

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR EM *Characidium*: UMA ANÁLISE DA  
DIVERSIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW

TATIANA CRISTINA MACHADO

Ponta Grossa

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR EM *Characidium*: UMA ANÁLISE DA  
DIVERSIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Ponta Grossa

2011

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

M149c Machado, Tatiana Cristina  
Citogenética molecular em *Characidium* : uma análise da  
diversificação dos cromossomos sexuais ZZ/ZW / Tatiana Cristina  
Machado. Ponta Grossa, 2011.  
74 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de  
concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta  
Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

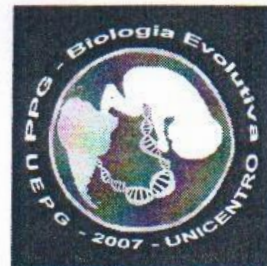
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

1. Peixes neotropicais. 2. Citotaxonomia. 3. FISH. I. Vicari,  
Marcelo Ricardo. II. T.

CDD: 571

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2011**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **TATIANA CRISTINA MACHADO**.

Aos vinte e oito do mês de fevereiro de dois mil e onze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Marcelo Ricardo Vicari, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno(a) **TATIANA CRISTINA MACHADO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello e Dr. José Carlos Pansonato Alves. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Citogenética Molecular em *Characidium*: Uma análise da Diversificação dos Cromossomos Sexuais ZZ/ZW**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de dois mil e onze.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Carlos Pansonato Alves \_\_\_\_\_

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Dedico este trabalho aos meus pais Edson e Maria Antônia, meus irmãos Christian e Hederson, e ao Fabrício, pelo total apoio e esforço para que eu chegasse aqui, e também por todo seu amor e incentivo.

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

**(Carlos Drummond de Andrade)**

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.”

**(Mahatma Gandhi)**

“Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos. Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo nem culpa de sentir prazer. Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito nem pudor. Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo novo, de novo e de novo, e quantas vezes for preciso. Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se Presente e tem a duração do instante que passa.”

**(Mário Quintana)**

## Agradecimentos

Neste momento gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, incentivando, dando força e apoio. Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, força maior deste trabalho. À minha família, meus pais e irmãos, pela educação, pelo apoio, dedicação, pela correria e gastos de todos os dias para que este trabalho fosse possível, sempre torcendo por mim. Meus sobrinhos lindos, que só me enchem de alegrias. À minha tia Marlene (*in memorian*), Down de grande coração. Amo você pra sempre. Ao Fabrício da Luz Patruni, pela paciência e apoio em todos os momentos. Sem vocês, nada disso teria se realizado. Amo todos vocês.

À Elise Tatiane Felipe por todas as conversas e palavras amigas nas horas difíceis.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio e condições oferecidas para a realização deste estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, agradeço por toda ajuda prática e teórica, por todo ensinamento e paciência, por toda cobrança, pelos momentos de descontração, mas principalmente por acreditar em mim e fazer parte desta realização.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, um conselheiro querido, obrigada por todos os ensinamentos, incentivo à pesquisa, por fazer despertar questionamentos, e principalmente por ser nosso mentor.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello, obrigada por transmitir seu conhecimento, pelo apoio na bancada e por ser essa pessoa maravilhosa e querida, sempre sincera.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Viviane Nogaroto Vicari e Prof. Rodrigo Rodrigues Matiello sempre dispostos a ajudar, ensinar e conversar, vocês também foram fundamentais nesta realização.

Aos professores Dr. Orlando Moreira-Filho e Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo da Universidade Federal de São Carlos, pelos materiais fornecidos, pelas coletas, auxílios e ensinamentos.

A todos do Laboratório de Citogenética e Evolução, aos meus amigos, Michelle Orane, Maelin Silva, Leonardo Gusso Goll, Daniele Tasior, Kamila de Oliveira da Rosa, Kaline Ziemniczak, Naiele Bonatto, Alain Victor de Barros, Paulo Vinícius Svidinik, Ricardo de Oliveira Brito, Priscila Estabile, Jonathan Pena Castro, Bárbara Gardim de Mello, Paula Falcão, Doutoranda Carla Lorscheider e Dr. Rafael Noletto, e em especial à Marcela Baer Pucci por toda ajuda e empenho na realização deste trabalho. Agradeço também àqueles que de certa forma também fizeram parte do laboratório, um abraço Fernanda Cordeiro e, claro ao Miguel Airton Carvalho, por você alegrar os dias de trabalho, por me dizer palavras amigas e sinceras, e também por não deixar ninguém triste, transformando um local de trabalho num local de descontração e realizações.

