicam que o genoma de *P. argentea* é muito dinâmico, podendo eventos de rearranjos cromossômicos, tais como inversões e translocações, ou ações de elementos de transposição explicar tais divergências.

A variação em número de cromossomos Ag-RON positivos encontrada nas células de dois exemplares de *P. argentea*, no presente trabalho, deve-se à diferença de transcrição dessas sequências, uma vez que cinco cromossomos mostraram sítios de DNAr 18S detectados após a técnica de FISH. Essa diferença de atividade pode ser explicada pela necessidade das células em produzir ribossomos, que são unidades essenciais para o processo de produção de proteínas. Assim, por algum motivo os exemplares que apresentaram a variação intra e inter-individual necessitaria de uma produção maior de ribossomos, ativando ou não as diferentes regiões portadoras de DNAr associado às RONS.

Os diferentes números de RONS descritos na literatura, para diferentes populações de *P. argentea*, pode ser resultado da ação de elementos transponíveis, que podem carregar genes com eles quando são transpostos (SYVANEN, 1984). Diferentemente dos dados apresentados no presente trabalho, Peres et al. (2008) relataram para uma população do rio São Francisco (MG) seis sítios de DNAr 18S localizados no braço curto de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Por outro lado, os sítios de DNAr 5S foram evidenciados na região terminal do braço curto de dois pares cromossômicos, um

submetacêntrico e outro subtelocêntrico ou acrocêntrico, como observado no presente trabalho.

Diferentes números de RONS têm sido também relatados para exemplares de muitas populações da espécie *Astyanax*, outro gênero alocado em *incertae sedis* dentro de Characidae. Tal diferença numérica inter-individual encontrada tanto em *Astyanax* como em *Piabina* pode também ser consequência de eventos de translocação simples ou ainda, de acordo com Schweizer e Loidl (1987), por troca de regiões terminais de material genético devido as suas proximidades dentro do núcleo interfásico, promovido pelo ordenamento dos cromossomos de acordo com o modelo de Rabl.

Outro marcador cromossômico que pode estar associado às RONS foi detectado após o tratamento com o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA₃). Este fluorocromo pode, em algumas espécies, evidenciar regiões de DNAr 45S, como observado por Gromicho et al. (2005) em exemplares do gênero *Squalius*. Os ITS (espaçadores transcritos internos) encontrados entre os genes associados às RONS são geralmente ricos em GC (TORRES et al., 1990) e compostos de sequências repetitivas (KING, 1991), o que poderia justificar a detecção das RONS através do emprego da técnica com fluorocromo GC base-específico nos exemplares de *P. argentea* deste estudo.

Vários autores têm chamado a atenção de que, além das RONS, outros segmentos de heterocromatina podem também exibir fluorescência após a coloração com fluorocromo GC base-específico (GORNUNG et al., 1997; ROSSI et al., 1997; ARTONI et al., 1999; MARGARIDO; GALETTI Jr., 2000). Tal característica tem sido observada em outros grupos, como por exemplo, nos besouros *Thorectes intermedius*, nos quais as colorações com CMA₃ e prata foram incapazes de localizar sítios de RONS, uma vez que ambas as técnicas coraram regiões de heterocromatina constitutiva (VITTURI et al., 1999).

Os dados observados no presente trabalho poderão contribuir para o entendimento da variação de número e posições das sequências de DNAr associadas ao nucléolo entre as diferentes populações de *P. argentea* e, ainda entender a dinâmica destas sequências dentro de Characidae. Uma avaliação dos dados citogenéticos obtidos neste trabalho,

juntamente com os resultados descritos na literatura, reforçam a ampla variabilidade das localizações de DNAr 18S e 5S dentro da família Characidae, em comparação a outras famílias, tais como as famílias Anostomidae e Bryconinae, as quais mostram padrões cariotípicos homogêneos.

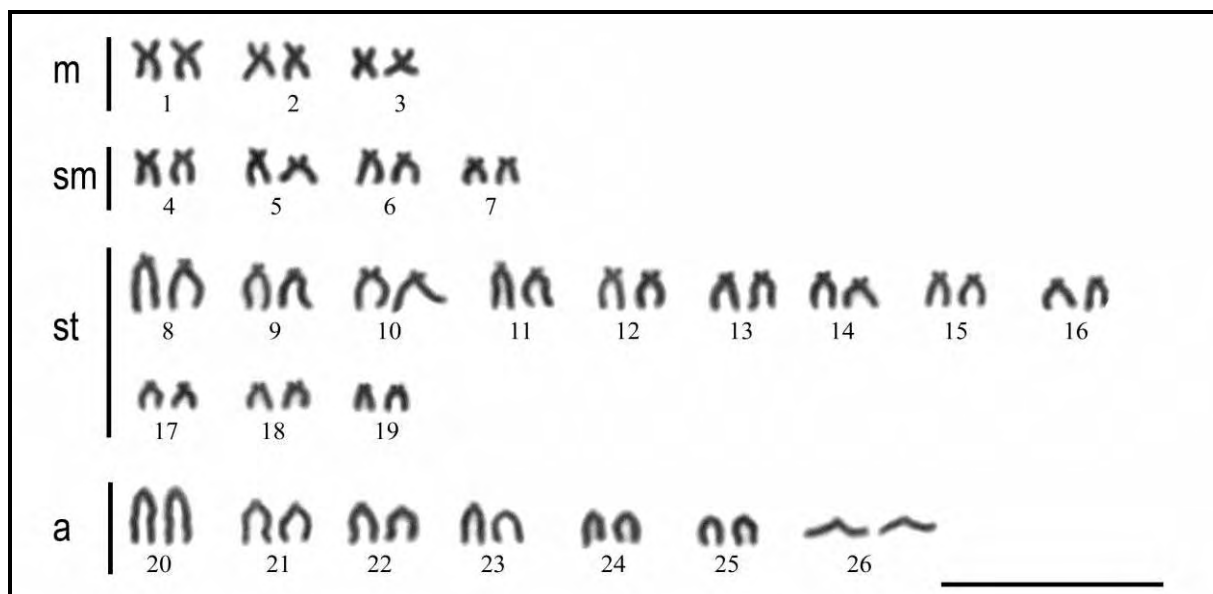


Figura 1. Cariótipo de *P. argentea* em coloração convencional com Giemsa.

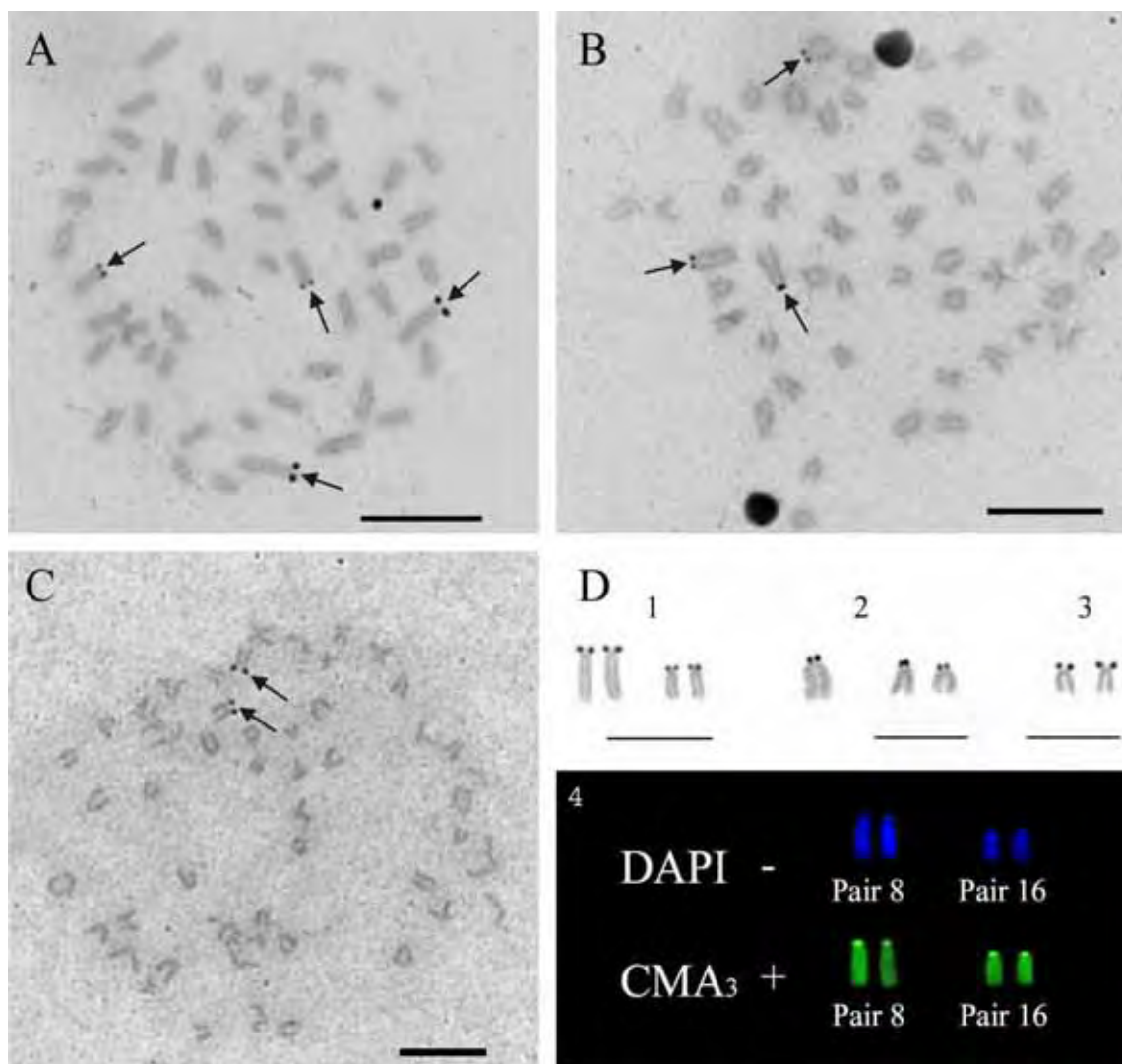


Figura 2. Cromossomos submetidos à técnica de impregnação por nitrato de prata. Em **A**, **B** e **C** variação de sistemas de RONS nas regiões terminais dos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos. **D.** Em destaque **1**, **2** e **3** variação dos cromossomos Ag-RONS e em **4** os pares oito e 16 ricos em bases GC.

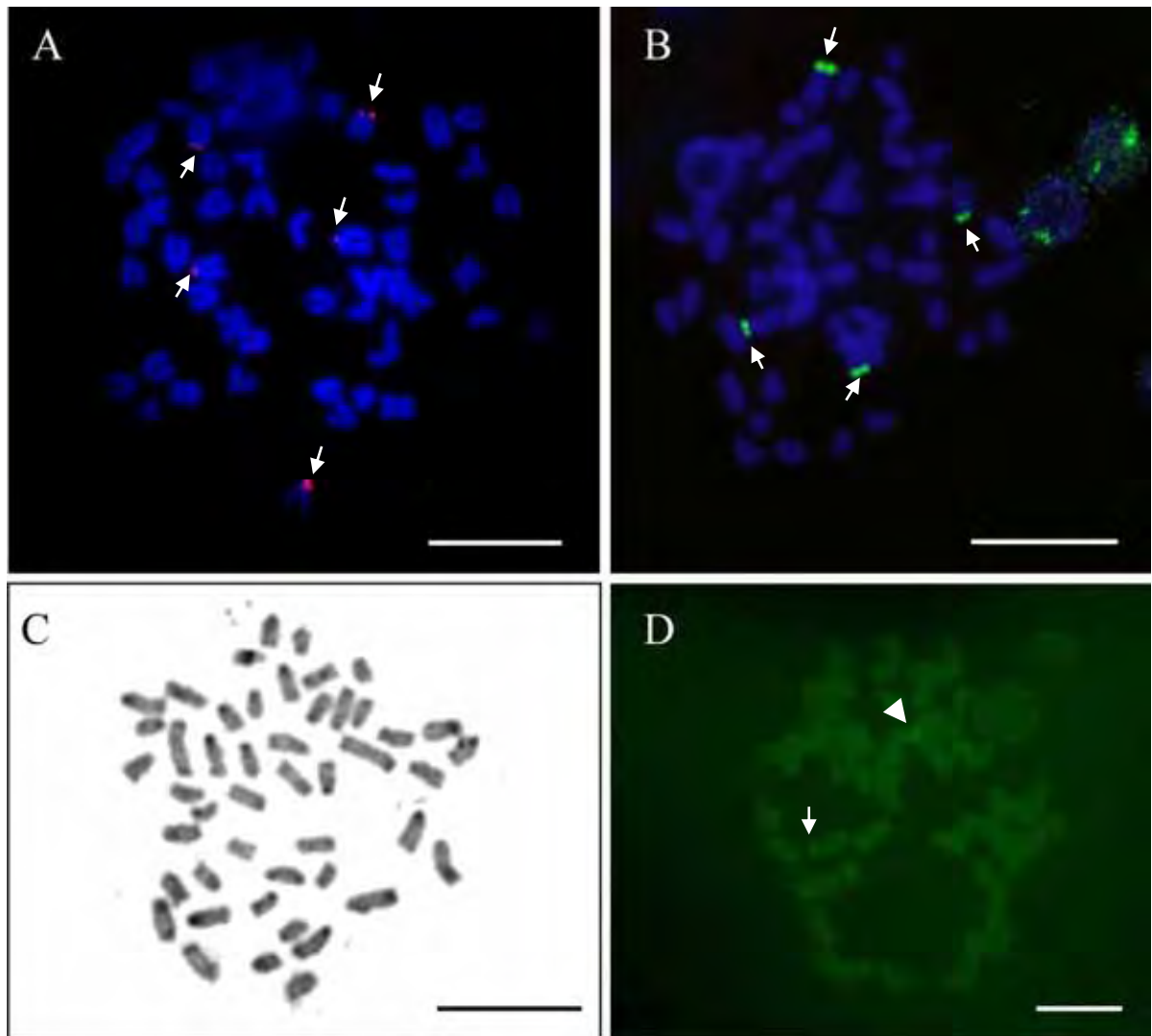


Figura 3. **A.** Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S: as setas indicam cinco cromossomos marcados. **B.** FISH com sonda de DNAr 5S: as setas indicam quatro cromossomos marcados. **C.** Bandamento C. **D.** Coloração CMA₃ evidenciando regiões GC ricas nos cromossomos portadores dos cístrons ribossomais 45S: a seta indica um cromossomo marcado e a cabeça de seta indica três marcações muito próximas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTONI, R. B.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**. v. 22, p. 39-44, 1999.

