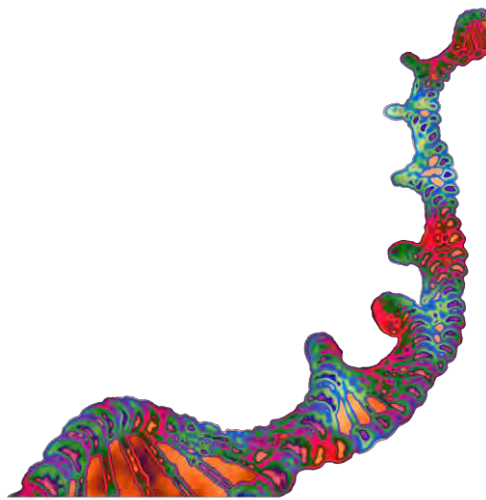


Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”

Mapeamento citogenético de sequências históricas  
e ribossomais revelam conservação e divergência  
cromossômica em populações de peixes da espécie  
*Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characidae)



Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

Instituto de Biociências de Botucatu

2011

Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

Mapeamento citogenético de sequências histônicas e ribossomais revelam conservação e divergência cromossômica em populações de peixes da espécie *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characidae)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Fausto Foresti

Botucatu  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Silva, Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade.

Mapeamento citogenético de sequências histônicas e ribossomais revelam conservação e divergência cromossômica em populações de peixes da espécie *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characidae) / Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Citogenética animal. 3. Mapeamento cromossômico.

Palavras-chave: *Astyanax bockmanni*; Citogenética de peixes; DNAr 5S; DNAr 18S; Histona H1; Marcadores cromossômicos; Regiões organizadoras de nucléolo.

*À minha mãe*

## Agradecimento

À Deus, por me conceder a dádiva da vida, em seu mais amplo sentido.

Ao professor Fausto Foresti, por toda a orientação, confiança e apoio recebidos ao longo desse tempo em seu laboratório.

Ao professor José Carlos Pansonato Alves, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos sobre a natureza humana.

Ao professor Cláudio de Oliveira, pela orientação e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial aos amigos do laboratório de citogenética que ao longo desses anos muito me ensinaram com paciência e dedicação.

Ao técnico Renato Devidé, pelos ensinamentos e trabalho empenhado neste projeto.

Aos funcionários do departamento de morfologia que, através do seu trabalho, permitiram que este estudo fosse realizado.

Ao Instituto de Biociências e à UNESP, pela minha formação como Biólogo.

À minha família, por tudo.

Aos meus amigos, por serem a família que eu escolhi.

Ao grupo Escoteiro, por me permitir desenvolver o amor ao próximo e à natureza.

Aos amigos da academia Check-Mat de Jiu-Jitsu, por permitirem que a cada treino eu encontrasse novamente a minha paz.

E a todas as outras pessoas com as quais eu tive o prazer de aprender durante a minha vida tudo o que me trouxe até aqui.

“O conhecimento da natureza fornece a melhor maneira de expandir o espírito e a mente juvenil; ao mesmo tempo conceder-lhes-á a faculdade de apreciar a beleza das coisas da natureza, e, conseqüentemente, também da arte. Isto certamente os ensinará a melhor apreciar a vida.”

**Lord Baden Powell of Giwell**

## Resumo

No presente trabalho foram realizados estudos citogenéticos moleculares em duas populações de peixes da espécie *Astyanax bockmanni*, provenientes de riachos localizados na região de Botucatu, SP, sendo uma do ribeirão Capivara, bacia do rio Tietê e outra do ribeirão Água da Madalena, bacia do rio Paranapanema. Os resultados obtidos evidenciaram que a população de *Astyanax bockmanni* do ribeirão Capivara apresenta número diploide de 50 cromossomos, sendo o cariótipo constituído por 8 cromossomos metacêntricos, 14 submetacêntricos, 12 subtelocêntricos e 16 acrocêntricos, enquanto os representantes da população do ribeirão Água da Madalena também apresentam número diploide de 50 cromossomos, mas com cariótipo organizado em 8 cromossomos metacêntricos, 14 submetacêntricos, 16 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos. Os resultados evidenciaram ainda que as sequências para o DNAr 18S estão amplamente dispersas pelo genoma das duas populações, apresentando variações intra e interindividuais. Por outro lado, as sequências para o DNAr 5S e as sequências para a Histona H1 mantiveram-se cromossomicamente conservadas nestas duas amostras, sendo localizados sítios nos pares 2 e 19 (DNAr 5S) e nos pares 2 e 15 (Histona H1). A baixa dispersão de genes estruturais e uma dinâmica funcional independente entre as sequências de DNAr 5S e 18S podem estar relacionados com o processo de manutenção e diferenciação cariotípica nestas populações de *Astyanax bockmanni*.

**Palavras-chave:** Marcadores cromossômicos, citogenética de peixes, DNAr 18S, DNAr 5S, Histona H1, regiões organizadoras de nucléolo, *Astyanax bockmanni*.

## **Abstract**

In the present work we performed molecular cytogenetic studies in two different populations of *Astyanax bockmanni* from streams of Botucatu, SP: one from Capivara river, on Tietê river basin and one from Água da Madalena river, on Paranapanema river basin. The results showed that the population of *Astyanax bockmanni* from Capivara river have a diploid number of 50 chromosomes, with karyotype consisting of 8 methacentric, 14 submetacentric, 12 subtelocentric and 16 acrocentric, while the individuals of the population from Água da Madalena river have 50 diploid chromosomes but with karyotype organized in 8 metacentric, 14 submetacentric, 16 subtelocentric and 12 acrocentric. Also, the rDNA 18s sequences are widely dispersed throughout the genome of two populations, with intra and interindividual variations. On the other hand, the sequences for rDNA 5S and Histone H1 remained chromosomally conserved in these two samples and sites located in pairs 2 and 19 (rDNA 5S) and the pairs 2 and 15 (Histone H1). The low dispersion of structural genes and a functional dynamic independence between sequences of rDNA 5S and rDNA 18S may be related to the process of karyotype maintenance and differentiation in these populations of *Astyanax bockmanni*.

**Key-words:** Chromosome markers, fish cytogenetic, rDNA 18S, rDNA 5S, Histone H1, nucleolar organizers regions, *Astyanax bockmanni*.