À Zoli Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação Biologia Evolutiva, e ao Gustavo, por todas as ajudas e esclarecimentos.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO no: 15117) pelas autorizações de captura de peixes.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, que muito me auxiliou durante o mestrado.

## Resumo

O gênero *Characidium* apresenta alta variabilidade cariotípica no que diz respeito a origem e diversificação dos cromossomos sexuais, variação intra e interindividual de cromossomos B e localização e número de sítios de RONS. Variações populacionais na morfologia dos cromossomos sexuais Z e W propiciam excelente modelo de estudo de variação cromossômica associada a mecanismo em potencial para o isolamento reprodutivo. Neste estudo, foi obtida sonda do cromossomo sexual W de *Characidium gomesi* por microdissecção cromossômica posterior ao bandamento C, amplificação por DOP-PCR e realização de pintura cromossômica comparativa desta sonda W juntamente com o rDNA 18S em algumas populações/espécies do gênero: *C. gomesi* do rio Verde (PR), *C. gomesi* do rio Grande (SP), *C. gomesi* do ribeirão Minhoca (MG), *C. lauroi* do ribeirão Grande (SP), *C. zebra* do rio Passa Cinco (SP). A análise convencional das populações de *C. gomesi* do ribeirão Minhoca e rio Verde, ainda não descritas, demonstraram o número diplóide de 50 cromossomos e presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW em estágio avançado de diferenciação. Com a utilização da dupla FISH sonda W e rDNA 18S nas populações de *C. gomesi*, *C. lauroi* e *C. zebra* foi possível hipotetizar uma via de diferenciação dos cromossomos sexuais no grupo. Nessa possível via, a transposição/translocação da RON para um proto cromossomo sexual foi um primeiro evento da diferenciação. Posteriormente, a heterocromatinização de outros DNAs repetitivos não presentes na RON atuou na alteração das morfologias dos cromossomos ZW. Nas espécies *C. gomesi* e *C. alipioi* a heterocromatinização do W é intensa, a RON sofreu nova transposição e é observada em condição autossômica. Ainda, foi discutido o isolamento biogeográfico e a diferenciação dos cromossomos sexuais em *Characidium* com eventos essenciais ao isolamento reprodutivo e especiação do grupo.

## Abstract

The *Characidium* genus shows a broad karyotypic variability regarding the origin and diversification of the sex chromosomes, intra-and interindividual variation of B chromosomes and location of sites and number of NORs chromosomes bearing. Variations in the sex chromosomes Z and W morphology provide an excellent model to study chromosomal differentiation associated with a potential mechanism for reproductive isolation. In this study, we obtained a probe of the sex chromosome W of *Characidium gomesi* by chromosome microdissection, amplification by DOP-PCR and conducting comparative chromosome painting of W probe together with the 18S rDNA probe in some populations / species: *C. gomesi* of Rio Verde (PR), *C. gomesi* of Rio Grande (SP), *C. gomesi* of Ribeirão Minhoca (MG), *C. lauroi* of the Rio Grande (SP), *C. zebra* of Passa Cinco (SP). The conventional analysis of the populations of *C. gomesi* from Rio Verde and Ribeirão Minhoca, not yet described, showed the diploid number with 50 chromosomes and the presence of sex chromosome ZZ / ZW in advanced stages of differentiation. With the use of dual FISH, W and 18S rDNA probes, in populations of *C. gomesi*, *C. lauroi* and *C. zebra* was hypothesized a pathway of differentiation of sex chromosomes in the group. In this possible pathway, transposition / translocation of the NORs sites to proto sex chromosome was the first event in this differentiation. Thereafter, the heterochromatization of other repetitive DNAs, not present in NORs site, acted on the alteration of the chromosomes Z and W morphologies. The heterochromatization of W chromosome was intense in *C. gomesi* and *C. alipioi* species so the NOR sites were again transposed to an autosomal condition. Was discussed also the biogeographic barriers help to differentiation of sex chromosomes in *Characidium* promoting reproductive isolation and speciation of the group.