FERNANDES, C. A.; PISCOR, D.; BAILLY, D.; BATISTA-SILVA, V. F.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies comparing three Characidae fish species from the Iguatemi river basin, Brazil. **Cytologia**. v. 74, p. 329-333, 2010.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.

GORNUNG, E.; GABRIELLI, I.; CATAUDELLA, S.; SOLA, L. CMA₃- banding pattern and fluorescence in situ hybridization with 18S rDNA genes in zebra fish chromosomes. **Chromosome Research**. v. 5, p. 40-46, 1997.

GROMICHO, M.; OZOUF-COSTAZ, C.; COLLARES-PEREIRA, M. J. Lack of correspondence between CMA₃-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. **Cytogenetics and Genome Research**. v. 109, p. 507-511, 2005.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**. v. 62, p. 361-367, 1977.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JORDAN, G. At the heart of the nucleolus. **Nature**. v. 329, p. 489-490. 1987.

KING, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: **Amphibian Cytogenetic and Evolution**. D. M. GREEN AND S. K. SESSIONS (Eds.), Academic Press, San Diego. p. 359-391, 1991.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI Jr., P. M. Amplification of a GC rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, p. 569-573, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. v. 7, p. 363-367, 1999.

PEARSON, N. E. The fishes of the Eastern Slope of the andes. **Indiana Universit Studies**. v. 11 (64), p. 1-83, 1924.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 67, p. 31-36, 1994.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics between three Characidae fish species from the São Francisco River basin. **Caryologia**. v. 60, p. 64-68, 2007.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 222-226, 2008.

PINKEL, D.; STRUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hibridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**. v. 11, p. 307-316, 1988.

REIS, R. E. Subfamily Tetragonopterinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS Jr., C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 212, 2003.

ROSSI, A. R.; GORNUNG, E.; CROSSETTI, D. Cytogenetic analysis of *Liza ramada* (Pisces, Perciformes) by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. **Heredity**. v. 79, p. 83-87, 1997.

SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and at rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma**. v. 77, p. 83-103, 1980.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosomes Today**. v. 9, p. 61-74, 1987.

SUMMER, A. T. A simple techine for demonstrating centromeric heterochromation. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

SYVANEN, M. The evolutionary implications of mobile genetic elements. **Annual Review of Genetics**. v. 18, p. 271-273, 1984.

TORRES, R. A.; GANAL, M.; HEMLEBEN, V. GC balance in the internal transcribed spacer ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. **Journal of Molecular Evolution**. v. 30, p. 170-181, 1990.

VARI, R.P. E HAROLD, A. S. The genus *Creagrutus* (Teleostei: Characiformes: Characidae) Monophyly, Relationships, and Undetected Diversity. p. 245-260, in Malabarba, L. R.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre. Brasil: Edipucrs. 603 p. 1998.

VARI, R. P. E HAROLD, A. S. Phylogenetic Study of Neotropical Fish Genera *Creagrutus* Gunther and *Piabina* Reinhardt (teleostei; Ostariophysi:Characiformes), with a Revision of Cis-Andean Species. **Smithsonian Contributions to Zoology**. v. 613, 1-239, 2001.

VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; BARBIERI, R.; ZUNINO, M. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization. **Chromosome Research**. v. 7, p. 255-260, 1999.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. p. 315-322, 1990.

6.3. CAPÍTULO III

OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO EM *Hyphessobrycon eques* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

(Em preparação para publicação)

Resumo

O gênero *Hyphessobrycon* permanece alocado no grupo *incertae sedis* dentro de Characidae, sendo um dos gêneros com o maior número de espécies em *incertae sedis*. Os cromossomos de algumas espécies de *Hyphessobrycon* são conhecidos, sendo o número diploide $2n=50$ cromossomos o mais frequente para o gênero. Os objetivos do presente estudo foram verificar a composição do cariótipo, a macroestrutura da heterocromatina e investigar a localização de marcações Ag-positivas em *Hyphessobrycon eques*, além de demonstrar mais um exemplo de que o cromossomo B possa estar ligado à origem dos cromossomos sexuais em peixes. O número diploide encontrado para a população de *H. eques*, pertencente à bacia do rio Corumbataí, foi de $2n=52$ cromossomos e uma fórmula cariotípica composta por 12m, 18sm, 8st e 14a cromossomos e $NF=90$ para ambos os sexos. Foi relatada a presença de um microcromossomo B somente nos exemplares fêmeas analisadas, além de cinco pares Ag-positivos e regiões C-positivas nas posições centroméricas, terminais da maioria dos cromossomos e no braço longo do microcromossomo. Ainda, é discutida a possível relação do microcromossomo B em fêmeas de *H. eques* com a origem dos cromossomos sexuais em peixes.

Palavras-chave: Cromossomos B, DNA repetitivo, heterocromatina, RONS.

INTRODUÇÃO

Representantes do gênero *Hyphessobrycon*, atualmente encontram-se alocados no grupo *incertae sedis* dentro de Characidae (REIS et al., 2003). O gênero *Hyphessobrycon* é numeroso, contendo aproximadamente 100 espécies segundo Lima et al. (2003). Dentre essas, a espécie conhecida popularmente como mato grosso durante muito tempo foi considerada como *Hyphessobrycon callistus* Boulenger, 1900 que segundo a revisão de Weitzman e Palmer (1997), passou a ser classificado como *Hyphessobrycon eques*.

Pouco se conhece sobre a citogenética do gênero *Hyphessobrycon*, porém sabe-se que o número diploide pode variar de $2n=42$ a $2n=52$ cromossomos, sendo $2n=50$ cromossomos o número mais frequentemente observado para algumas espécies, tais como *Hyphessobrycon scholzei* (AREFJEV, 1990), *Hyphessobrycon reticulatus* (WLASIUK; GARCIA, 1996; CARVALHO et al., 2002), *Hyphessobrycon bifasciatus* (MIYAZAWA, 1997), *Hyphessobrycon* aff. *santae* (MIYAZAWA, 1997) e *Hyphessobrycon anisitsi* (CENTOFANTE et al., 2003). De acordo com Carvalho et al. (2002) muitas espécies do gênero já foram “cariotipadas”, embora para várias espécies somente o número haploide tenha sido descrito.

As regiões organizadoras de nucléolo estudadas para algumas espécies do gênero *Hyphessobrycon* podem ser do tipo múltiplo para *H. bifasciatus* (MIYAZAWA, 1997) e *H. aff. santae* (MIYAZAWA, 1997; CENTOFANTE; MOREIRA-FILHO, 2000). Também foram observadas RONS múltiplas em duas populações de *H. anisitsi*, analisadas pela técnica de FISH com sondas de DNAr 18S, uma do rio Piracuama que apresentou 13 cromossomos marcados, e outra do córrego Perdizes que mostrou dez cromossomos marcados (CENTOFANTE et al., 2003). Diferentemente, *H. reticulatus* apresentou, na posição pericentromérica do par subtelocêntrico 20, somente um par nucleolar marcado pela impregnação do nitrato de prata (CARVALHO et al., 2002), sendo necessária a detecção das sequências de DNAr 45S para confirmar se este é o único par portador destes cístrons ribobomais.

Com relação à presença de cromossomos B em *Hyphessobrycon*, estes não foram relatados até o presente momento para o gênero. Os cromossomos B são encontrados em

aproximadamente 40 espécies de peixes Neotropicais de diferentes táxons (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; OLIVEIRA et al., 1997). A ocorrência desse tipo de cromossomo entre os indivíduos de uma população pode ser esporádica, ou ser comumente encontrada para muitos espécimes, podendo mostrar alta frequência entre os indivíduos. É possível encontrar também variações em relação à morfologia, tamanho, número e padrão de heterocromatina nos cromossomos B (PAULS; BERTOLLO, 1983, 1990; VENERE et al., 1999; CAVALLARO et al., 2000; FERNANDES; MARTINS-SANTOS 2005; ARTONI et al., 2006).

Outros grupos, também alocados em *incertae sedis*, tais como os gêneros *Astyanax* e *Moenkausia*, apresentam esses elementos genômicos extras em seu complemento cariotípico. Exemplares de *Astyanax scabripinnis* do rio Jacu (ES) apresentaram de 0 a 4 microcromossomos B restritos somente aos machos da espécie (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Em diferentes populações estudadas por Salvador e Moreira-Filho (1992) em Campos de Jordão (SP), foi verificada a ocorrência de 1 e 2 cromossomos B metacêntricos em exemplares de ambos os sexos. Portela-Castro et al. (2001) relataram para *Moenkhausia sanctaefilomenae* proveniente do rio Paraná (PR) a presença de 0 a 2 microcromossomos B.

De acordo com Foresti (1998), os cromossomos B poderiam ter sua origem em um processo denominado “de novo”, em tentativas da natureza de formar constantemente novas unidades genômicas. De acordo com o autor, sequências de nucleotídeos formadas continuamente pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados, com a adição ao acaso de sequências centroméricas e teloméricas, permitiriam a formação e manutenção dessas estruturas no genoma. Tais segmentos seriam neutros e sem produtos gênicos, até que elementos transponíveis ativos pudessem ser agregados.

Outra hipótese proposta para explicar a presença e função dos cromossomos B é a do isocromossomo (VICENTE et al., 1996, MESTRINER, 2000, entre outros). De acordo com Sumner (2003) os isocromossomos são cromossomos com braços homólogos, isto é,

braços que são estruturalmente e geneticamente idênticos, podendo ser originado de diversas formas. O autor explica que uma das hipóteses sugerida para o surgimento desse tipo de cromossomo é através da fusão de dois cromossomos acrocêntricos idênticos.

Considerando a diversidade de hipóteses descritas na tentativa de esclarecer a origem e função dos cromossomos B, o presente trabalho tem como propósito verificar a macroestrutura da heterocromatina e investigar a localização de marcações Ag-positivas em *H. eques*, além de demonstrar mais um exemplo de que esses elementos genômicos extras possam estar ligados a origem dos cromossomos sexuais em peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

No presente estudo oito exemplares de *Hyphessobrycon eques* (Seis machos e duas fêmeas) foram coletados no Ribeirão Claro (22°21'36"S; 47°30'42"O) pertencente à bacia do rio Corumbataí no Estado de São Paulo (SP), Brasil.

Técnicas Citogenéticas

As preparações mitóticas foram obtidas de células extraídas das porções anterior e posterior do rim, de acordo com a metodologia de Foresti et al. (1981). As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram analisadas após a técnica de impregnação pelo íon prata descrita por Howell e Black (1980) e a heterocromatina foi observada após o tratamento da técnica de Banda-C proposta por Sumner (1972). De acordo com a classificação frequentemente utilizada para cromossomos de peixes, a morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão de braços. Os cromossomos com dois braços foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st) e os cromossomos considerados com um braço como acrocêntrico (a).

RESULTADOS

O número diploide encontrado para esta população foi de $2n=52$ cromossomos e uma fórmula cariotípica composta por 12m, 18sm, 8st e 14a cromossomos e número fundamental (NF) igual a 90 para ambos os sexos (Figura 1a,b; Tabela 1). Uma região de constrição secundária foi observada no braço curto de um dos homólogos do par 19, além de uma região de descondensamento próxima do centrômero do par 12 no cariótipo de todos os exemplares analisados (Figura 1a,b).

As RONS foram observadas após a impregnação pelo nitrato de prata nas porções terminais dos braços curtos do primeiro par metacêntrico e do par cromossômico subtelocêntrico 18 e em um dos homólogos do par subtelocêntrico 19 (Figura 2a) coincidindo com a região de constrição secundária. Foi observada a presença de um microcromossomo B do tipo subtelocêntrico nos cariótipos de dois exemplares fêmeas analisados (Figura 2c). A heterocromatina banda-C positiva foi evidenciada nas porções centroméricas e terminais da maioria dos cromossomos e no braço curto do par 19, o qual se apresentou inteiramente heterocromático na região de constrição secundária (Figura 2b,d). Além destas marcações o braço longo do microcromossomo B foi visualizado totalmente heterocromático (Figura 2d).