# Sumário

1. Introdução .....	9
1.1 Aspectos gerais da citogenética de peixes.....	9
1.2 Estudos citogenéticos em Characiformes .....	9
1.3 Estudos citogenéticos em <i>Astyanax bockmanni</i> .....	10
1.4 Mapeamento genômico .....	11
1.5 Considerações sobre a técnica Ag-RON e Regiões ricas em GC .....	12
1.6 Hibridação <i>in situ</i> e sondas de DNAr 18S e 5S .....	13
2. Objetivos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1 Região estudada.....	16
3.2 Obtenção dos exemplares .....	16
3.3 Metodologia.....	17
3.4 Identificação de regiões de heterocromatina constitutiva (Bandas C).....	17
3.5 Identificação das regiões organizadoras de nucléolo (RON).....	17
3.6 Coloração pelo fluorocromo cromomicina A3 (GC específico) .....	18
3.7 Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	18
3.8 Processamento das imagens .....	20
3.9 Medidas Cromossômicas.....	20
3.10 Montagem dos Cariótipos .....	20
4. Resultados .....	21
5. Discussão .....	25
6. Conclusão .....	28
Referências .....	29

## 1. Introdução

### 1.1 Aspectos gerais da citogenética de peixes

A ordem Characiformes apresenta cerca de 1600 espécies de peixes distribuídas na África, América do Sul e América Central (Nelson, 2006). Informações citogenéticas estão disponíveis para aproximadamente 480 espécies desta ordem (Oliveira et al., 2007).

A família Characidae apresenta cerca de 950 espécies conhecidas, constituindo-se na maior família de peixes de água doce na região Neotropical. Apesar deste grande número de espécies, a taxonomia da família Characidae ainda se apresenta confusa devido à dificuldade de se estabelecer com clareza suas relações de origem (Oliveira et al., 2007).

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

### 1.2 Estudos citogenéticos em Characiformes

Dentre as ordens mais representativas da Região Neotropical estão os Characiformes, popularmente chamados de peixes de escamas, que apresentam ampla variabilidade cariotípica com número diplóide variando entre  $2n=28$  no gênero *Incertae sedis* a  $2n=102$  na família Curimatidae (Oliveira et al., 2007).

De acordo com Scheel (1973), a estrutura cariotípica dos componentes da família Characidae pode ser caracterizada por apresentar dois grandes cromossomos metacêntricos, que correspondem ao primeiro par do complemento A, sendo esta característica compartilhada por grande parte dos integrantes deste grupo. A partir deste trabalho, a constatação foi corroborada por diferentes autores, como Salvador e Moreira-Filho (1992), Maistro et al. (1992), Margarido e Galetti (1996) e Vicente et al., (1996), entre outros. Entretanto, as análises cariotípicas em Characídeos têm revelado uma grande variedade cromossômica inter e intraespecífica, bem como polimorfismos cromossômicos estruturais e numéricos, poliploidia, além de cromossomos supranumerários (Oliveira et al., 2007). Nesta família, alguns representantes podem ainda apresentar triploidia, como *A. scabripinnis* e *A. eigenmanniorum* (Fauaz et al., 1994).

Cromossomos supranumerários, chamados de cromossomos B, não homólogos ao complemento A, têm aparecido em estudos citogenéticos de diferentes espécies de peixes Neotropicais, tendo sido detectados pela primeira vez em *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983). Estes cromossomos ocorrem em frequências variáveis em diferentes espécies e populações de plantas e animais e podem ser instáveis durante a mitose e/ou a meiose (Jones, 1991). Foram descritos em representantes de muitas famílias, dentre elas a família Characidae (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997), a qual pertence o gênero *Astyanax*.

Neste gênero, cromossomos B foram descritos para muitas espécies, como *A. scabripinnis* (Salvador e Moreira-Filho, 1992), *A. scabripinnis paranae* (Maistro et al., 1999), *A. fasciatus*, *A. altiparanae*, *A. bockmanni* (Hashimoto et al., 2011). Os cromossomos B do gênero *Astyanax* possuem morfologias e tamanhos variados, sendo encontrados desde macro até microcromossomos, além de estarem presentes em número variável nas populações e indivíduos. Mestriner et al. (2000) mapeou, no cromossomo B de uma população de *A. scabripinnis*, um tipo de DNA satélite enriquecido com A+T (59%), com unidades monoméricas de 51 pb, nomeado As-51, a localização deste DNA em posições simétricas em ambos os braços do cromossomo supranumerário metacêntrico e seu auto-pareamento durante a meiose, permitiram inferir que o cromossomo B desta população é um isocromossomo.

### 1.3 Estudos citogenéticos em *Astyanax bockmanni*

*Astyanax bockmanni* é uma espécie de peixe amplamente distribuída em rios das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, tendo sido primeiramente classificada como *A. eigenmanniorum*, uma espécie originalmente descrita no extremo sul do Brasil. Foi diferenciada desta por possuir uma combinação de caracteres morfogenéticos e de pigmentação, além de detalhes da dentição oral diferente de *A. eigenmanniorum* e demais congêneres (Vari e Castro 2007).

A espécie apresenta uma confluência de características com outros grupos de *Astyanax*, como um número diplóide de  $2n=50$  cromossomos (Kavalco, 2009), que foi descrito para várias espécies como *A. eigenmanniorum* (Fauaz et al., 1994) e *A. giton* e *A. parahybae* (Kavalco e Moreira-Filho, 2003).

Kavalco (2009) descreve o cariótipo de *A. bockmanni* para duas populações da bacia do Paranapanema. Este estudo mostrou que *A. bockmanni* possui um cariótipo ambíguo,

uma vez que possui características comuns do gênero *Astyanax* e outras divergentes. Duas características comuns do gênero são a conservação dos sítios de DNAr 5S e a multiplicidade de Ag-RONs, sendo os sítios de DNAr 18S identificados por FISH. Por outro lado, uma característica divergente foi a não verificação de homologia nos cromossomos dessas populações com o DNA satélite AS-51, um marcador cromossômico isolado de um cromossomo B de *A. scabripinnis* que estaria distribuído nos cromossomos de espécies de *Astyanax*.

Hashimoto (2010) descreve o cariótipo de *A. bockmanni* para duas populações da bacia do Tietê e identifica um alto grau de polimorfismo de regiões heterocromáticas nos cromossomos dos indivíduos destas populações.

Em um estudo mais recente, Hashimoto (2011) aborda o uso de marcadores citogenéticos juntamente com a análise de sequências de DNA no gênero *Astyanax*. O autor mostra que em três espécies de *Astyanax* sítios de Histona H1 estão presentes na região pericentromérica de dois cromossomos. Adicionalmente, em *A. bockmanni* e *A. fasciatus* sítios de DNAr 5S foram evidenciados em um cromossomo portador da Histona H1 e em um cromossomo acrocêntrico, o que não foi observado em *A. altiparanae*. Estes dados e a análise das sequências destes genes permitiram inferir que *A. bockmanni* está mais intimamente relacionado com *A. fasciatus* do que com *A. altiparanae*. Desta forma, o autor mostra que marcadores citogenéticos são úteis para a elucidação de processos envolvidos na diferenciação cariotípica dos peixes.