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura I. Espécies do gênero <i>Characidium</i> analisadas neste estudo. Em (A) <i>Characidium gomesi</i> , localidade rio Verde (PR) bacia do rio Tibagi; em (B) <i>Characidium gomesi</i> população do ribeirão Minhoca (MG) bacia do rio São Francisco; em (C) <i>Characidium gomesi</i> fêmea da localidade rio Grande (SP) bacia do Alto Paraná; em (D) macho da localidade rio Grande (SP) bacia do Alto Paraná; em (E) <i>C. lauroi</i> da localidade ribeirão Grande (SP) bacia do Paraíba do Sul e; (F) <i>C. zebra</i> da localidade rio Passa Cinco (SP) bacia do Alto Paraná..... | 18 |
| Figura II. Cariótipos de fêmeas de <i>Characidium gomesi</i> . Em (a, b) coloração convencional por Giemsa e bandamento C sequencial para a população do ribeirão Minhoca, bacia do rio São Francisco (MG). Em (c, d) coloração convencional por Giemsa e bandamento C sequencial para a população do rio Verde, bacia do rio Tibagi (PR).....                                                                                                                                                                                                                                                | 34 |
| Figura III. Em (a) gel de agarose 1% evidenciando a amplificação do cromossomo W de <i>Characidium gomesi</i> da população de ribeirão Minhoca, MG; (b) metáfase de fêmea de <i>Characidium gomesi</i> da população do rio Verde, PR, hibridizada com a sonda do cromossomo W e; (c) metáfase de <i>Characidium gomesi</i> da população do ribeirão Minhoca, hibridizada com sonda do cromossomo W.....                                                                                                                                                                                       | 35 |

Figura IV. Localização dos sítios W e 18S por FISH em *Characidium*. Em (a) cariótipo de fêmea de *Characidium gomesi*, localidade rio Verde (PR); (b) cariótipo de fêmea de *C. gomesi* da localidade de ribeirão Minhoca (MG); (c) cariótipo de fêmea de *C. gomesi* da localidade de rio Grande (SP); (d) cariótipo de macho de *C. gomesi* da localidade de rio Grande (SP); (e) cariótipo de fêmea de *C. lauroi* da localidade de ribeirão Grande (SP); (f) cariótipo de fêmea de *C. zebra* da localidade de Passa Cinco (SP).....36

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela I. Dados citogenéticos para o gênero <i>Characidium</i> da bacia do rio Paraná.....                                                                   | 5  |
| Tabela II. Espécies de <i>Characidium</i> estudadas, respectiva localidade, bacia hidrográfica, número de fêmeas e machos analisados.....                    | 37 |
| Tabela III. Fórmula cromossômica, ocorrência de cromossomos sexuais, sítios sonda W e rDNA 18S nas espécies/populações de <i>Characidium</i> analisadas..... | 38 |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                       |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução .....</b>                                                                                                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1      | <i>ORDEM CHARACIFORMES .....</i>                                                                                                                                      | 1         |
| 1.2      | <i>CITOGÉNÉTICA DO GÊNERO CHARACIDIUM .....</i>                                                                                                                       | 3         |
| 1.3      | <i>CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS.....</i>                                                                                                                | 9         |
| 1.3      | <i>DNA REPETITIVO.....</i>                                                                                                                                            | 12        |
| <b>2</b> | <b>Justificativa e Objetivos .....</b>                                                                                                                                | <b>16</b> |
| <b>3</b> | <b>Material e Métodos.....</b>                                                                                                                                        | <b>18</b> |
| 3.1      | <i>MATERIAL BIOLÓGICO.....</i>                                                                                                                                        | 18        |
| 3.2      | <i>METODOLOGIAS.....</i>                                                                                                                                              | 19        |
| <b>4</b> | <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                               | <b>20</b> |
| 4.1      | <i>Diversificação e pintura cromossômica no gênero Characidium (Characiformes, Crenuchidae): uma possível via de diferenciação dos cromossomos sexuais ZZ/ZW.....</i> | 21        |
| <b>5</b> | <b>Considerações Finais .....</b>                                                                                                                                     | <b>39</b> |
| <b>6</b> | <b>Referências Bibliográficas .....</b>                                                                                                                               | <b>41</b> |
| <b>7</b> | <b>Anexos.....</b>                                                                                                                                                    | <b>53</b> |

## Introdução

### **1.1 Ordem Characiformes**

Peixes apresentam grande diversidade morfológica, de habitat e também em sua biologia, o que favorece o entendimento da sua história evolutiva (NELSON, 1984). No entanto, ainda é escasso o conhecimento quando comparado a outros grupos de vertebrados. Uma razão para essa carência é o elevado número de espécies que pode ultrapassar 28.400 (NELSON, 2006).