DISCUSSÃO

Embora o número diploide de $2n=52$ cromossomos para *Hyphessobrycon eques* não seja o mais frequente para o gênero, ele foi registrado para *H. stictus* (OLIVEIRA et al., 1988), *H. flameus* e *H. herbertaxdroidi* (AREFJEV, 1990). No gênero *Hyphessobrycon*, o número diploide de $2n=50$ cromossomos tem sido relatado com maior frequência para algumas espécies como *H. scholzei* (AREFJEV, 1990), *H. reticulatus* (WLASIUK; GARCIA, 1996; CARVALHO et al., 2002), *H. bifasciatus* (MIYAZAWA, 1997), *H. aff. santae* (MIYAZAWA, 1997) e *H. anisitsi* (CENTOFANTE et al., 2003) (Tabela 1).

Marcações Ag-positivas nos cromossomos de *H. eques* indicam um sistema de RONS múltiplas. Tal característica também foi observada para os cromossomos de *H. bifasciatus* (MIYAZAWA, 1997) e *H. aff. santae* (MIYAZAWA, 1997). Diferentemente, *H. anisitsi* apresentou somente um par nucleolar (RONS simples) após a impregnação do nitrato de prata (CENTOFANTE et al. 2003). Além disso, outra característica interessante, detectada no presente trabalho, para *H. eques* foi a localização de RONS na região de constrição secundária (um dos homólogos do par 19), o que não foi observado em nenhuma outra espécie do gênero descrita na literatura.

De acordo com Kasahara (2009) a maioria das constrições secundárias contém sequências de DNAr, o que pode ser confirmado com o uso de técnicas específicas para a identificação dos organizadores nucleolares, como a impregnação pelo nitrato de prata. A autora ainda explica que, com menos frequência, as regiões de constrição secundária correspondem a regiões heterocromáticas que aparecem alociclicamente descondensadas em cromossomos metafásicos ou são sítios frágeis, locais considerados mais suscetíveis a sofrerem quebras.

Regiões de heterocromatina foram evidenciadas após a técnica de banda-C principalmente nas porções centroméricas da maioria dos cromossomos de *H. eques*, porém um grande bloco de heterocromatina na região de constrição de um dos homólogos do par 19 coincidente com a região de constrição chama a atenção. Diferentemente, Carvalho et al. (2002) detectaram pequenos blocos de heterocromatina foram observados na posição pericentromérica de todos os cromossomos de *H. reticulatus* proveniente do rio Juquiá (SP). Centofante et al. (2003) observaram para duas populações de bacias hidrográficas adjacentes (Bacia do alto rio Paraná e bacia do Paraíba do Sul) blocos heterocromáticos, principalmente na posição pericentromérica da maioria dos cromossomos.

No presente trabalho é relatada pela primeira vez a presença de cromossomo B no gênero *Hyphessobrycon*. O mesmo foi observado nas metáfases das duas fêmeas analisadas de *H. eques* os quais apresentaram o braço longo totalmente heterocromático, sendo que os machos não apresentaram cromossomos B. De acordo com Leach et al.

(2004) análises da estrutura molecular têm mostrado que cromossomos B estão sujeitos ao silenciamento gênico, ao acúmulo de DNA repetitivo e a heterocromatização. Assim, a maior parte dos cromossomos B são heterocromáticos devido à presença de cromatina caracterizada por um alto nível de condensação durante o ciclo celular e essa compactação natural é resultante do alto conteúdo de DNA repetitivo de vários tipos, especialmente DNA satélite e DNA ribossomal (CAMACHO, 2005).

Diferentes postulações têm sido formuladas para explicar a evolução independente dos cromossomos B no genoma dos organismos portadores. Camacho et al. (2000) afirmam que, subsequentemente ao isolamento sináptico do cromossomo B e independente de sua origem, também processos de evolução molecular, passaram a ocorrer, determinando uma morfologia degenerada para esses segmentos genômicos. Dessa forma, as suas características morfológicas e estruturais seriam mais um reflexo de processos de evolução molecular do que a forma em que foram originados. Diante disso, é visível que os cromossomos supranumerários não apresentam um modelo de origem comum, ou seja, podem ter se originado de forma independente seguindo diferentes vias evolutivas.

Sob uma hipótese para cromossomos supranumerários em *H. eques*, como estes estão restritos ao complemento cariotípico das fêmeas da população do Ribeirão Claro, e considerando que a origem e diferenciação dos cromossomos sexuais em peixes podem estar relacionadas a eventos de rearranjos cromossômicos e à acumulação de DNA repetitivo (ARTONI; BERTOLLO, 2001), estes elementos peculiares podem estar associados ao processo de diferenciação de cromossomos sexuais em *H. eques*, contribuindo para o conhecimento a respeito da origem e evolução de cromossomos sexuais em peixes.

Tabela 1. Revisão bibliográfica de dados do número diploide, fórmula cariotípica e presença de cromossomos B para espécies pertencentes ao gênero *Hyphessobrycon*.

Espécies	Número diploide	Fórmula cariotípica	Presença de B	Referências
<i>H. minor</i>	52	14m+20sm+16st	-	Arefjev (1989)
<i>H. schoolzei</i>	50	8m+20sm+8st+14a	-	Arefjev (1990)
<i>H. flammeus</i>	52	18m,sm+32st+2a	-	Arefjev (1990)
<i>H. herbertaxdroidi</i>	52	10m,sm+42st,a	-	Arefjev (1990)
<i>H. reticulatus</i>	50	20m+14sm+16st,a	-	Wlasiuk e Garcia (1996)
<i>H. reticulatus</i>	50	14m+20sm+16st	-	Carvalho et al. (2002)
<i>H. bifasciatus</i>	50	16m+10sm+12st+12a	-	Miyazawa (1997)
<i>H. aff. santae</i>	50	12m+10sm+10st+18a	-	Miyazawa (1997)
<i>H. anisitsi</i>	50	6m+16sm+12st+16a	-	Centofante et al. (2003)
<i>H. aff. agulha</i>	50	6m+16sm+12st+16a	-	Centofante et al. (2003)
<i>H. luetkenii</i>	50	6m + 8sm + 36a	-	Mendes et al. (2011)
<i>H. eques</i>	52	12m+18sm+8st+14a	1♀ e 0♂	Presente trabalho

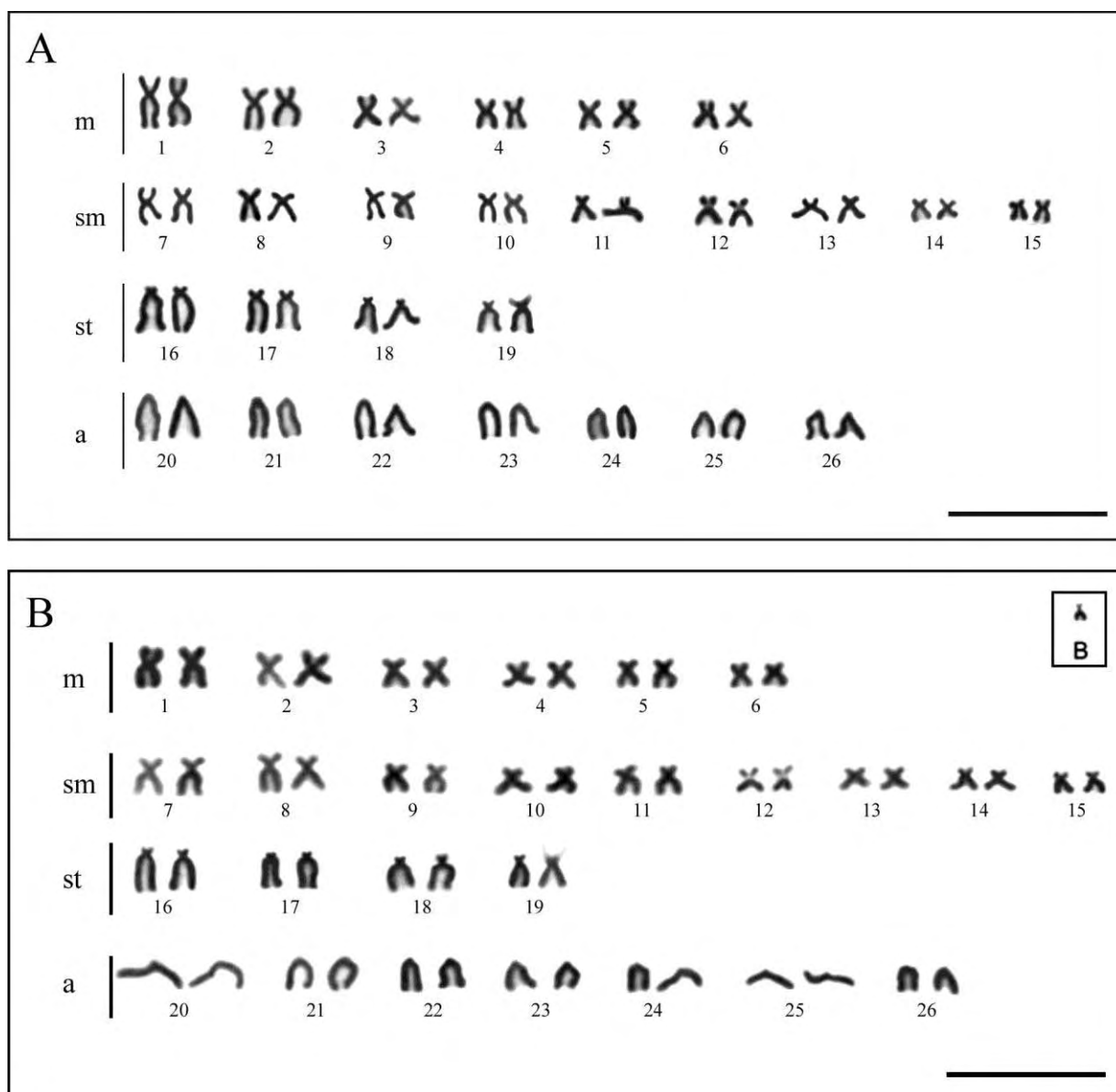


Figura 1. A. Cariótipo de machos de *H. eques* sem a presença de cromossomo B. B. Cariótipo de fêmea de *H. eques* com a presença de um microcromossomo B em destaque.

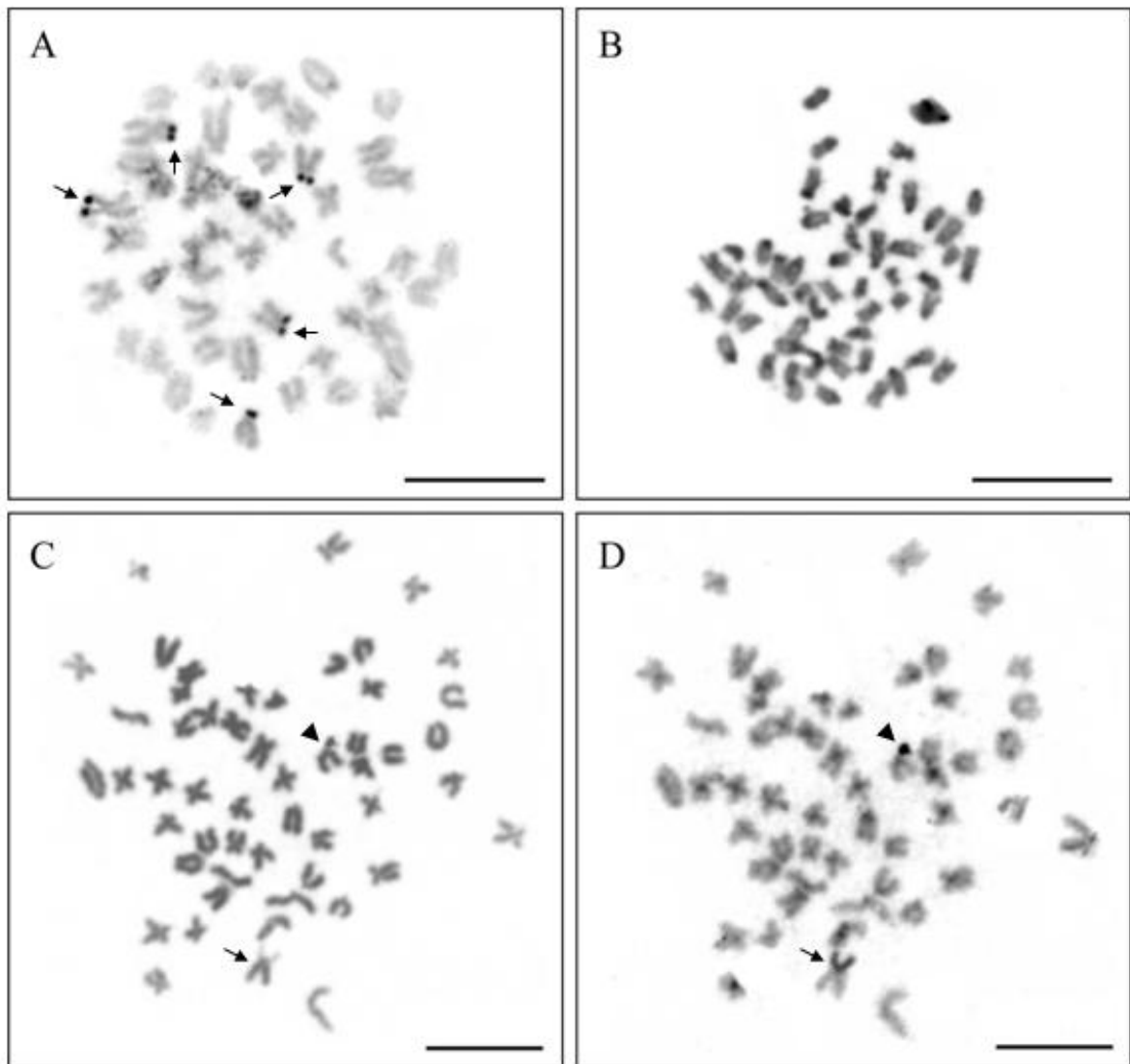


Figura 2. **A.** Técnica de impregnação do nitrato de prata. As setas indicam as marcações Ag-RONs positivas. **B.** Cromossomos de machos de *H. equus* submetidos ao bandamento C. **C.** Metáfase de fêmea de *H. equus* corada com Giemsa. A seta indica cromossomo com constrição secundária (c.s.) e a cabeça de seta indica o microcromossomo B. **D.** Técnica de bandamento C sequencial. A seta indica a região C-positiva para a c.s. e a cabeça de seta indica marcação C-positiva para o microcromossomo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AREFJEV, V. A. Chromosome complements of four characid species (Characidae, Teleostei). **Zoologicheskii Zhurnal**. 68, 82-91. 1989.