#### **1.4 Mapeamento genômico**

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado a importância do conhecimento das seqüências de DNA e da localização dos genes como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, além da possibilidade da sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcadores citogenéticos entre diferentes espécies (Kasahara, 2009).

Marcadores citogenéticos e genéticos baseados no DNA têm sido desenvolvidos para emprego na aquicultura, com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. De modo semelhante, diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a construção de mapas genéticos, que podem oferecer benefícios particulares para a aquicultura, especialmente

para a identificação de estoques, análises de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações (Porto-Foresti et al., 2007)

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

### **1.5 Considerações sobre a técnica Ag-RON e Regiões ricas em GC**

A técnica de Ag-RON consiste na impregnação por nitrato de Prata (Ag NO<sub>3</sub>) em proteínas acídicas que se associam ao RNAr recém transcrito a partir do DNAr presente nas regiões organizadoras de nucléolos (NOR) dos cromossomos, ricas em bases GC. Em determinadas fases do ciclo celular essas regiões formam estruturas diferenciadas, os nucléolos, que contém DNAr, RNAr e proteínas. Por isso, se um certo organizador nucleolar não esteve em atividade no momento anterior ao da execução da técnica, não ocorrerá a marcação (Kasahara, 2009).

As regiões do DNA ricas em bases GC podem ser detectadas por fluorocromos base-específicos, como a Cromomicina A3 (CMA<sub>3</sub>), que mostra marcas cintilantes quando iluminada com luz UV na faixa de 450-490 nm (zona de excitação do azul). Quando associada a um contra-corante AT específico, como o DAPI, produz um padrão diferente do observado sem a associação (Kasahara, 2009).

As marcações por Ag-RON e pela CMA<sub>3</sub> podem ser coincidentes, pois as RON s são regiões ricas em bases GC. Porém, há relatos em que as RON s não foram marcadas pela CMA<sub>3</sub>, mostrando que, embora as NORs sejam regiões ricas em bases GC, o emprego da CMA<sub>3</sub> pode levar a resultados não conclusivos sobre a ocorrência das regiões organizadoras de nucléolos (Kasahara, 2009). Também existem estudos que mostraram que a CMA<sub>3</sub> pode identificar sítios que não são detectados pela Ag- RON, uma vez que a CMA<sub>3</sub> identifica sítios GC independentemente de sua atividade e a Ag- RON identifica sítios com genes ribossomais compostos por bases GC em atividade (Galetti E Rasch, 1993; Mestriner et al., 1995; entre outros).

### 1.6 Hibridação *in situ* e sondas de DNAr 18S e 5S

A citogenética molecular passou a utilizar técnicas de manipulação do material genético associadas à detecção de seqüências específicas de DNA. Entre os avanços metodológicos apresentados na área da pesquisa citogenética, destaca-se a utilização de sondas cromossomo-específicas associadas às técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Pela técnica de FISH, uma sonda de DNA marcada é hibridada sobre alvos citológicos (cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina entendidas, etc). Mais recentemente, novas metodologias de FISH têm possibilitado a utilização simultânea de diversas sondas marcadas com diferentes fluorocromos, sendo que algumas destas tem sido empregadas em vários grupos biológicos, como no caso apresentado por Pieczarca *et al*, (2005), que utilizou M-FISH (multiplex-FISH) em estudos evolutivos em famílias de Phyllostomidae (Chiroptera). Além desse caso, Speicher e Carter (2005) descrevem a utilização do SKY (Spectral Karyotyping) e COBRA (Combined Binary Ratio Labelling) na identificação mais refinada de modificações cromossômicas no genoma humano. Em todos estes casos, as diferentes sondas podem ser hibridadas simultaneamente no genoma do organismo em estudo, caracterizando com maior precisão eventos de alteração ou evolução do cariótipo. No caso dos peixes especificamente, essas técnicas apenas recentemente começaram a ser utilizadas.

A preparação de uma sonda para FISH, independentemente da sua natureza composicional, é um processo que envolve vários passos. As sondas de regiões cromossômicas específicas ou de cromossomos inteiros podem ser produzidas por extração de DNA ou microdissecção, seguida por reação de amplificação via PCR, independente da seqüência.

Nos seres vivos eucariontes os diferentes tipos de RNA ribossomal são codificados pelas famílias multigênicas de DNA 45S e 5S, que por sua vez apresentam unidades repetitivas organizadas em “tandem” de centenas de milhares de cópias (Long e Dawid, 1980). O DNAr 45S é formado pelos tipos de DNAr 18S, 5.8S e 28S, cujos sítios cromossômicos correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Desta forma o estudo com sondas de DNAr 18S contribuem para o entendimento da atividade dos genes ribossomais, pois a impregnação por nitrato de Prata que é utilizada para identificação das

RONs, só revela regiões organizadoras de nucléolos que estariam ativas na intérfase precedente (Goodpasture e Bloom, 1975; Howell e Black, 1980; Gromicho et al., 2004).

O DNAr 5S, que codifica o RNAr 5S, não está envolvido na formação das RONs (Long e Dawid, 1980). São regiões muito conservadas mesmo entre diferentes espécies, porém as variações nos espaçadores não transcritos (NTS) são em geral espécie-específicas (Pendás et al., 1995) e as sondas de DNAr ou RNAr 5S estão sendo utilizadas em estudos evolutivos (Nelson e Honda, 1985; Sajdak et al., 1998; Martins e Wasko, 2004).

## 2. Objetivos

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar citogeneticamente duas populações de *A. bockmanni* e realizar o mapeamento físico das regiões organizadoras de nucléolos e sítios de genes ribossomais 18S e 5S e Histona H1, buscando dados adicionais à determinação do cariótipo e organização dos mecanismos envolvidos no surgimento da espécie e seu papel nos processos de diversificação biológica neste grupo de espécies.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Região estudada

O Município de Botucatu é drenado ao norte pela bacia do rio Tietê e ao sul pela bacia do rio Pardo. A bacia hidrográfica do Rio Tietê, que tem como tributários o rio Alambari e rio Capivara, ocupa uma área de aproximadamente 77.300 ha. do município.

Os recursos hidrológicos dos rios da bacia do Tietê são amplamente utilizados pela população de Botucatu e região, que desenvolve nestes rios atividade pesqueira de importante papel na economia local. Os corpos d'água também são amplamente utilizados para o turismo ecológico, atividades náuticas e transporte.