A ictiofauna neotropical de água doce é a mais diversificada do mundo, com mais de 4.000 espécies descritas, podendo chegar a 8.000 taxa (SCHAEFER, 1998). Muitas espécies novas estão sendo descritas, uma resposta ao avanço do conhecimento sobre os peixes de pequeno porte ocorrentes em riachos e outros ambientes de cabeceiras (BUCKUP et al., 2007).

Os peixes neotropicais são representados principalmente pelas ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (LUNDBERG et al., 2000), sendo que as duas ordens mais representativas em número de espécies conhecidas nesta região biogeográfica são Characiformes e Siluriformes. A ordem Characiformes com aproximadamente 1.674 espécies válidas, distribuídas em 270 gêneros, é um dos maiores grupos de peixes de água doce (NELSON, 2006), número provavelmente ainda subestimado devido a ocorrência de ambientes ainda inexplorados (VARI, 1998). São descritas 18 famílias para Characiformes (BUCKUP, 1998; NELSON, 2006); sendo que apenas 4 destas famílias são endêmicas da África (cerca de 200 espécies), e o restante são endêmicos da América Central e do Sul (mais de 1.200 espécies).

Esta ordem apresenta padrões biogeográficos frequentemente vistos em regiões tropicais e subtropicais, constituindo um grupo ecológica e morfológicamente diverso, sendo considerado um excelente modelo para estudos evolutivos. A vasta gama de

especializações tróficas encontradas entre Characiformes é comparável ao de ciclídeos e inclui detritívoros, herbívoros, planctofagia e predatismo. Algumas espécies possuem adaptações morfológicas e fisiológicas de sobrevivência em condições de hipóxia, comuns em ambientes inundados (ORTÍ & MEYER, 1997).

O confinamento de Characiformes em habitats exclusivamente dulcícolas os torna intimamente ligados à dinâmica da história geológica, e frequentemente são alvos de levantamentos sobre a história biogeográfica de faunas de água doce (MYERS, 1938). Characiformes africanos e neotropicais não parecem formar grupos monofiléticos, dessa forma Lundberg (1993) sugere que a origem da maioria dos grandes clados deve ter precedido a separação continental, fato verificado também por Buckup et al. (1991) que destaca a intolerância a salinidade dentre os Characiformes. Assim, relações filogenéticas entre linhagens de Characiformes têm sido motivo de controvérsia (WEITZMAN & FINK, 1983; UJ, 1990; BUCKUP, 1991; LUCENA, 1993; VARI, 1995), e até agora têm sido abordadas utilizando apenas caracteres morfológicos.

Os peixes Crenuchidae foram removidos da família Characidae, onde constituíam a subfamília Crenuchinae, e considerados como uma nova família monofilética dentro de Characiformes (BUCKUP, 1998). Crenuchidae são peixes de pequeno porte, que raramente excedem os 10 cm de comprimento padrão e são diagnosticados pela presença de pares de forames localizados no osso frontal, posteriormente à órbita. Possuem corpo fusiforme, com boca pequena e terminal (BUCKUP, 1991), nadadeiras peitorais com implantação baixa que, juntamente com as pélvicas, são adaptadas a funcionar como ventosas onde o animal pode se apoiar no substrato, permitindo que este possa enfrentar águas rápidas.

*Characidium* é o gênero mais diversificado dos Crenuchidae e amplamente distribuído por sistemas de água doce entre o Panamá e Argentina, incluindo cerca de 59

espécies das quais 50 são consideradas válidas (BUCKUP, 2003). Os exemplares de *Characidium* são diferenciados dos demais Crenuchidae pela presença da mancha mediana escura próxima à base da nadadeira caudal e pelo número reduzido de raios da nadadeira anal (menos que 14 raios) (BUCKUP, 1991, 2003). Servem como forrageiros a peixes maiores, também são muito utilizados em aquarofilia e são popularmente conhecidos como piquira, piquirinha, piabinha, canivetinho ou mocinha. Muitas espécies de algumas áreas da América do Sul restam por serem descritas, e o número de espécies no gênero deve crescer significativamente (BUCKUP & REIS, 1997).

### 1.2 Citogenética do Gênero *Characidium*

Os primeiros trabalhos publicados sobre cariótipos de peixes neotropicais devem ser creditados a Jim & Toledo (1975), em duas espécies de *Astyanax*, Toledo & Ferrari (1976), em Pimelodidae, e Michelle et al. (1977a), em Cichlidae e Loricariidae, respectivamente.