AREFJEV, V. A. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. **Caryologia**. 43, 305-319. 1990.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**. v. 134, p. 201-210, 2001.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Evolution of B chromosomes in the Prochilodontidae fish, *Prochilodus lineatus*. **Genetica**. v. 127, p. 277-284, 2006.

CAMACHO, J. P. M. **B chromosomes**. In: Gregory, T.R. The evolution of the genome. San Diego, California, USA, p. 223-286, 2005.

CAMACHO, J. P.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **Philosophical Transactiona of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 355, p. 163-178, 2000.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetics analysis of five species of the subfamily Tetragnopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia**. V. 55, p. 181-188, 2002.

CAVALLARO, Z. I.; BERTOLLO, L. A. C.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research**. v. 8, p. 627-634, 2000.

CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O. **Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas na Serra da Mantiqueira, região de Campos do Jordão - SP**. Apresentado no VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus-AM, Brasil. pp. 62, 2000.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MIYAZAWA, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragnopterinae). **Cytologia**. v. 68, p. 283-288, 2003.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**. v. 124, p. 301-306, 2005.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F. **Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes**. Resumos do VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Londrina-PR. 1998.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto-SP. 2009.

LEACH, C. R.; HOUBEN, A.; TIMMIS, J. N. The B chromosome in *Brachycome*. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 106, p. 199-209, 2004.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS Jr., C. J., (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

MENDES, M. M.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA. **Genetics and Molecular Research**. (Online Journal). 2011.

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.

MIYAZAWA, C. S. **Citogenética de caracídeos da bacia do rio Paraguai**: Análises citotaxonômicas, evolutivas e considerações biogeográficas. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil. 1997.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRISKI, H. H.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**. 11, 307-316, 1988.

OLIVEIRA, C.; SABOYA, S. M. R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A.; BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**. v. 79, p. 473-476, 1997.

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Evidence for a system of a supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**. v. 36, p. 207-314, 1983.

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**. v. 81; p. 117-123, 1990.

PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO-JÚNIOR, H. F.; NISHIYAMA, P. B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica**. v. 110, p. 277-283 2001.

REIS, R. E. Subfamily Tetragonopterinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS Jr., C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 212, 2003.

ROCON-STANGE, E. A. R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética**. v. 16, p. 601-615, 1993.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**. v. 69, p. 50-56, 1992.

SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

VENERE, P. C.; MYIAZAWA, C. S.; GALETTI Jr., P. M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genetic and Molecular Research**. v. 22, p. 345-349, 1999.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-rat distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 74, p. 70-75, 1996.

WEITZMAN, S.H.; PALMER, L. The common serpa Tetra of aquarists, identified as *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882). **Tropical Fish Hobbyist**. v. 45, p. 140-150, 1997.

WLASIUK, G.; GARCIA, G. **Análisis Preliminar del cariótipo y del processo meiótico en *Hyphessobrycon reticulatus* (Characidae, Tetragonopterinae), procedente de Rocha, Uruguay.** Apresentado no VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. p. 56, 1996.

6.4. CAPÍTULO IV

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Astyanax* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE
DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS**

(Em preparação para publicação)

Resumo

Representantes do gênero *Astyanax* são bem distribuídos em águas doces Neotropicais, sendo considerados confusos taxonomicamente, assim como outros gêneros também pertencentes ao grupo *incertae sedis* dentro de Characidae. A citogenética é bem estudada no gênero, mostrando ampla variação de número diploide desde $2n=36$ cromossomos em *Astyanax schubarti* até $2n=50$ cromossomos para a maioria das espécies do grupo. É notável também a ampla variabilidade de tamanho, número e posição de diferentes marcadores citológicos entre as espécies e entre as diferentes populações de uma mesma espécie descritas na literatura. O presente trabalho teve como objetivo analisar o cariótipo de diferentes espécies do gênero, provenientes de populações ainda não analisadas citogeneticamente, utilizando diversos marcadores citogenéticos, na tentativa de se obter dados importantes para estabelecer relações cariotípicas e evolutivas entre as espécies, ampliando o conhecimento sobre a citogenética deste grupo de peixes. Foram analisadas citogeneticamente exemplares de *Astyanax mexicanus* ($2n=50$; 8m, 26sm, 6st, 10a e NF=90) e *Astyanax eigenmanniorum* ($2n=50$; 8m, 22sm, 12st, 8a e NF=92) provenientes de loja de aquário, *Astyanax abramis* ($2n=50$; 12m, 28sm, 6st, 4a e NF=96) do córrego Bento Gomes (MT), três populações de *Astyanax fasciatus* (Duas com $2n=50$ e uma com $2n=48$ e diferentes fórmulas cariotípicas) com procedência de afluentes da bacia do rio Corumbataí (SP) e duas populações de *Astyanax altiparanae* ($2n=50$) provenientes do ICMBIO-CEPTA-Pirassununga (SP) com 10m, 32sm, 6st, 2a (NF=98) e córrego Guaçu (MS) com 10m, 24sm, 6st, 10a (NF=90). No presente estudo são relatados diferentes marcadores citogenéticos para as espécies analisadas e discutidas as relações cariotípicas entre elas.

Palavras-chave: *Incertae sedis*, DNAr, FISH, banda-C, coloração CMA₃/DAPI.

INTRODUÇÃO

A ordem Characiformes envolve um grupo dominante de peixes de água continental da América do Sul, compreendendo hábitos alimentares herbívoros, iliófagos e carnívoros (BRITSKI et al., 1972). Dentro da ordem Characiformes a família Characidae é a maior e mais complexa, sendo relatados aproximadamente 184 gêneros e 950 espécies (REIS et al., 2003). Contudo, a taxonomia da família ainda se apresenta confusa devido à dificuldade de estabelecer com clareza suas relações de origem.

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 é um dos maiores em número de espécies entre os peixes Neotropicais. Sua ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitats em rios e riachos, faz com que este seja um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Numa última revisão, muitos gêneros foram alocados em *incertae sedis* dentro de Characidae, como é o caso de *Astyanax*, com cerca de 90 espécies, que era anteriormente integrante da subfamília Tetragonopterinae, e tornou-se um dos gêneros mais especiosos de *incertae sedis* (REIS et al., 2003; LIMA et al., 2003).

Estudos citogenéticos no gênero *Astyanax* mostram ampla variação de número diploide desde $2n=36$ em *Astyanax schubarti* (MORELLI et al., 1983) até $2n=50$ cromossomos para a maioria das espécies analisadas (JIN; TOLEDO, 1975; entre outros). Além da variabilidade numérica encontrada entre as espécies do gênero, algumas espécies são consideradas como complexos de espécies, tais como o “complexo *scabripinnis*” denominado por Moreira-Filho e Bertollo (1991) no qual o número diploide varia em $2n=46$, 48 e 50 cromossomos e o “complexo *fasciatus*” com variação de $2n=45$ a $2n=50$ cromossomos (CENTOFANTE et al., 2003).

Diversas fórmulas cariotípicas são descritas para diferentes populações de bacias hidrográficas distintas. Fernandes e Martins-Santos (2004) estudaram duas populações de *Astyanax altiparanae* pertencentes a córregos da bacia do rio Paraná (Estado do Paraná, Brasil) e verificaram fórmulas cariotípicas distintas de $6m$, $30sm$, $4st$, $10a$ e $6m$, $26sm$, $6st$, $12a$. Uma população da mesma espécie do rio São Francisco (Estado de Minas Gerais,

Brasil) apresentou também fórmula cariotípica muito diferente com 8m, 20sm, 12st, 10a (PERES et al., 2008). As espécies do gênero também são caracterizadas pela presença do primeiro par metacêntrico maior do que os demais cromossomos do complemento, sendo uma característica marcante que pode ser compartilhada por muitas espécies de Characidae (SCHEEL, 1973). A partir disso, a constatação foi corroborada por diferentes autores como Salvador e Moreira-Filho (1992), Maistro et al. (1992), Margarido e Galetti Jr. (1996), Vicente et al. (1996), entre outros.

A distribuição da macroestrutura da heterocromatina é bem estudada no gênero *Astyanax*. Por exemplo, Fernandes e Martins-Santos (2003) analisaram duas populações de *Astyanax scabripinnis* da bacia do rio Ivaí (Estado do Paraná, Brasil) e observaram um padrão similar de distribuição da heterocromatina constitutiva entre as duas populações analisadas, porém foi notada uma variação inter e intra-individual de blocos heterocromáticos. Segundo os autores blocos grandes e fortemente corados foram observados nas regiões teloméricas, subtelocêntricas e em cromossomos acrocêntricos. Mantovani et al. (2000) também relataram uma similar variação inter-individual de tamanho de blocos heterocromáticos em populações de *A. scabripinnis* provenientes dos córregos Centenário e Marrecas (Bacia do rio Paranapanema). Outras populações também apresentaram variação inter e intra-individual de blocos de heterocromatina assim como diferentes números de cromossomos Ag-RONs.

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) são bem estudadas no gênero, apresentando uma grande variação de número e posições dessas regiões. Segundo Medrado et al. (2008) três populações de *Astyanax fasciatus* pertencentes a rios de bacias nordestinas, apresentaram três padrões de marcações Ag-RONs. Os autores descrevem que a população do rio Contas apresentou um par subtelocêntrico marcado na posição terminal do braço longo, um submetacêntrico e outro metacêntrico marcado na posição terminal do braço curto. No entanto, outras duas populações de outros rios, rio Preto da Costa e córrego Mineiro, apresentaram um par subtelocêntrico marcado pelo nitrato de prata, sendo que o mesmo parece ser o par Ag-RON principal. Vicari et al. (2008) relataram

variações em número inter e intra-individual de cromossomos Ag-RONs marcados nas posições teloméricas para *Astyanax paranae* e *A. scabripinnis*.

Outra característica que torna o gênero *Astyanax* interessante para estudos citogenéticos é a presença de microcromossomos B (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997; HASHIMOTO et al., 2008) e macrocromossomos B (MOREIRA-FILHO et al., 2001; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2005). Esse tipo de cromossomo, também chamado de supranumerário, inclui uma variedade de cromossomos extras que mostram heterogeneidade em sua natureza, comportamento e dinâmica evolutiva, que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações em algumas espécies e que provavelmente se originaram dos cromossomos A, mas seguem sua própria evolução.

Diante da ampla diversidade cariotípica encontrada para o gênero *Astyanax*, o presente trabalho teve como objetivo analisar os cromossomos de diferentes espécies do grupo, provenientes de populações ainda não analisadas citogeneticamente, utilizando diversos marcadores citogenéticos, na tentativa de se obter dados importantes para estabelecer relações cariotípicas e evolutivas entre as espécies, ampliando o conhecimento sobre a citogenética deste grupo de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Exemplares de *Astyanax mexicanus* (Três exemplares) e *Astyanax eigenmanniorum* (Três exemplares) foram adquiridos em loja de Aquarismo, exemplares de *Astyanax abramis* (Quatro exemplares) foram coletados no córrego Bento Gomes no Estado de Mato Grosso (MT), *Astyanax fasciatus* (Dois exemplares de cada localidade) nos afluentes dos rios Cabeça, Ribeirão Claro e Corumbataí pertencente à bacia do rio Corumbataí do Estado de São Paulo (SP), *Astyanax altiparanae* (Um exemplar) no córrego Guaçu pertencente à bacia do rio Iguatemi do Estado de Mato Grosso do Sul (MS) e oito exemplares coletados no ICMBio-CEPTA (Centro Especializado do Instituto Chico Mendes da Conservação de

Biodiversidade) do município de Pirassununga (SP). As espécies foram identificadas por pesquisadores do Departamento de Morfologia da UNESP-Botucatu.