A bacia hidrográfica do Rio Pardo ocupa uma área de aproximadamente 72.100 ha das terras de Botucatu, sendo o Rio Pardo um afluente do rio Paranapanema. Ele tem sua nascente no município de Pardinho a 1.003 metros de altitude, junto do "front" da Cuesta (Serra do Limoeiro). Percorre uma extensão de 67 km no município de Botucatu, distribuindo água e vida.

O Rio Pardo possui dois importantes represamentos artificiais, a Represa da Cascata Véu de Noiva, na qual foram coletadas as amostras para este estudo e a do Mandacaru, onde é realizado o sistema de abastecimento de água das cidades de Botucatu e Pardinho. O Rio Pardo e afluentes são intensamente utilizados para irrigação, pois os melhores solos agrícolas do município estão localizados em sua bacia hidrográfica (Almeida e Carneiro, 1998). Esta área apresenta problemas no que diz respeito à poluição das águas, degradação e assoreamento de rios. A falta de conservação adequada, inclusive com plantio de culturas muito próximo às margens, vem provocando impasses nos recursos naturais, além de poluição do meio ambiente por resíduos industriais e orgânicos (Ribeiro e Campos, 2007). Neste contexto, o estudo das espécies de peixes ainda presentes nestes ambientes constitui uma tarefa necessária e urgente, para que se possam tomar medidas adequadas de manejo da biodiversidade existente.

#### 3.2 Obtenção dos exemplares

Quarenta indivíduos de *A. bockmanni* (26 fêmeas e 14 machos) foram coletados no ribeirão Água da Madalena, bacia do rio Paranapanema, Botucatu, SP, Brazil (22°59'23"S

48°25'31"W) e quinze indivíduos (10 fêmeas e 5 machos) foram coletados em um tributário do rio Capivara, bacia do rio Tietê, Botucatu SP, Brazil (22°53'57"S 48°23'11"O).

Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

### **3.3 Metodologia**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim, por meio da técnica de obtenção de preparações cromossômicas descrita por Foresti et al. (1993), para estudo em peixes. A análise da heterocromatina constitutiva com a utilização da técnica de bandeamento C e das regiões organizadoras de nucléolo Ag-RONs, seguiram as metodologias descritas por Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente. A coloração cromossômica com fluorocromo Cromomicina A3 foi feita a partir da técnica de Schweizer (1980). Para a montagem dos cariótipos, os cromossomos foram classificados segundo Levan et al. (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a).

### **3.4 Identificação de regiões de heterocromatina constitutiva (Bandas C)**

Para a identificação de heterocromatina constitutiva (Bandas C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas adaptações: tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2 N à temperatura ambiente durante 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar. Colocar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário (Ba(OH)2·8H2O) 5%, recém-preparada e filtrada, a 42°C, durante 1 a 2,5 minutos. Para interromper a ação da solução de hidróxido de bário, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2 N, lavar em água corrente e deixar secar ao ar. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 45 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Corar com solução de Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 15 minutos.

### **3.5 Identificação das regiões organizadoras de nucléolo (RON)**

As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas através da técnica descrita por Howell e Black (1980) segundo o seguinte protocolo: pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota de solução

aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 ml para cada 100 ml de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira (pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor). Adicionar, sobre a gota anterior, 1 gota de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de Prata a 50% mantida em frasco escuro e em geladeira. Misturar bem e cobrir com uma lamínula. Incubar em estufa a 60o C, sobre um suporte, por um período de aproximadamente 3 minutos, dependendo de um monitoramento da coloração da lâmina e dos cromossomos ao microscópio. Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumirem uma tonalidade amarelada e as RONS e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6,8), durante 20 a 30 segundos, e lavar em água corrente.

### **3.6 Coloração pelo fluorocromo cromomicina A3 (GC específico)**

A técnica utilizada foi a descrita por Schweizer (1980), como segue:

- a) pingar 15µl da solução celular em uma lâmina limpa e secar ao ar;
- b) adicionar 50µl de solução de cromomicina A<sub>3</sub> (1 mg/ml), cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro;
- c) escorrer a lamínula e lavar em água de torneira;
- d) deixar secar ao ar e montar com uma nova lamínula utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso ou em meio de montagem;
- e) manter a lâmina no escuro e examinar sob microscopia de epifluorescência após cerca de 30 dias.

### **3.7 Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)**

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com adaptações implementadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Morfologia IB/UNESP. As sondas de DNA que foram utilizadas na hibridação *in situ* fluorescente (FISH), a partir de DNA ribossômico 5S e 18S estavam disponíveis no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, Câmpus de Botucatu-SP. A técnica consiste em marcar as sondas obtidas com biotina-11-dATP, através de "nick translation", utilizando o kit Bionick™ Labelling System (Gibco. BRL), seguindo as especificações do fabricante. Neste procedimento deve-se adicionar em um tubo de 1.5ml, misturar 5µl de dNTP Mix 10x, 1µg de DNA (sonda), 5µl de Mix de enzima 10x e água estéril para completar 45µl. Incubar a

solução a 16°C por 2 horas e, após este período, adicionar 5µl de tampão de parada, acetato de sódio 3M a 1/10 do volume e dois volumes de etanol absoluto gelado. Misturar o tubo por várias vezes e manter a -20°C por pelo menos 3 horas. Centrifugar o material a 13.000rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar 50µl de álcool 70% gelado. Centrifugar mais uma vez o material a 13.000rpm por 5 minutos e secar em estufa a 37°C. Ressuspender a sonda já marcada em 80µl de água estéril e adicionar solução de formamida 50%, sulfato de dextrano 10% e 2xSSC (NaCl 0.29M, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 0.029M, pH 7.0). Denaturar esta solução de hibridação em banho fervente por 10 minutos e transferi-la imediatamente para um recipiente com gelo.