Characiformes apresentam uma vasta variabilidade cariotípica, onde se observam grupos com cariótipos bastante heterogêneos ao lado de outros bem conservados. Esta ordem exhibe uma ampla variação no número diplóide, como em *Hemigrammus*, com  $2n=28$  (SCHEEL, 1973) e em *Potamorhina altamazonica*, com  $2n=102$  (FELDBERG et al., 1993). Entre os Characiformes, considera-se existir dois padrões de diversificação cromossômica, onde famílias como Erythrinidae ou gêneros como *Astyanax* apresentam grande variabilidade quanto ao número e estrutura cromossômica e, famílias como Anostomidae, Prochilodontidae, Parodontidae e Crenuchidae mostram pequena variação numérica no cariótipo (BERTOLLO et al., 1986; GALETTI Jr. et al., 1994). No entanto, estudos cromossômicos mais recentes demonstraram alta diversidade cariotípica também nestas famílias, que apesar de manterem números diplóides estáveis, apresentam ampla variação cromossômica estrutural (ARTONI et al., 2006; VICARI et al., 2006, 2008,

2010). Comparado ao número de espécies, estudos citogenéticos em Crenuchidae ainda são escassos e limitados a espécies do gênero *Characidium* (tabela I) (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

Peixes do gênero *Characidium* caracterizam-se como um interessante modelo para estudos genéticos e evolutivos, pois apesar de uma estrutura cariotípica relativamente estável com  $2n=50$  cromossomos, podem apresentar inúmeras divergências interespecíficas e interpopulacionais, tais como cromossomos B, sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, variação na localização e número dos sítios de rDNA e ocorrência de indivíduos triplóides (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

Neste gênero, sistemas de cromossomos sexuais com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW já foram observados em *C. gomesi*, *C. alipioi*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

**Tabela I:** Dados citogenéticos para o gênero *Characidium* da bacia do rio Paraná

| <i>Espécies</i>                              | <i>Fórmulas<br/>Cariotípicas</i>    | <i>Sist.<br/>Sexua<br/>l</i> | <i>B</i> | <i>Ag-<br/>NOR</i> | <i>18S</i> | <i>5S</i> | <i>Localização</i>           | <i>Re<br/>f</i> |
|----------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|----------|--------------------|------------|-----------|------------------------------|-----------------|
| <i>C. zebra</i>                              | 32m+18sm                            | -                            | -        | 25 (T)             | -          | -         | Reserva Jataí SP             | 1               |
| <i>C. zebra</i>                              | 32m+ 18sm                           | -                            | 1        | 25 (T)             | -          | -         | Rio Passa Cinco SP           | 1-2             |
| <i>C. zebra</i>                              | 32m+18sm                            | -                            | -        | 25 (T)             | -          | -         | Rio Piracicaba SP            | 1               |
| <i>C. zebra</i>                              | 32m+18sm                            | -                            | -        | 23 (I)             | -          | -         | Córrego Paiol<br>Grande SP   | 4               |
| <i>C. zebra</i>                              | 32m+18sm                            | -                            | -        | 23 (T)             | -          | -         | Rio Machado MG               | 7               |
| <i>C.<br/>lagosantensis</i>                  | 32m+18sm                            | -                            | -        | -                  | -          | -         | Reserva Jataí SP             | 1               |
| <i>C. pterosticum</i>                        | 32m+16sm+2s<br>t                    | -                            | -        | -                  | -          | -         | Reserva Carlos<br>Botelho SP | 1               |
| <i>C. pterosticum</i>                        | 32m+16sm+2<br>a                     | ZZ/Z<br>W                    |          | 2 (T)              | -          | -         | Rio Ribeira do<br>Iguape SP  | 9               |
| <i>C.lauroi</i>                              | 24m+24sm+2s<br>t                    | -                            | -        | 5 e 23<br>(T)      | -          | -         | Ribeirão Grande SP           | 5               |
| <i>C.lauroi</i>                              | ♀31m+12sm+<br>1a<br>♂32m+18sm       | ZZ/Z<br>W                    |          | 2(T)               | -          | -         | Rio Grande SP                | 9               |
| <i>C. gomesi</i>                             | 32m+18sm                            | -                            |          | 17 (T)             | -          | -         | Rio Machado MG               | 7               |
| <i>C. gomesi</i>                             | 32m+18sm                            | ZZ/Z<br>W                    |          | 18 (T)             | -          | -         | Córrego Paiol<br>Grande SP   | 4               |
| <i>C. gomesi</i>                             | ♀31m+19sm<br>♂32m+18sm<br>♂32m+18sm | ZZ/Z<br>W                    | 0-4      | 18 (T)             | 18(T<br>)  | 25 (I)    | Rio Parapanema               | 10              |
| <i>Characidium<br/>sp. cf. C.<br/>gomesi</i> | ♀31m+18+1st                         | ZZ<br>/ZW                    | -        | 2-7 (T)            | 10<br>(T)  | 2 (I)     | Rio Quebra Perna<br>PR       | 8               |
| <i>C. sp. cf C.<br/>alipioi</i>              | 30m+20sm                            | ZZ/Z<br>W                    | -        | 16 (T)             | -          | -         | Ribeirão Grande SP           | 5               |