Técnicas Citogenéticas

As preparações mitóticas foram obtidas de células extraídas das porções anterior e posterior do rim, de acordo com a metodologia de Foresti et al. (1981). As RONS ativas foram analisadas após a técnica de impregnação pelo íon prata descrita por Howell e Black (1980) e a heterocromatina foi observada após o tratamento da técnica de Banda-C proposta por Sumner (1972). A detecção de regiões ricas em bases AT e GC foi realizada de acordo com a técnica de desnaturação dos cromossomos em formamida a 70 °C utilizada no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro. De acordo com a classificação frequentemente utilizada para cromossomos de peixes, a morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão de braços. Os cromossomos com dois braços foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) e os cromossomos considerados com um braço como acrocêntricos (a).

Obtenção de sondas e Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR utilizando os *primers* (NS1=5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8=5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') descritos por White et al. (1990); e a sonda de DNAr 5S obtida por PCR com os *primers* (A=5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B=5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') descritos por Pendás et al. (1994) e Martins e Galetti (1999). A técnica de hibridação *in situ* utilizando as sondas de DNAr 18S e 5S marcadas por PCR com digoxigenina (Roche) e biotina (Roche) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) com modificações feitas no Laboratório de Citogenética da UNESP-Rio Claro. Lâminas com cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/mL) por 1h a 37 °C e desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%). O DNA cromossômico foi desnaturado por 4 minutos em formamida

70%/2x SSC a 70 °C e desidratado logo em seguida em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%). A solução de hibridação (20 µL de formamida 50% em 2x SSC e 10% sulfato de dextran + 6 µg/mL de sonda de DNAr) foi incubada por 10 minutos a 95 °C e aplicada em cada lâmina. Após a hibridação a 37 °C *overnight*, as lâminas foram lavadas em formamida 50%/2xSSC (pH 7,0) duas vezes por 5 minutos a 45 °C, 1xSSC duas vezes por 5 minutos a 45 °C e 4xT (1 20xSSC: 4 H₂O + 250 µL de triton100x) uma vez por 5 minutos. Os sinais foram detectados com rodamina-antidigoxigenina (Roche) para digoxigenina e avidina-FITC (Sigma) para biotina. Os cromossomos foram contra-corados com Vectashield *Mounting Medium* com DAPI e analisados com microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital modelo D71. As imagens foram capturadas usando o *software* DP-Controller.

RESULTADOS

Exemplares de *Astyanax mexicanus*

O número diploide encontrado foi $2n=50$ cromossomos ordenados em 8m, 26sm, 6st, 10a e um NF=90, sendo observada ainda a presença de um microcromossomo B do tipo acrocêntrico em todas as células de três exemplares analisados (Figura 1a). As RONS são do tipo simples, ocorrendo na porção terminal do braço curto do par metacêntrico dois (Figura 1a). A heterocromatina foi evidenciada após o bandamento C nas porções subterminais e intersticiais do primeiro par metacêntrico, centromérica e pericentromérica de alguns cromossomos (Figura 2a). O braço curto do segundo par metacêntrico, onde se localiza a RON, apresentou-se inteiramente banda-C positivo (Figura 2a). Os fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI mostraram cromossomos com sinais CMA₃ positivos e DAPI negativos nos locais correspondentes aos cístrons de DNAr 18S, além de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos CMA₃-positivos e DAPI-negativos (Figura 6a,d). A técnica de FISH com sondas do gene DNAr 18S são coincidentes com as Ag-RON

positivas, evidenciando apenas um par portador dos cístrons ribossomais (Figura 7a), já o DNAr 5S foi evidenciado em quatro cromossomos acrocêntricos (Figura 7d).

Exemplares de *Astyanax eigenmanniorum*

O número diploide encontrado foi de $2n=50$ cromossomos distribuídos em 8m, 22sm, 12st e 8a cromossomos e NF igual a 92 (Figura 1b). Quanto às RONS, impregnaram pelo nitrato de prata a região terminal do braço curto de um par acrocêntrico e a posição terminal do braço longo de um dos homólogos de um par submetacêntrico (Figura 1b). A heterocromatina foi evidenciada nas porções terminais, centroméricas e pericentroméricas de alguns pares cromossômicos (Figura 2b). O tratamento com fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI demonstraram marcações CMA₃ positivas e DAPI negativos nos locais correspondentes às marcações Ag-RON positivas (Figura 6b,e). A técnica de FISH com sondas de DNAr 18S mostrou marcações na posição terminal do braço curto do par 1 metacêntrico, na posição terminal do braço longo do par 5 submetacêntrico, nas posições terminais de dois pares submetacêntricos e um par acrocêntrico (Figura 7b). A técnica de FISH com sondas de DNAr 5S mostrou sítios no segundo par metacêntrico na região pericentromérica e no primeiro par acrocêntrico (Par 22) na região subterminal do braço curto (Figura 7e).

Exemplares de *Astyanax abramis*

Os exemplares de *A. abramis* analisados apresentaram $2n=50$ cromossomos e um cariótipo composto por 12m, 28sm, 6st, 4a cromossomos e um NF igual a 96, sendo evidente no par 21 uma região de constrição secundária (Figura 1c). Regiões heterocromáticas foram evidenciadas principalmente na posição pericentromérica, tendo alguns cromossomos com blocos terminais (Figura 2c). Também foi observado um grande bloco de heterocromatina na região correspondente à constrição secundária no par 21 (Figura 2c). Tanto as marcações Ag-RON positivas, os sítios de DNAr 18S e as regiões ricas

em bases GC foram observadas no par 21, onde se localiza a região de constrição secundária (Figura 6c,f; Figura 7c).

Exemplares de *Astyanax fasciatus*

Os exemplares dos afluentes dos rios Cabeça e Corumbataí apresentaram número diploide de $2n=50$ cromossomos e a população do Ribeirão Claro $2n=48$ cromossomos. A fórmula cariotípica para os exemplares do afluente rio Cabeça é composta por 16m, 12sm, 6st, 16a cromossomos e $NF=84$ (Figura 3a), os exemplares do Ribeirão Claro apresentaram um cariótipo com 10m, 20sm, 8st, 10a cromossomos e $NF=86$ (Figura 3b) e os exemplares do afluente do rio Corumbataí mostraram uma fórmula cariotípica composta por 8m, 26sm, 6st, 10a cromossomos e $NF=90$ (Figura 3c). Os exemplares do afluente do rio Cabeça e Ribeirão Claro mostraram uma constrição secundária no braço curto de apenas um dos homólogos do par 24, sendo que nenhuma região de constrição foi observada nos exemplares do rio Corumbataí. Com relação à heterocromatina foram observados dois padrões C-positivos, blocos heterocromáticos conspícuos nos cromossomos na população do Ribeirão Claro ($2n=48$) (Figura 5b) e blocos mais discretos nos cromossomos das populações dos afluentes dos rios Cabeça e Corumbataí ($2n=50$) (Figura 5a,c).

Exemplares de *Astyanax altiparanae*

O exemplar do córrego Guaçu do Mato Grosso do Sul apresentou número diploide de $2n=50$ cromossomos e um cariótipo composto por 10m, 24sm, 6st, 10a cromossomos com NF igual a 90 (Figura 4a). Os exemplares coletados no ICMBio-CEPTA-SP também apresentaram número diploide de $2n=50$ cromossomos, porém, fórmula cariotípica muito diferente composta por 10m, 32sm, 6st, 2a cromossomos e NF igual a 98 (Figura 4b).

DISCUSSÃO

Todas as espécies apresentaram $2n=50$ cromossomos, exceto a população de *A. fasciatus* do Ribeirão Claro, que apresentou $2n=48$ cromossomos (Tabela 1). Essas espécies apresentaram similaridade cromossômica com relação ao primeiro par metacêntrico maior em comparação aos outros cromossomos. Também é notável a presença de um par submetacêntrico como o segundo maior par do complemento cariotípico das espécies com exceção das populações de *A. fasciatus*, caracterizados como par 5 nos cariótipos de *A. mexicanus* e *A. eigenmanniorum*, o par 6 nas duas populações de *A. altiparanae* e o par 7 em *A. abramis*. Outra característica visível é a grande quantidade de cromossomos submetacêntricos em todas as espécies analisadas, exceto para a população de *A. fasciatus* do afluente do rio Cabeça.

Os números diploides encontrados para as espécies analisadas nesse trabalho estão de acordo com dados da literatura, previamente descritos (FAUAZ et al., 1994; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; TORRES-MARIANO; MORELLI, 2006; (KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007, entre outros). Variações no cariótipo são comuns no gênero *Astyanax*, provavelmente devido à ampla distribuição geográfica, como observado no presente trabalho para as populações de *A. fasciatus* e *A. altiparanae*, principalmente com relação ao número de cromossomos acrocêntricos. Rearranjos não-Robertsonianos como inversões, duplicações, deleções, transposições ou translocações podem também ser sugeridos para explicar as diferenças na estrutura cariotípica do gênero.

A heterocromatina foi evidenciada principalmente nas posições pericentroméricas de *A. mexicanus*, *A. eigenmanniorum* e *A. abramis* analisadas no presente estudo (Tabela 2). Quando os três cariótipos de banda-C são analisados pode-se notar algumas similaridades em algumas marcações específicas entre pares homeólogos, tal como o maior par submetacêntrico número 5 em *A. mexicanus* e *A. eigenmanniorum* e o par 7 em *A. abramis*, sugerindo que a heterocromatina localizada na posição terminal do braço longo pode ser um marcador conservado entre as três espécies.

As marcações banda-C positivas em *A. mexicanus* e *A. abramis* demonstraram inteiramente heterocromático o braço do cromossomo onde se localiza a região Ag-RON positiva, além de regiões ricas em bases GC detectadas pelo tratamento com CMA₃. Assim, como as RONS são sítios de produção de grande parte dos RNAr, e estas moléculas têm grande importância para a formação das subunidades ribossômicas, parece que a heterocromatina que flanqueia as RONS, provavelmente protege estas regiões de eventos que possam comprometer suas funções, tais como inserções e/ou deleções.

Além disso, os dois padrões de heterocromatina encontrados para as três populações de *A. fasciatus* analisadas pelo bandamento C podem sugerir que rearranjos cromossômicos, tais como translocações e ações de elementos transponíveis, podem ter dispersado estas sequências durante o processo de diversificações das três populações ou acumulado em posições bem distintas na população do Ribeirão Claro (2n=48). De acordo com Peres et al. (2009) três populações pertencentes a bacia do rio São Francisco (MG) apresentaram número diploide de 2n=48 cromossomos, duas das quais demonstraram blocos heterocromáticos notáveis no cariótipo. Os autores sugerem que tal característica pode ser decorrente do endemismo da população que apresenta blocos de heterocromatina mais discretos, diferente do encontrado para o presente trabalho, onde as três populações analisadas fazem parte da bacia do rio Corumbataí e podem manter contato entre elas.

Com relação às RONS, estas podem ser do tipo simples ou múltiplo para as espécies do gênero *Astyanax* analisadas no presente trabalho. Muitos trabalhos relataram diversos números de cromossomos Ag-RON positivos para o grupo. Ferreiro-Neto et al. (2009) analisaram três populações de *A. altiparanae* de três localidades, detectando um par Ag-RON para a população do córrego Pântano, três cromossomos Ag-RON positivos para o córrego Feijão e quatro cromossomos para o rio Jordão. Essa variação de número de marcações Ag-RON positivas também foi detectado no trabalho de Medrado et al. (2008) para três populações de *A. fasciatus*. Diferenças entre o número de marcações Ag-RON positivas entre as espécies do gênero *Astyanax* analisadas até o presente momento revelam

que as mesmas não são bons marcadores para caracterização do grupo, uma vez que não foi encontrado um padrão de marcações semelhantes para as espécies do gênero.

A técnica de FISH tem demonstrado ser uma ferramenta útil para a caracterização citogenética de alguns grupos (PERES et al., 2008). Portanto, para o gênero *Astyanax*, quanto à localização dos sítios de DNAr 45S, é possível observar que é muito variável entre as populações de uma determinada espécie ou entre as espécies do gênero como observado neste estudo. Mantovani et al. (2005) observaram para quatro populações de *A. scabripinnis*, duas delas pertencentes à bacia do rio Paranapanema (PR), as quais apresentaram uma variação de quatro a 16 sítios de DNAr 18S e duas do rio São Francisco (MG) apresentaram dois a 11 sítios de DNAr 18S.

Diferentemente, a localização de DNAr 5S pode ser conservada em algumas espécies do gênero *Astyanax*, podendo apresentar notáveis padrões. Um padrão que pode ser compartilhado entre *A. scabripinnis*, *A. paranae*, *A. bockmanni* e também, no presente estudo, para *A. eigenmanniorum* é a presença de um par metacêntrico com sítios de DNAr 5S na posição pericentromérica e um par acrocêntrico com sítios desse DNAr na porção subterminal do braço curto (MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008; KAVALCO et al., 2009). Foi possível notar ainda que em *A. altiparanae* há outro padrão de localização cromossômica das sequências de DNAr 5S, compartilhado entre diferentes populações, as quais apresentaram sítios em um par submetacêntrico (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006; DOMINGUES et al., 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009).