Anteriormente à hibridação, pré-tratar as lâminas contendo preparações cromossômicas com solução de RNase (40µg/ml em 2xSSC) durante 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, lavar as lâminas por 10 minutos em solução de 2xSSC por duas vezes e desidratá-las em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 10 minutos cada série, à temperatura ambiente. Denaturar as lâminas em formamida 70%/2xSSC por 5 minutos a 70°C e posteriormente desidratá-las em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada série a -20°C. Aplicar 40µl da solução de hibridação (contendo cerca de 150ng de sonda) sobre cada lâmina e cobrir com uma lamínula. Após incubação durante 12-14 horas a 37°C em câmara úmida, lavar as lâminas por duas vezes em solução formamida 50%/2xSSC por 15 minutos a 37°C e posteriormente por mais duas vezes em 2xSSC por 15 minutos a 37°C. Realizar mais uma outra lavagem em 4xSSC por 10 minutos, à temperatura ambiente. Sobre cada lâmina, colocar 100µl de FITC 0.07% (Fluorceína Isotioanato) conjugada à Avidina e diluída em tampão C (bicarbonato de sódio 0.1M e NaCl 0.15M, pH 8.5). Cobrir com uma lamínula e incubar a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. Lavar as lâminas por 3 vezes (5 minutos cada) em tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 1.26%, citrato de sódio 0.018%, Triton 0.038% e leite desnatado 1%) a 42°C. Após a lavagem, colocar 100µl de anticorpo anti-Avidina biotinilada 2.5% sobre cada uma das lâminas, cobrir com lamínula e mantê-las a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Realizar a lavagem das lâminas utilizando o mesmo tampão de bloqueio. O sinal de hibridação pode ser aumentado através de sucessivos passos utilizando Avidina-FITC e anti-Avidina por 3 vezes (5 minutos cada) em tampão de bloqueio a 42°C e posteriormente por duas vezes em solução de Triton 20/4xSSC por 3 minutos cada vez. Utilizar 1µl de Iodeto de Propídio (50µg/ml) com 25µl de solução "antifade" (Vectashield antifade-Vector) para fazer a contra-coloração das lâminas.

### **3.8 Processamento das imagens**

As suspensões celulares convencionais foram analisadas em microscópio óptico comum e a análise da coloração cromossômica com composto fluorescente em fotomicroscópio digital de fluorescência. As melhores metáfases, ou seja, as que apresentaram melhor dispersão e cromossomos com morfologia mais nítida e melhores padrões de banda mento, serão fotografadas, sendo as imagens capturadas e serão registradas no fotomicroscópio digital OLYMPUS BX-UCB (suspensões celulares convencionais e coloração cromossômica com composto fluorescente).

### **3.9 Medidas Cromossômicas**

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan *et al.* (1964), e foram classificados em: metacêntrico (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntrico (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntricos (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

### **3.10 Montagem dos Cariótipos**

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo (M, SM, ST, A) e em ordem decrescente de tamanho.

#### 4. Resultados

O número diplóide dos exemplares analisados foi  $2n=50$  cromossomos em ambas as populações (Figuras 1 e 2). A população do ribeirão Capivara apresentou estrutura cariotípica organizada em  $8m+14sm+12st+16a$ , com  $NF=84$  (Figura 1), já a população do ribeirão Água da Madalena apresentou estrutura cariotípica organizada em  $8m+14sm+16st+12a$ , com  $NF= 82$  (Figura2). Polimorfismos cromossômicos relacionados ao sexo e cromossomos B não foram encontrados.

A heterocromatina constitutiva foi localizada nos centrômeros de alguns cromossomos e blocos conspícuos foram observados terminalmente dispersos em alguns pares de cromossomos acrocêntricos em ambas as populações, mostrando uma distribuição equilocal nessas regiões. Polimorfismos de tamanho e número nas regiões heterocromáticas foram observados nas duas populações (Figuras 1 e 2).

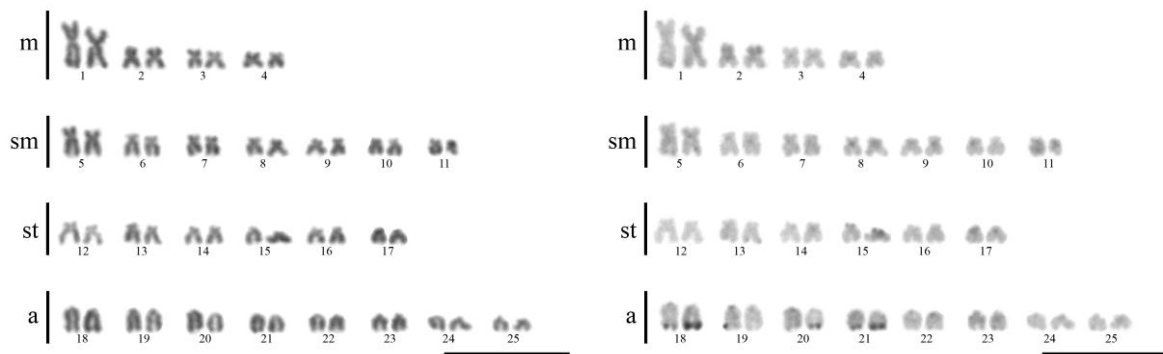


Figura 1: Cariótipos de *A. bockmanni* do ribeirão Capivara após técnica de coloração com Giemsa (esquerda) e bandeamento C (direita). Barra 10  $\mu$ m.

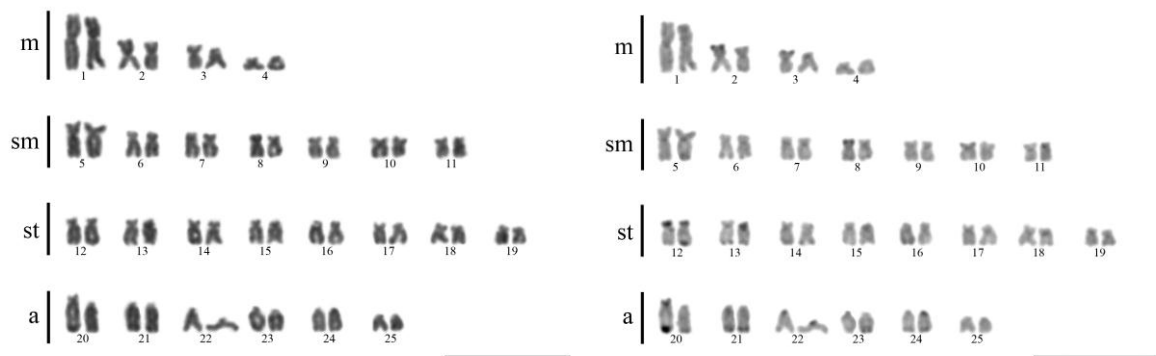


Figura 2: Cariótipos de *A. bockmanni* do ribeirão Água da Madalena após técnica de coloração com Giemsa (esquerda) e bandeamento C (direita). Barra 10  $\mu$ m.

As Ag-RONs foram localizadas em sítios múltiplos nos cromossomos de indivíduos da população do ribeirão água da Madalena e em um par cromossômico nos indivíduos da população do rio Tietê (Figura 3). Também foi identificada uma marcação Ag-RON invertida em um indivíduo dessa população (Figura3). A Ag-RON sequencial ao bandeamento C evidenciou regiões heterocromáticas Ag-RONs positivas e negativas.



Figura3: Cromossomos de indivíduos de *A. bockmanni* do ribeirão Água da Madalena exibindo Ag-RONs múltiplas (esquerda), do ribeirão Capivara exibindo Ag-RONs simples (meio) e inversão das RONS (direita) apresentada por um indivíduo do ribeirão Capivara.

A coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou sítios múltiplos em ambas as populações, sendo esses sítios possivelmente coincidentes com os sítios de Ag-RON e com sítios heterocromáticos, estes últimos, evidenciados com um brilho menos intenso. Outros sítios adicionais foram observados e correspondem a regiões com genes ribossomais da subunidade 18S identificados pela técnica de FISH (Figura 4).

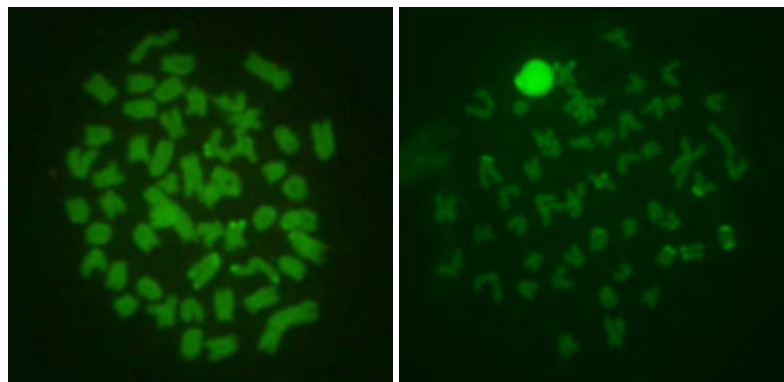


Figura 4: Metáfases de *A. bockmanni* do ribeirão Capivara (esquerda) e do ribeirão Água da Madalena (direita) após técnica de coloração com CMA<sub>3</sub>.

A técnica de FISH com sonda de DNAr 5S marcou um sítio pericentromérico em um cromossomo metacêntrico e um sítio terminal no braço curto de um cromossomo acrocêntrico em ambas as populações. O DNAr 18S mostrou-se disperso em ambas as

populações (Figura 5). Já a FISH com sonda de DNAr 18S revelou que estas sequências estão dispersas pelo genoma da espécie nas populações analisadas, mostrando variações interindividuais.

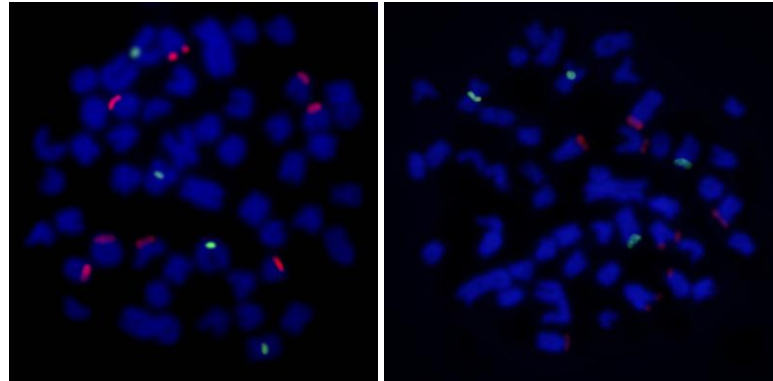


Figura 5: Metáfases de *A. bockmanni* do ribeirão Capivara (esquerda) e do ribeirão Água da Madalena (direita) após técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde).

Os sítios para Histona H1 mostraram-se conservados para a espécie, sendo que foram observados no braço curto dos cromossomos do par dois, em sintenia com o DNAr 5s, e também no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos em ambas as populações (Figura 6).

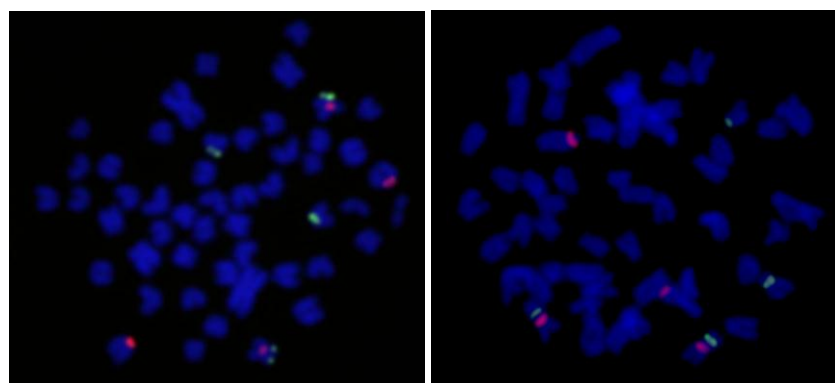


Figura 6: Metáfases de *A. bockmanni* do ribeirão Capivara (esquerda) e do ribeirão Água da Madalena (direita) após técnica de de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S (vermelho) e Histona H1 (verde).



População	Bacia Hidrográfica	Fórmula Cariotípica	Autor, ano
Rio Capivara	Tietê	8m+14sm+12st+16a	Presente trabalho
Rio Campo Novo	Tietê	6m+14sm+14st+16a	Hashimoto, 2010
Rio Barra Seca	Tietê	6m+14sm+14st+16a	Hashimoto, 2010
Córrego Água da Madalena	Parapanema	8m+12sm+12st+18a	Presente trabalho
Rio Alambari	Parapanema	8m+8sm+18st +16a	Hashimoto, 2011
São Miguel Arcanjo	Parapanema	10m+12sm+12st+16a	Kavalco, 2009
Pilar do Sul	Parapanema	10m+12sm+12st+16a	Kavalco, 2009

Quadro 1: Principais estudos envolvendo a espécie *A. bockmanni* nas bacias dos rios Tietê e Parapanema.

## 5. Discussão

O número diplóide dos exemplares analisados foi de  $2n=50$  cromossomos e é coincidente com o descrito para a espécie por Kavalco (2009) e Hashimoto (2010) e com cariótipos descritos para outras espécies do gênero, como, *A. eigenmanniorum* (Fauaz et al., 1994), *A. giton*, *A. parahybae* (Kavalco e Moreira-Filho, 2003). O cariótipo segue a tendência do gênero apresentando o primeiro par de cromossomos metacêntricos característico dos Characidae (Scheel, 1973; Morelli et al., 1983).

A organização cariotípica encontrada difere entre as populações analisadas e de outras populações de *A. bockmanni* (Kavalco, 2009; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Hashimoto et al., 2011). Esta divergência sugere a ocorrência de diferenciação alopátrica. Espécies de *Astyanax* restritas a pequenos tributários e rios podem sofrer evolução independente a partir de eventos como rearranjos não-Robertsonianos ou polimorfismos heterocromáticos extensos, ou ambos (Vicari et al., 2008).