Referências : 1. Miyazawa & Galetti Jr. ,1994; 2. Miyazawa, 1991; 3. Maistro et al., 1998; 4. Centofante, Bertollo & Moreira-Filho, 2001; 5. Centofante et al. ,2003; 6. Maistro et al., 2004; 7. Silva & Maistro, 2006; 8. Vicari et al., 2006; 9. Pansonato-Alves et al., 2010; 10.Pansonato-Alves et al., 2011.  
m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; B = cromossomos B; T = terminal; I = intersticial; Ref. = references;

Adicionalmente, Centofante et al. (2001) em um levantamento ictiofaunístico e citogenético em espécies de cabeceiras de riachos na região da serra da Mantiqueira (Estado de São Paulo) encontraram um caso de triploidia natural ( $2n=3x=75$ ) em um espécime fêmea de *C. gomesi*, que apresentava dois cromossomos Z e um cromossomo W (ZZW), assim como três homólogos do par 18 mostraram sítios ribossômicos ativos.

De acordo com uma análise morfológica realizada por Buckup (1993), *Characidium zebra* apresenta vários caracteres plesiomórficos sendo assim considerado basal na filogenia de *Characidium*. Entre os caracteres cromossômicos de *C. zebra*, estão: a manutenção de  $2n=50$  cromossomos e fórmula cariotípica de 32 metacêntricos e 18 submetacêntricos, ausência de sistema de cromossomos sexuais diferenciados, a distribuição da heterocromatina em região centromérica e terminal dos cromossomos e, um par de cromossomos portador de Regiões Organizadoras de Nucléolo em região terminal/subterminal do braço longo de um pequeno cromossomo submetacêntrico, apresentam também o primeiro par diferenciado em tamanho, sendo o maior par do cariótipo (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; CENTOFANTE et al., 2001; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

Dessa forma, alterações nos cariótipos de outras espécies, quando comparados ao de *C. zebra* poderiam ser explicadas pela ocorrência de rearranjos cromossômicos. Assim, o par acrocêntrico encontrado em *C. pterostictum* poderia ter surgido a partir de um evento de inversão pericêntrica em um par de cromossomos submetacêntricos, seguido pelo acúmulo de heterocromatina na região do rearranjo (PANSONATO-ALVES et al., 2010).

Além do número diplóide de 50 cromossomos, a fórmula cromossômica de 32 metacêntricos e 18 submetacêntricos, foi observada para a maioria das espécies de *Characidium* estudadas. No entanto, variações na fórmula cromossômica também têm sido

relatadas, indicando que alguns rearranjos, tais como inversões pericêntricas e heterocromatinizações podem ter ocorrido no gênero (VICARI et al., 2008).

As variações cariotípicas observadas em diferentes espécies de *Characidium* estão relacionadas principalmente a eventos cromossômicos envolvendo a heterocromatina constitutiva, que pode apresentar-se restrita às regiões centroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos, nos cromossomos sexuais Z e W, nas regiões de RONS e nos cromossomos B (CENTOFANTE et al., 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011). A heterocromatinização parcial ou até mesmo total do cromossomo sexual W é uma característica comum a todas as espécies analisadas portadoras do sistema sexual (CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011). Esta diferenciação do cromossomo sexual W parece atuar fortemente na diferenciação interespecífica e também, na diversificação populacional para o isolamento reprodutivo associado a eventos vicariantes (VICARI et al., 2008).