Segundo Schweizer e Loidl (1987), regiões teloméricas são propícias à transferência de material genético devido à proximidade delas no núcleo interfásico, promovida pelo ordenamento dos cromossomos de acordo com o modelo de Rabl. Consequentemente, como a maioria das marcações da família multigênica do DNAr 45S está localizada na posição terminal dos cromossomos de muitas espécies do gênero *Astyanax*, eventos de transferência dessas sequências poderiam ser facilitados. Isto poderia explicar a grande divergência intra e interespecífica desses *loci* no grupo e esclarecer o motivo pelo qual a

família do DNAr 5S teria padrões conservados em algumas espécies, pois é notável a presença de um ou dois pares marcadores 5S na região próxima ao centrômero.

Outra hipótese que pode ser sugerida para explicar a divergência de marcações de DNAr 18S entre as diferentes espécies analisadas e relatadas na literatura é a ação de elementos transponíveis. Do ponto de vista evolutivo, os dados são intrigantes e os diferentes pares portadores dos sítios de DNAr 45S em *Astyanax* podem ter surgido por ações de elementos transponíveis que se inseriram nestes *loci* e posteriormente levaram essas sequências para outros cromossomos durante a evolução destas espécies, culminando na reorganização dessas sequências em pares cromossômicos diferentes.

A presença de um cromossomo B do tipo acrocêntrico foi relatada para *A. mexicanus* em todas as células analisadas no presente estudo. Duas populações desta espécie de regiões dos EUA já haviam sido caracterizadas citogeneticamente ($2n=50$), porém sem o destaque de cromossomos B (KIRBY et al., 1977). Entretanto, indivíduos provenientes de loja de aquário brasileira, apresentaram número diploide de $2n=50$ cromossomos e a presença de um ou dois microcromossomos B do tipo acrocêntrico (KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007) e apenas um microcromossomo B acrocêntrico nos exemplares analisados neste trabalho. Com isso, é possível levantar duas possibilidades de origem deste tipo cromossômico para *A. mexicanus*: o cromossomo B pode estar presente nas populações naturais do México, de onde foram amostradas inicialmente e trazidas ao Brasil ou os cromossomos B podem estar presentes apenas nas populações mantidas em cativeiro, sugerindo que os resultados de sucessivos cruzamentos podem levar a uma alta endogamia destes peixes, associados às condições artificiais, principalmente relacionadas à temperatura da água, e isto possa influenciar na origem deste tipo cromossômico.

Características citogenéticas, tais como o primeiro par metacêntrico e submetacêntrico grande compartilhado pelas espécies do gênero estudadas citogeneticamente e os padrões de localização dos sítios de DNAr, reforçam cada vez mais que as espécies de *Astyanax* alocadas em *incertae sedis* dentro de Characidae, podem estar relacionadas filogeneticamente, porém como estas, dentre outras, apresentam

pequeno porte e ciclos de vida relativamente curtos, comparadas às espécies de maior porte de outras subfamílias de Characidae mais bem estruturadas, taxas de evolução mais rápidas são sugeridas para explicar tais diferenças dos marcadores citogenéticos analisados entre as espécies de *Astyanax*.

Tabela 1. Relação entre as espécies analisadas citogeneticamente, o número diploide, número fundamental (NF) e os respectivos locais de coleta.

Espécies	Número diploide	NF	Locais de coleta
<i>A. mexicanus</i>	2n=50+1	90	Aquarismo
<i>A. eigenmanniorum</i>	2n=50	92	Aquarismo
<i>A. abramis</i>	2n=50	96	Córrego Bento Gomes – MT
<i>A. fasciatus</i>	2n=50	84	Afluente do rio Cabeça – SP
<i>A. fasciatus</i>	2n=50	90	Afluente do rio Corumbataí – SP
<i>A. fasciatus</i>	2n=48	86	Ribeirão Claro – SP
<i>A. altiparanae</i>	2n=50	90	ICMBio-CEPTA – SP
<i>A. altiparanae</i>	2n=50	98	Córrego Guaçu – MS

Tabela 2. Resultados obtidos com as diferentes técnicas citogenéticas utilizadas nos cromossomos metafásicos das espécies do gênero *Astyanax* analisadas.

Espécies	Ag-RON	Banda-C	CMA ₃	FISH 18S	FISH 5S
<i>A. mexicanus</i>	2	C, I, P e T	P e T e o par Ag-RON	2	4
<i>A. eigenmanniorum</i>	3	C, P e T	Pares de RONS	10	4
<i>A. abramis</i>	2	C, P e T	Par Ag-RON	2	-

C=centromérica; P=pericentromérica; I=intersticial; T=terminal.

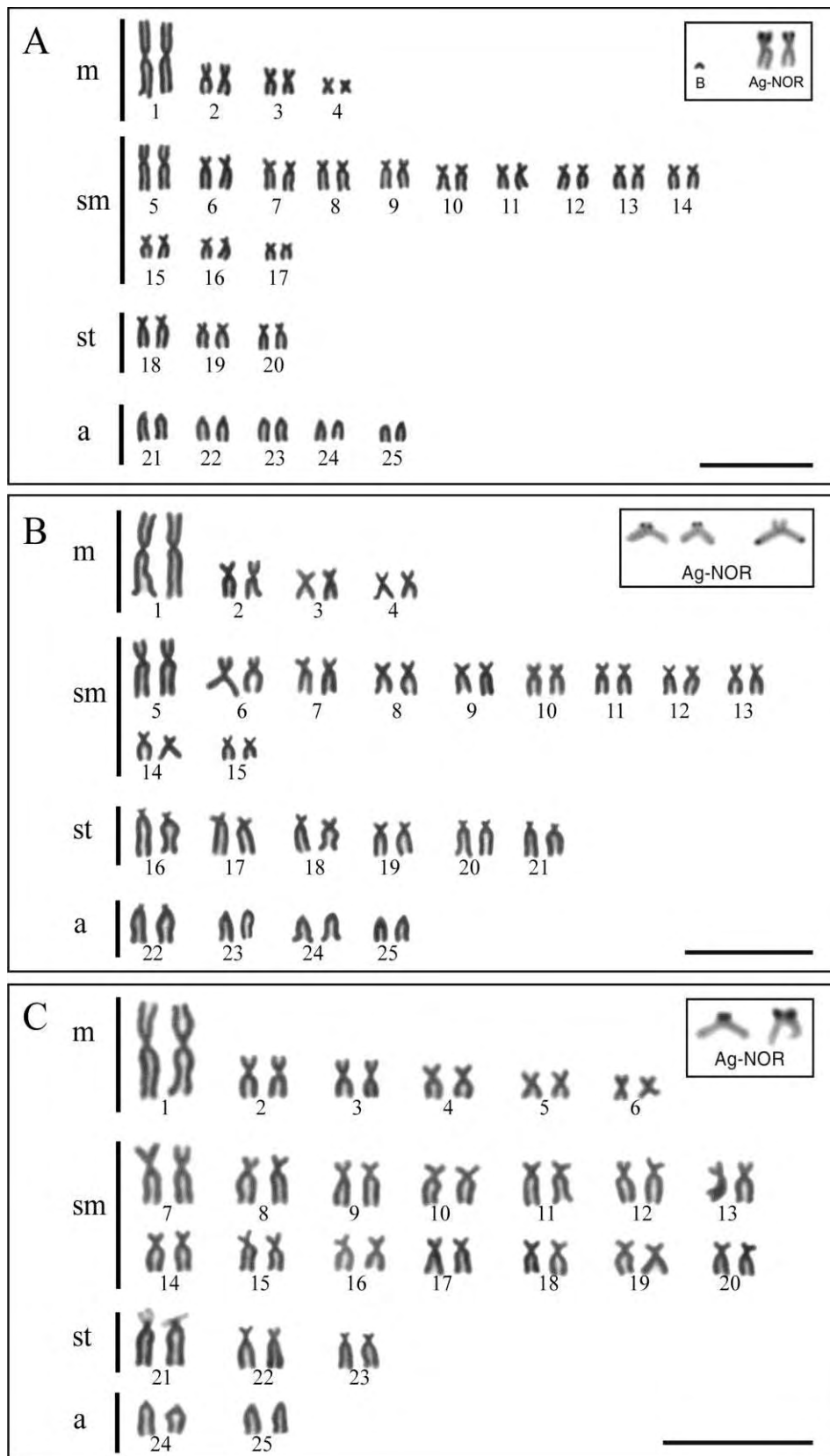


Figura 1. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. mexicanus*. Em evidência o microcromossomo B. **B.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum*. **C.** Cariótipo de *A. abramis*. Em evidência os pares Ag-RONs das respectivas espécies. Barra = 10 µm.

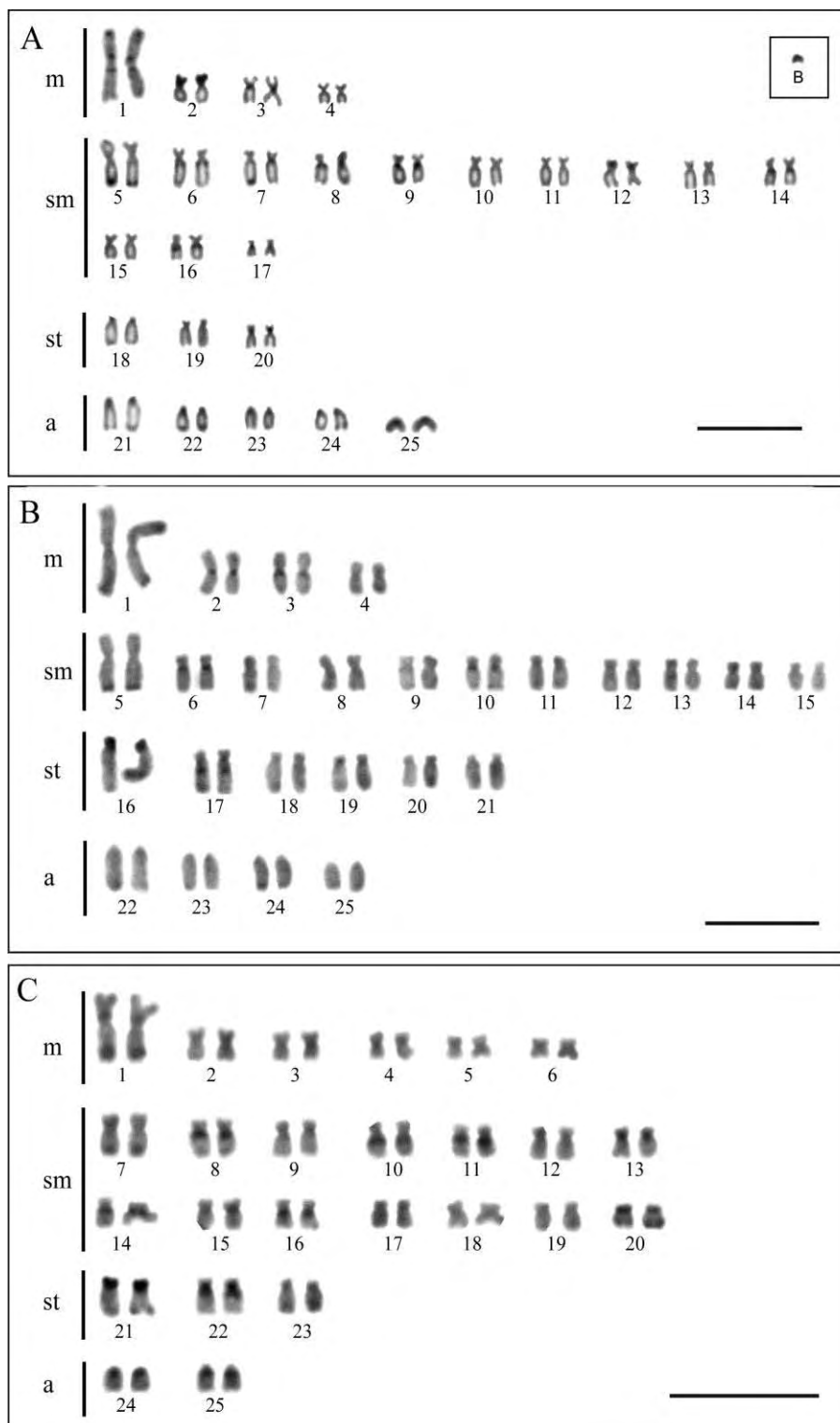


Figura 2. Bandamento C. **A.** Cariótipo de *A. mexicanus*. Em destaque o microcromossomo B. **B.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum*. **C.** Cariótipo de *A. abramis*. Barra = 10 μm.