O padrão equilocal de distribuição da heterocromatina encontrado neste estudo pode ser decorrente de uma característica de evolução coordenada atribuída à heterocromatina, a qual seria uma tendência de evolução em uníssono de uma família particular de DNA repetitivo com constituição molecular homogênea (Kasahara, 2009).

A dispersão da heterocromatina em regiões teloméricas de cromossomos de *A. bockmanni* encontrada é semelhante aos dados encontrados por Hashimoto (2010) para *A. bockmanni* e por Mantovani (2000) para *A. scabripinnis*, podendo ser considerada uma tendência no gênero *Astyanax*.

Esta dispersão pode ser explicada com base no modelo proposto por Schweizer e Loidl (1987) que diz respeito à “linear orientation of the anaphase opposite pole-directed centromeres during mitotic interfase” (Rabl polarization). Esta conformação permitiria a transferência de heterocromatina entre sítios equidistantes dos centrômeros de cromossomos não homólogos. Outros processos também podem ter sido responsáveis pelo alto grau de dispersão da heterocromatina encontrado neste trabalho, tais como, replicações múltiplas, permutações desiguais, ampliações, acumulações ou deleções (Jonh, 1988). Por outro lado não podemos descartar a possibilidade de invasão por elementos tranponíveis (Tafalla et al., 2006; Slotkin e Martienssen, 2007).

Foi observado um polimorfismo de tamanho nas bandas C também encontrado em outras populações de *A. bockmanni* (Hashimoto, 2010) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2000). Estes blocos de tamanho diferenciado em cromossomos homólogos podem ter origem a partir de crossing-over desigual decorrente de pareamento não homólogo dos segmentos de DNA repetitivo durante a meiose. Estes processos são capazes de aumentar ou diminuir o número de cópias de segmentos de DNA repetitivo (Smith, 1976).

A técnica de Ag-RON, que permite observar RONS ativas, revelou uma expressão de genes ribossomais diferente entre as populações analisadas.

A população do rio Capivara apresentou, de forma geral, um padrão de NORs, com marcações em um par cromossômico. Este padrão pode ser explicado pela amostragem restrita a tributários que se encontram próximos e possivelmente pouco diferenciados. A inversão observada em um indivíduo neste trabalho pode ser decorrente de rearranjo cromossômico envolvendo a região Ag-RON.

Já no ribeirão Água da Madalena, a população analisada habita um represamento onde, possivelmente, tributários separados antes do represamento, evoluíram e originavam padrões ligeiramente diferentes de atividade de genes ribossomais. Uma vez que foram postos em contato pelo represamento, esses diferentes padrões originaram as variações dos sítios Ag-RONs observadas.

Os diferentes padrões de Ag-RON observados em ambas as populações podem ter se originado a partir de rearranjos estruturais do tipo translocações recíprocas ou inversões que podem ter alterado a localização das NORs. Outros mecanismos têm sido propostos para explicar variações nos padrões de NORs em populações de uma mesma espécie, como neste caso, tais como, transposição de segmentos de DNAr por meio de elementos genéticos móveis, amplificação de gene único de DNAr, originando regiões organizadoras de nucléolo funcionais, erros de inserção após amplificação de DNAr no curso da ovogênese, mas a maioria sem comprovação experimental. (Kasahara, 2009).

Dois tipos estruturais de NORs foram observadas no genoma dos indivíduos analisados. Foram observadas NORs ativas associadas às regiões heterocromáticas e RONS ativas não associadas às essas regiões, de forma que essa associação não interferiu na expressão dos genes dessas regiões.

As regiões Ag-RONs positivas foram fortemente marcadas pela CMA<sub>3</sub> o que sugere um conteúdo GC rico. A heterocromatina constitutiva identificada pelo bandeamento C

apresentou um brilho menos intenso quando corada pela CMA<sub>3</sub>, sugerindo um conteúdo GC diferenciado das NORs. Outros sítios adicionais marcados pela CMA<sub>3</sub> são sítios com genes ribossomais não ativos identificados pelo FISH com sonda de DNAr 18S.

A técnica FISH com sonda de DNAr 5S evidenciou marcações conservadas para a espécie. Tal distribuição se apresenta semelhante às aquelas identificadas em representantes de outras populações dessa espécie (Kavalco, 2009; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Hashimoto et al., 2011) e do gênero (Mantovani et al., 2005), mostrando-se como uma característica de conservação destes sítios no genoma do gênero *Astyanax*.

Considerando a existência de sítios para histona H1 e DNAr 5S em um mesmo cromossomo em estudos com representantes de *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* da bacia do rio Paranapanema, nossos resultados permitem apontar que sequências histônicas e sequências de DNAr possam estar diretamente relacionadas, evoluírem de maneira conjunta e se manterem fisicamente conservadas dentro da estrutura genômica desse diversificado grupo de peixes Neotropicais.

As sequências de DNAr 18S mostraram-se dispersas nos genomas das populações analisadas. Estudos utilizando sondas de DNAr 45S, do qual o 18S é uma subunidade, vêm mostrando uma alta variabilidade de posição e número nas espécies de peixes. Sendo as Ag-RONs múltiplas comuns no gênero *Astyanax* (Artoni et al., 2008). Alterações cromossômicas estruturais, como duplicações e deleções, são eficientes mecanismos de promoção de polimorfismos envolvendo as Ag-RONS (Gold et al., 1990).

## 6. Conclusão

Apesar da separação geográfica pela Cuesta de Botucatu, as populações analisadas encontram-se em estágios pouco diferenciados, provavelmente devido ao pouco tempo de surgimento da espécie dentro do gênero. Outras espécies como as do complexo *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, mais antigas dentro do gênero, apresentam populações com graus de diferenciação mais relevantes.

Os dados deste trabalho e presentes na literatura revelam uma moderada dispersão do DNAr 18S e uma conservação dos sítios de DNAr 5s e histona H1 em *A. bockmanni*. Provavelmente, esta baixa dispersão de genes estruturais deve-se a pouca diferenciação entre as populações dessa espécie analisadas até o presente momento, que fazem parte de somente duas bacias hidrográficas, a do rio Tietê e do rio Paranapanema.

Nossos resultados permitem apontar que sequências histônicas e sequências de DNAr podem estar diretamente relacionadas, evoluírem de maneira conjunta e se manterem fisicamente conservadas dentro da estrutura genômica desse diversificado grupo de peixes Neotropicais.

## Referências

ALMEIDA, F. F. M. de; CARNEIRO, C. D. R. Botucatu o Grande Deserto Brasileiro. Ciência Hoje: vol.24, n.º143, p.36-43. SBPC em [http://www.achetudoeregiao.com.br/SP/Aquifero\\_botucatu.htm](http://www.achetudoeregiao.com.br/SP/Aquifero_botucatu.htm), desenvolvido com base em informações da EMBRAPA MEIOAMBIENTE, acesso em 19 Abril 2009. 1998.