Ainda, as espécies *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. schubarti*, e *Characidium* sp. apresentam sítios de RONS nas regiões terminais dos cromossomos Z e W (NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010). Por sua vez, apenas uma população de *C. gomesi* apresentou RONS nos cromossomos Z e W, enquanto a maioria das populações analisadas possui sítios de RONS em cromossomos autossomos (PANSONATO-ALVES et al., 2011). Vicari et al. (2008) consideraram a existência de um proto cromossomo sexual para espécies de *Characidium* e, tanto o cromossomo Z quanto o W tiveram modificações na morfologia, provavelmente devido a mecanismos de duplicações, deleções e/ou inversões em relação à condição ancestral. Ainda, neste mesmo estudo, os autores consideraram a heterocromatinização do cromossomo W como evento essencial a diferenciação deste sistema em *Characidium*.

Posteriormente, Pansonato-Alves et al. (2011) inferiram que a ocorrência de RONS nos cromossomos ZW da maioria das espécies estudadas de *Characidium* poderia remeter a um estado ancestral, presente no par de proto cromossomos sexuais, anterior ao processo de heterocromatinização, corroborando estudos de Vicari et al. (2008) que sugeriram uma origem comum para o par sexual de *Characidium*. Já entre outras espécies, *Characidium* sp. aff. *C. gomesi* (MAISTRO et al., 1998, 2004), *Characidium gomesi* (CENTOFANTE et al., 2001), *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* (CENTOFANTE et al., 2003), e *Characidium* cf. *gomesi* (VICARI et al., 2008) as RONS foram localizadas em região terminal de um grande par submetacêntrico. Por sua vez, as populações de *Characidium* que não apresentam sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos, as RONS estão localizadas em um par cromossômico não homeólogo àquelas que possuem cromossomos sexuais, como verificado em distintas populações de *C. cf. zebra*, que apresentam as RONS na região intersticial no braço maior de um par cromossômico submetacêntrico pequeno (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; CENTOFANTE et al., 2001).

Segundo Weitzman et al. (1988), os principais rios do sul e sudeste do Brasil estão atualmente separados por barreiras que impedem a dispersão de espécies e populações, o que favorece a ocorrência de eventos que determinam o isolamento dos grupos. Neste sentido, Centofante et al. (2001, 2003) e Vicari et al. (2008) consideraram que a evolução de sistemas de cromossomos sexuais no gênero *Characidium* pode estar intimamente relacionada à existência de barreiras biogeográficas. Dessa forma, constituições cariotípicas e diferentes sistemas de cromossomos sexuais em peixes poderiam ser fixados de forma independente a partir do ancestral comum em diferentes espécies de um gênero, promovendo uma diversificação intraespecífica, contribuindo para o processo de especiação. Ainda, para as espécies do gênero *Characidium* que ocorrem em simpatria foi

proposto uma evolução em bacias hidrográficas independentes e, eventos a posteriori de captura de rios nas nascentes poderiam explicar a situação atual de ocupação do mesmo ambiente (CENTOFANTE et al., 2001, 2003).

A ocorrência de espécies estreitamente relacionadas com e sem presença de cromossomos sexuais vivendo em simpatria, sugere que este sistema poderia ser um importante mecanismo para a manutenção do isolamento genético entre as espécies coexistentes. Tal ocorrência tem sido observada em *Apareiodon* (MOREIRA-FILHO et al., 1985), *Leporinus* (GALETTI Jr. et al., 1995), *Hoplias* (SCAVONE et al., 1994; BERTOLLO et al., 2000), *Characidium* (CENTOFANTE et al., 2001, 2003) e *Parodon* (CENTOFANTE et al., 2002).

### **1.3 Cromossomos sexuais em peixes Neotropicais**

Os mecanismos de determinação do sexo em peixes são variados e incluem sistemas de cromossomos sexuais simples (XX/XY, ZZ/ZW), poligenia e XX/XO. Também incluem sistemas mais complexos de translocação entre sexuais e autossomos tais como:  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ,  $XX/XY_1Y_2$  e  $ZZ/ZW_1W_2$  (SOLA et al., 1981). Centofante et al. (2002) forneceram uma revisão sobre a diversidade de sistemas de cromossomos sexuais encontrados em diferentes famílias, gêneros e espécies de peixes neotropicais. A grande maioria dos casos (80%) corresponde a sistemas de cromossomos sexuais simples, dos quais, 77% são ZZ/ZW e o restante XX/XY. Destes casos, 64% mostram heterogametia feminina e 34% masculina (CENTOFANTE et al., op cit.).