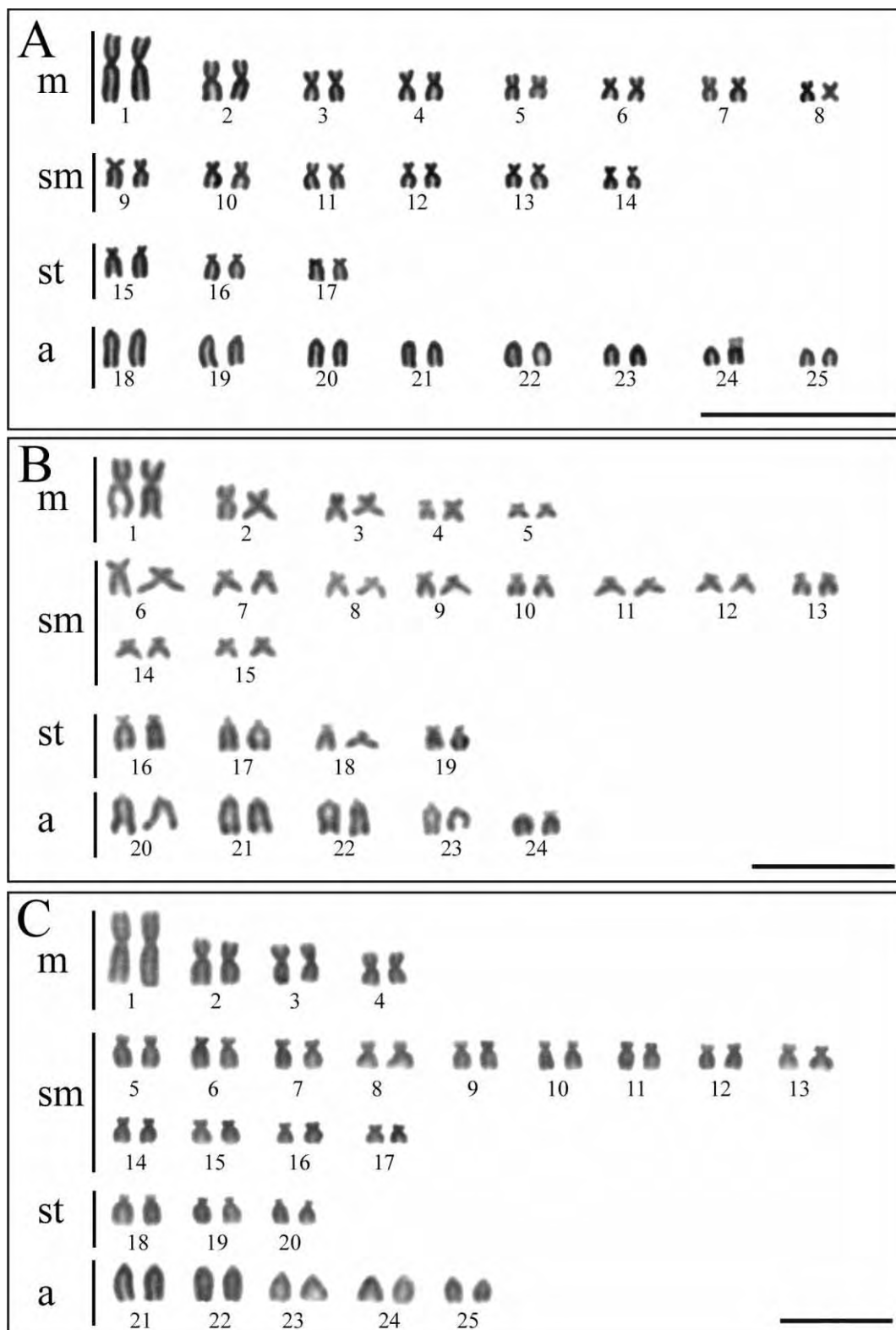


Figura 3. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. fasciatus* do afluentes do rio Cabeça. **B.** Cariótipo de *A. fasciatus* do Ribeirão Claro. **C.** Cariótipo de *A. fasciatus* do afluentes do rio Corumbataí. Barra = 10 µm.

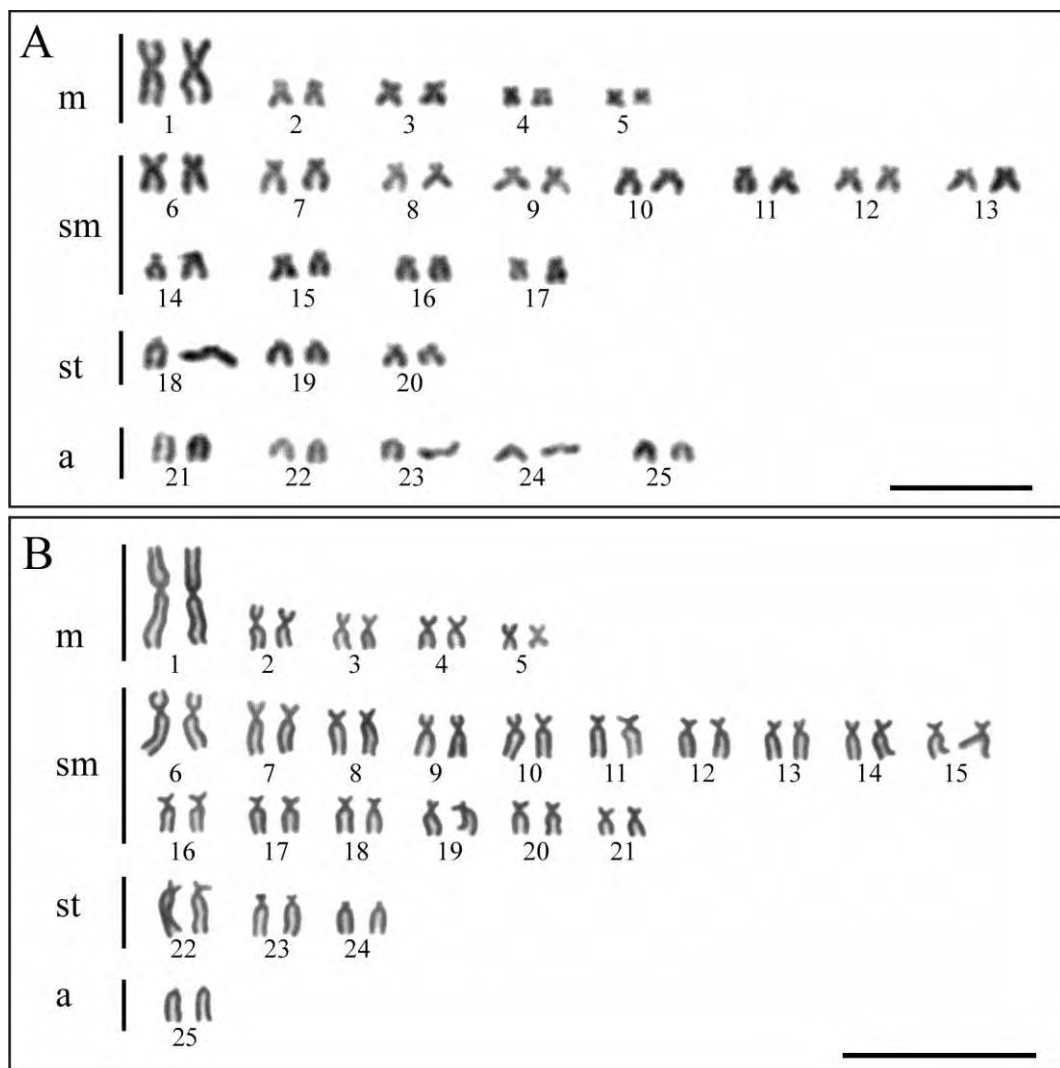


Figura 4. Coloração convencional com Giemsa. **A.** Cariótipo de *A. altiparanae* do córrego Guaçu. **B.** Cariótipo de *A. altiparanae* coletado no ICMBio-CEPTA, Pirassununga-SP. Barra = 10 µm.

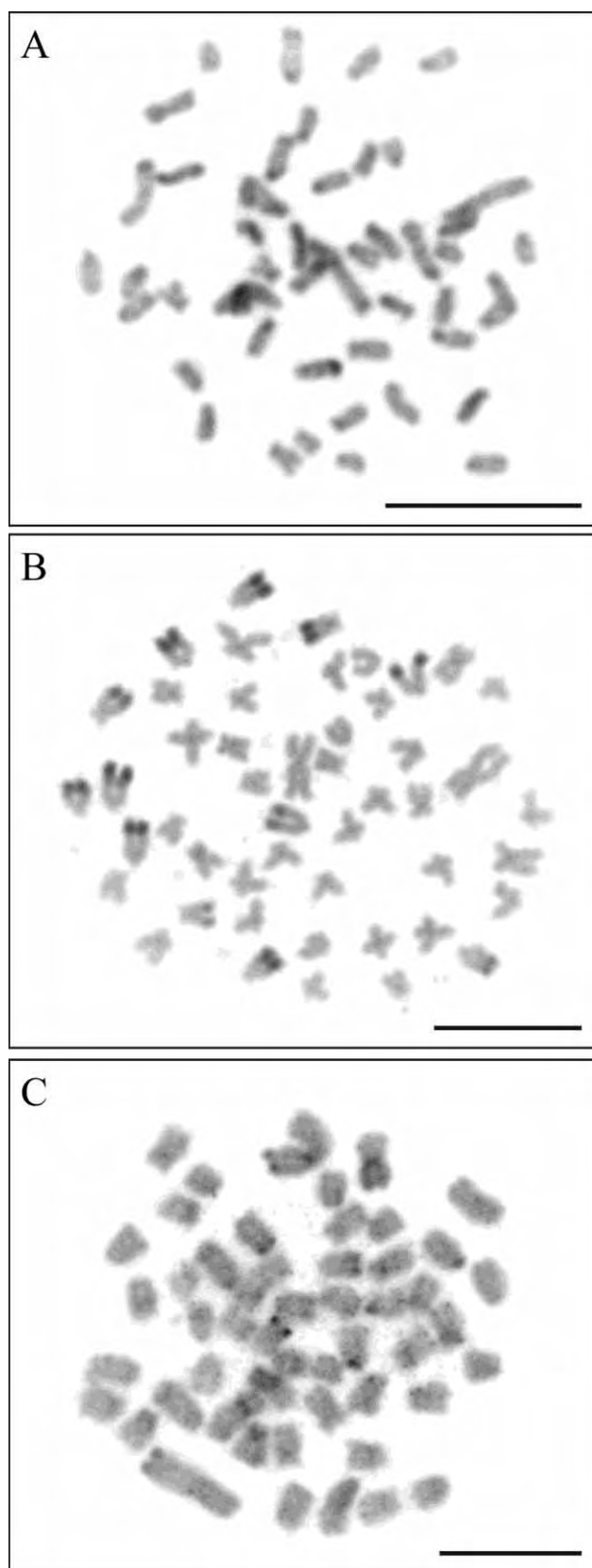


Figura 5. Bandamento C. **A.** Metáfase de *A. fasciatus* do afluente do rio Cabeça. **B.** Metáfase de *A. fasciatus* do Ribeirão Claro. **C.** Metáfase de *A. fasciatus* do afluente do rio Corumbataí. Barra = 10 µm.