ARTONI, R. F.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C. e MATOSO, D. A. Epifluorescence and light microscopy evidencing structural and functional polymorphism of ribosomal DNA in fish (Teleostei: *Astyanax fasciatus*). Micron., v.39, n.8, p.1156-1159, 2008.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. Poluição e Piscicultura, São Paulo. 1972.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (CHARACIDAE). Revista Brasileira de Genética., v.17, n.2, p.157-163. 1994.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. Experientia., v.49, p. 810 – 813, 1993.

GALETTI, Jr., P. M.; RASCH, E. M. Chromosome studies in *Poecilia lacpunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A<sub>3</sub> (Teleostei, Poeciliidae). Ichth. Explor. Freshwater., v. 4, p. 269-277, 1993.

GOLD, J.R.; LI, C. SHIPLEY, N.S.; POWERS, P.K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. Journal of Fish Biology., v.37, p.563-575, 1990.

GOODPASTURE, C., BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.*, v.53, p.37 – 50, 1975.

GROMICHO, M. ; COLLARES-PEREIRA, M. J. Polymorphism of major ribosomal gene chromosomal sites (NOR-phenotypes) in the hybridogenetic fish *Squalius alburnoides* complex (Cyprinidae) assessed through crossing experiments. *Genetica.*, v.122, p.291 – 302, 2004.

HASHIMOTO, D. T. e F. PORTO-FORESTI. Chromosome polymorphism and heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology.*, v.8, n.4, p.861-866, 2010.

HASHIMOTO, D. T., M. A. FERGUSON-SMITH, W. RENS, F. FORESTI e F. PORTO-FORESTI. Chromosome mapping of H1 histone and 5S RNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei: Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134: 64-71. (DOI: 10.1159/000323512), 2011.

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

JONES, R.N.  $\beta$ -chromosome drive. *Am. Nat.*, v.137, p.430-442, 1991.

JONH, B. The biology of Heterochromatin. (in *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*, edited by R. S. Verma, Cambridge University Press, 1-147), 1988.

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa citogenética em vertebrados. 1ª ed. - Sociedade Brasileira de Genética. 160 p. Ribeirão Preto, S. P, 2009.

KAVALCO, K.F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analysis in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia*, v.56, n.4, p453-461, 2003.

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

LEVAN, A., FREDGA, K. E., SANDBERG, H. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.*, v.52, p.201 – 220, 1964.

LONG, E. O. e DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 49, p.727-764, 1980.

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

MAISTRO. E. L.; FORESTI, F. e OLIVEIRA, C. R- AND G-Band Patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (*Pisces, Characiformes, Characidae*). *Genetics and Molecular Biology.* v. 22, n. 2, p. 201-204, 1999.

MANTOVANI, M.; ABELL, L. D. dos S.; MESTRINER , C. A. e 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.*, p. 211-216, 2005.

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

MARTINS, C.; WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, ed, *Focus on Genome Research*. Hauppauge, NY, USA : Nova Science Publishers., p.289 – 318, 2004.



MARTINS, C., OLIVEIRA, C., WASKO, A.P., WRIGHT, J.M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes—a review. *Aquaculture.*, v.231, p.37–49, 2004.

MESTRINER, C. A.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): Analysis of a sex system. *Chromosome Res.*, v. 3, p. 440-443, 1995.

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.

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

NELSON, D. W.; HONDA, B. M. Genes coding for 5S ribosomal RNA of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gene.*, v.38, p.245 – 251, 1985.

NELSON, J. S.; *Fishes of the World*. Hoboken, New Jersey: John Wiley e Sons. 4<sup>th</sup> ed. 2006.

OLIVEIRA,C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. e FAUSTO, F. Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. *Fish Cytogenetics*. Science Publishers. p.111-164. 2007.

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa*. *Steindachner, 1881* (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia.*, v.36, p.307-314, 1983.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; MARTÍNEZ, J. L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Mol. Ecol.*, v.4, p.275 – 276, 1995.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; O'BRIEN, P. C. M.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R. M. S.; NORONHA, R. C. R.; RISSINO, J.; OLIVEIRA, E. H. C. DE e FERGUSON-SMITH, M. A. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research*. v.13, p.339-347, 2005.

PINKEL, D., STRAUME, T. e GRAY, J. W., Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.83, p.2934-2938, 1986.

PORTO-FORESTI, F.; Oliveira, c.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. e FORESTI, F. Nor Markers in Identification and Management of Cultured Fish Species: The Case of Rainbow Trout Stocks Reared in Brazil. *Fish Cytogenetics*. Science Publishers. p.333-360. 2007.

RIBEIRO, F. L.; CAMPOS, S. Vulnerabilidade á erosão do solo da Região do Alto do Rio Pardo, Pardinho, SP. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.11, n.6, p.628-636. UAEAg/UFCG. Campina Grande, P.B. 2007.

SAJDAK, S. L. ; REED, K. M. ; PHILIPS, R. B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J. Mol. Evol.*, v.46, p.680 – 688, 1998.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O.  $\beta$ -Chromosome in *Astyanax Scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity.*, v. 66, p.50-56, 1992

SCHEEL, J.J. Fish chromosomes and their evolution. Internal Report of Danmarks Akvarvum. Charlottenlund (Denmark). p22, 1973.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics.*, v.27, p.190-193, 1980.

SCHWEIZER, D. e LOIDL, J. A model of heterochromatin dispersion and the evolution of C banding patterns. *Chrom. Today.*, v.9, p.61-74, 1987.

SLOTKIN, R. K. e R. MARTIENSEN. Transposable elements and epigenetic regulation of genome. *Nature Reviews.*, v.8, p.272-285, 2007.

SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing over. *Science.*, v.191, p.528-535, 1976.

SPEICHER, R. M. e CARTER, N. P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature.*,v.6, p.782-792, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Expl. Cell Res.*, v.75, p.304 – 306, 1972.

TAFALLA, C., ESTEPA, A. e COLL, J. M.. Fish transposons and their potential use in aquaculture. *Journal of Biotechnology.*, v.123, p.397-412, 2006.

VARI, R.P.; CASTRO, R. M. C. New Species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil *Copeia* Article: pp. 150–162 | Abstract Volume 2007, Issue 1 (February 2007), 2007.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. e BERTOLLO, L. C. A. Comparative cytogenetics among species of the *A. scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology.*, v.31, p.173-179, 2008.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, P. M. Sex-ratio distortion associated with the presence of the  $\beta$ -Chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Cell. Genet.*, v. 74, p. 70-75, 1996.