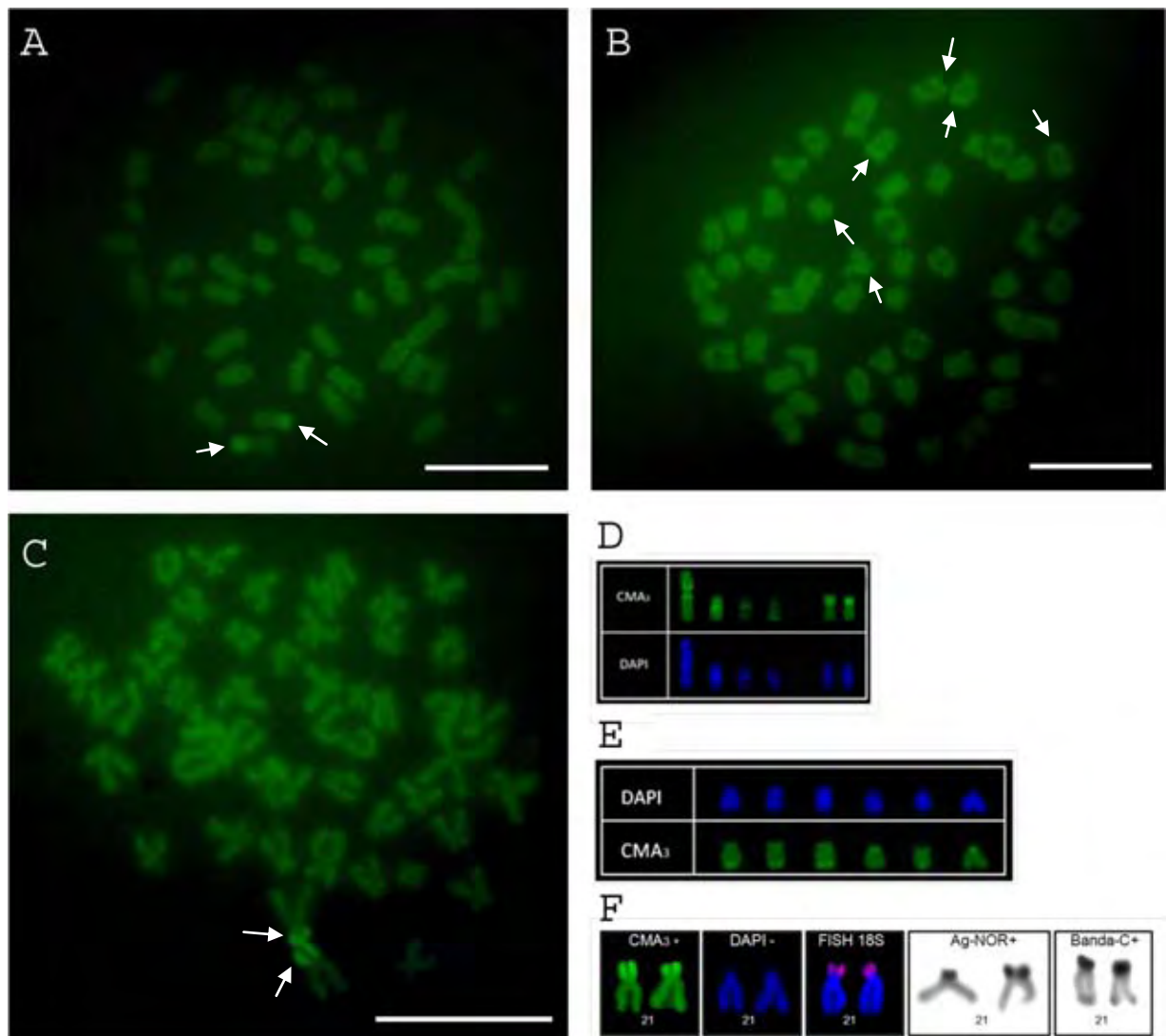


Figura 6. Coloração com cromomicina A₃. **A.** as setas indicam os braços curtos do par 2 CMA₃+ em *A. mexicanus*. **B.** As setas indicam as marcações CMA₃+ em *A. eigenmanniorum*. **C.** As setas indicam a região CMA₃+ do par 21 em *A. abramis*. **D.** DAPI-/CMA₃+ em cromossomos de *A. mexicanus*. **E.** DAPI-/CMA₃+ em cromossomos de *A. eigenmanniorum*. **F.** Em destaque todos os marcadores citológicos utilizados marcaram a região de constrição secundária do par 21 de *A. abramis*.

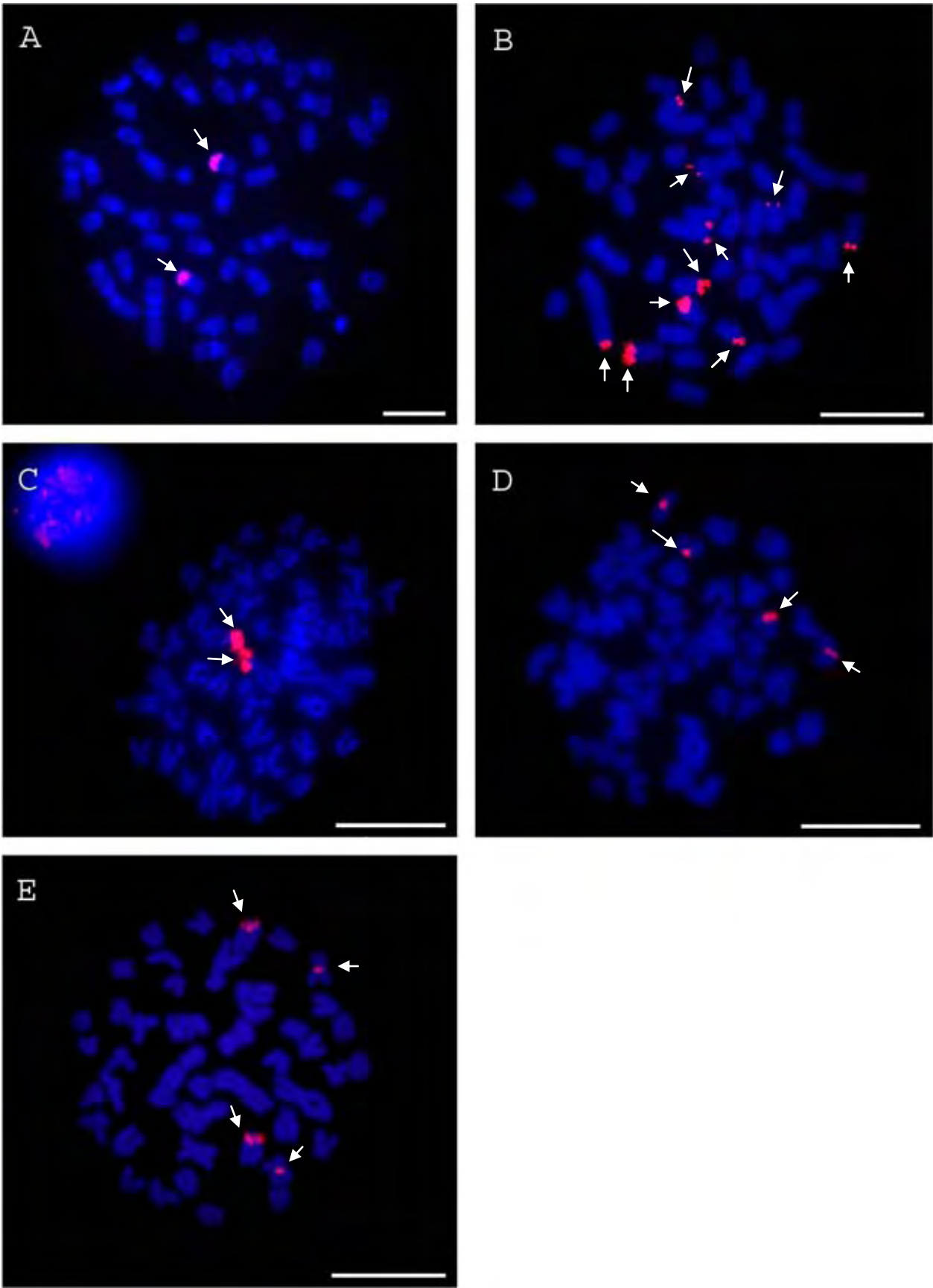


Figura 7. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) **A.** Sítios de DNAr 18S em *A. mexicanus*. **B.** Sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. **C.** Sítios de DNAr 18S em *A. abramis*. **D.** Sítios de DNAr 5S em *A. mexicanus*. **E.** Sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. As setas indicam as regiões marcadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITSKI, M. A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática**. In: Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguai. Poluição e Piscicultura, São Paulo: CIBPU, cap. 2, p. 84-86, 1972.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v. 14, p.361-368,2003.

DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WANSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. v. 5, p. 37-44, 2007.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural Tripoidy and B Chromosomes in the Neotropical Fish Genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal Genetics**. v. 17, p. 157-163, 1994.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. **Cytologia**. v. 68, p. 289-293. 2003.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**. v. 141, p. 328-332, 2004.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, p. 1-5, 2006.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**. v. 124, p. 301-306, 2005.

FERREIRA-NETO, M; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, p. 792-796, 2009.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.

HASHIMOTO, D. T.; GONÇALVES, V. R.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; F. PORTO-FORESTI. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 3, p. 275-278, 2008.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JIN, S. M. & TOLEDO V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência Cultural**. v. 27, p. 1122-1124, 1975.

KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**. v. 4, p. 103-111, 2007.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: An ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**. v. 136, p. 135-139, 2009.

KIRBY, R. F.; THOMPSON, K. W.; HUBBS, C. L. Karyotypic similarities between the mexican and blind tetras. **Copeia**. v. 3, p. 578-580, 1977.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS Jr., C. J., (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**. v. 87, p.101-106, 1992.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**. v. 109, p. 161-168, 2000.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. v. 123, p. 211-216, 2005.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI Jr., P. M. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**. v. 85, p. 219-228, 1996.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. v. 7, p. 363-367, 1999.

MEDRADO, A. S.; FIGUEIREDO, A. V. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 208-214, 2008.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**. v. 127, p.249-253, 1997.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**. v. 14, p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**. v. 66, p. 59-64, 2001.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, A. S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae): Karyotypic variability. **Caryologia**. v. 36, p. 235-244, 1983.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 67, p. 31-36, 1994.

PERES W.A.M., BUCKUP P.A., KANTEK D.L.Z., BERTOLLO L.A.C. and MOREIRA-FILHO O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**. v. 137, p. 305-311, 2009.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, p. 222-226, 2008.

PINKEL, D.; STRUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hibridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 83, p. 2934-2938, 1986.

REIS, R. E. Subfamily Tetragonopterinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS Jr., C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 212, 2003.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**. v. 69, p. 50-56, 1992.

SCHEEL, J. J. **Fish chromosomes and their evolution**. In: Internal Report of Danmartes Akvarvum. Charlotherlund, Denmark, p. 22. 1973.

SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and at rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma**. v. 77, p. 83-103, 1980.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosome Today**. v. 9, p. 61-74, 1987.

SUMMER, A. T. A simple techine for demonstrating centromeric heterochromation. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. Chromosome analysis in *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from Araguari River, Uberlândia, MG. **Brazilian Journal of Biology**. v. 66, p. 161-165, 2006.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic and Genome Reseaech**. v. 122, p. 67-72. 2008.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO; O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-rat distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 74, p. 70-75, 1996.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. p. 315-322, 1990.

Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho são interessantes e podem do ponto de vista citotaxonômico e evolutivo, auxiliar no entendimento dos processos de diversificação das espécies agrupadas em *incertae sedis* dentro de Characidae, assim como no conhecimento da dinâmica de diferentes marcadores citogenéticos. Portanto pode-se concluir que:

- Cada gênero estudado demonstrou número diploide em concordância com os relatados na literatura, apesar de que alguns dados citogenéticos serem inéditos para algumas espécies;
- As espécies apresentaram as mesmas características cromossômicas para ambos os sexos, com exceção de *H. eques* que mostrou um cromossomo a mais no cariótipo das fêmeas;
- Os marcadores citogenéticos permitiram estabelecer relações entre diferentes espécies, de um mesmo gênero, de acordo com a macroestrutura cromossômica;
- Os resultados citogenéticos aliados aos dados moleculares obtidos para as espécies de *Bryconamericus*, mostram uma relação mais confiável para as análises;
- Os dados citogenéticos obtidos para as espécies de *Bryconamericus*, *Piabina*, *Hyphessobrycon* e *Astyanax*, aliados a futuras análises cromossômicas e moleculares de outras espécies de *incertae sedis*, poderão ser utilizados para auxiliar no entendimento da relação filogenética do grupo que não é completamente resolvida;
- Relações filogenéticas serão mais conclusivas quando estudos mais completos abordarem aspectos biológicos de forma global, ou seja, considerando um rol de características biológicas pontuais (Citogenética, mutações, rearranjos), comportamentais (Dinâmica populacional, estudo do meio) e biogeográficas (Clima, barreiras geográficas).

Anexo I



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 23434-1	Data da Emissão: 30/03/2010 14:25
Dados do titular	
Nome: Diovani Piscor	CPF: 345.026.938-04
Título do Projeto: ESTUDOS CITOGENÉTICOS INTRA E INTERPOPULACIONAL DA ESPÉCIE Bryconamericus stramineus (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), PERTENCENTES A DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	CNPJ: 48.031.918/0018-72

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Os exemplares de Bryconamericus serão coletados nos referidos lugares e levados para análise.	03/2010	03/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Alexandre Fernandes	Colaborador nas coletas	025.043.319-24	57498030 SSP-PR	Brasileira
2	EDSON LOURENÇO DA SILVA	Colaborador nas coletas	850.689.421-20	001050956 SSP-MS	Brasileira
3	Allan Pierre Bonetti Pozzobon	Colaborador nas coletas	341.914.158-08	-	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PIRACICABA	SP	Rio Piracicaba	Fora de UC
2	MOGI GUACU	SP	Rio Mogi-Guaçu	Fora de UC
3	JAPORA	MS	Rio Iguatemi	Fora de UC
4	RIO CLARO	SP	Rios: Corumbataí, Cabeça, Passa Cinco e Ribeirão Claro	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Bryconamericus
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Bryconamericus (*Qtde: 25)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 26917717





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 23434-1	Data da Emissão: 30/03/2010 14:25
Dados do titular	
Nome: Diovani Piscor	CPF: 345.026.938-04
Título do Projeto: ESTUDOS CITOGENÉTICOS INTRA E INTERPOPULACIONAL DA ESPÉCIE <i>Bryconamericus stramineus</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), PERTENCENTES A DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	CNPJ: 48.031.918/0018-72

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Captura manual, Coleta manual, Peneira, Puçá, Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Tarrafa, Armadilha (covo, manzuá, potes para polvos, substrato específico, manilha e variações), Anzol e linha (op.manual):linha de mão,de corso,carretilha,molinete,corrico,vara e isca viva, Pesca elétrica

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	Laboratório de Genética de Peixes, UNESP-Rio Claro

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 26917717





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 23434-1		Data da Emissão: 30/03/2010 14:25	
Dados do titular			
Nome: Diovani Piscor		CPF: 345.026.938-04	
Título do Projeto: ESTUDOS CITOGENÉTICOS INTRA E INTERPOPULACIONAL DA ESPÉCIE <i>Bryconamericus stramineus</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), PERTENCENTES A DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS			
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA			CNPJ: 48.031.918/0018-72

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 26917717