Entre peixes neotropicais podem ser encontrados sistemas de cromossomos sexuais distintos, mesmo entre espécies de uma mesma família, como em Erythrinidae entre os gêneros *Erythrinus* e *Hoplias* (BERTOLLO et al., 1979, 1983, 2004) em Paradontidae (BELLAFRONTI et al., 2009), entre espécies de um mesmo gênero, como em

*Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1984), no caso dos cariomorfos de *Hoplias malabaricus* (BERTOLLO et al., 2000), entre outros.

A hipótese mais aceita para a diversidade de sistemas de cromossomos sexuais em peixes é que estes podem apresentar origens independentes e recorrentes entre diferentes famílias, associadas à separação biogeográfica das grandes bacias hidrográficas brasileiras que aconteceram em épocas diferentes, seguidas por um longo período de isolamento entre elas (BERTOLLO et al., 2000; ARTONI & BERTOLLO, 2002; CENTOFANTE et al., 2003; VICARI et al., 2006, 2008). Assim sendo, diferentes sistemas de cromossomos sexuais, puderam ser fixados de forma independente em cada família, ou nos componentes da mesma família, ou até mesmo de um dado gênero, contribuindo para a especiação.

Dois padrões básicos têm sido postulados para explicar a origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais no grupo dos peixes. O primeiro considera a ocorrência de um processo de eliminação da permuta entre os homólogos durante a meiose, decorrente de rearranjos cromossômicos estruturais (BEÇAK & BEÇAK, 1969). No segundo, a etapa inicial da diferenciação poderia ocorrer mesmo independentemente de rearranjos, a partir da origem e acúmulo de algumas classes de DNA repetitivos em um dos homólogos do par de proto cromossomos sexuais, estando, portanto associada a um processo de heterocromatinização seguido da eliminação da permuta em região adjacente ao bloco de heterocromatina (SINGH et al., 1980).

As regiões de determinação sexual mapeadas em peixes não apresentam genes comuns, implicando que esses genes tenham surgido independentemente (PEICHEL et al., 2004; MATSUDA, 2005). O grau de especialização dos cromossomos é definido com base no nível de diferenciação morfológica, decorrente da especialização funcional. Tipicamente, um sistema sexual é considerado altamente diferenciado quando é observada

grande diferença de tamanho, conteúdo gênico ou quantidade de heterocromatina no par (CHARLESWORTH et al., 2005).

A ocorrência de um sistema simples de determinação sexual originários de um processo de heterocromatina diferencial em um dos cromossomos sexuais é um evento comum entre os peixes (OLIVEIRA et al., 2007). O processo de heterocromatinização, quando observado em um dos cromossomos do par homomórfico na região adjacente as sequências de determinação sexual, úteis a supressão de eventos de recombinação e favorece a evolução independente deste cromossomo e/ou região cromossômica (JOHN, 1988; RICE, 1996; STEINEMANN & STEINEMANN, 1992, 2001).

Ainda, em relação às sequências determinantes do sexo em peixes, foi observado um acúmulo de elementos transponíveis e DNA satélite ao seu redor e a divergência de sequências homólogas (PEICHEL et al., 2004; MATSUDA, 2005). A recombinação é inibida pela presença de inversões (DOBZHANSKY & EPLING, 1948), translocações e possivelmente o acúmulo de heterocromatina (GRIFFIN et al., 2002). Não é claro, no entanto, que a heterocromatinização seja a causa ou a consequência da inibição de recombinação (CHARLESWORTH et al., 1994). Como consequência da inibição de recombinação, ocorre a ampliação da região não-recombinante e perda de conteúdo gênico no cromossomo sexo-específico (Y ou W) (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 2000).

A expansão da região não-recombinante pode ocorrer pelo acúmulo de genes que determinam características sexualmente antagônicas (e.g. coloração nupcial) próximo à região de determinação sexual (ENDLER, 1980). O desenvolvimento de um desequilíbrio de ligação entre estes genes e os genes de determinação sexual é esperado, uma vez que características relacionadas à seleção sexual têm efeito positivo no valor adaptativo de apenas um sexo. A ocorrência e o papel desta associação na ampliação da região não-

recombinante (RICE, 1992) é apontada como um fator central para explicar a proliferação de proto cromossomos sexuais (VAN DOORN & KIRKPATRICK, 2007).

Desta forma, o processo de diferenciação de cromossomos sexuais pode (embora artificialmente) ser dividido em três fases: i) origem de um proto cromossomo sexual e estabelecimento de barreiras localizadas à recombinação; ii) mudança de conteúdo gênico com ampliação de região não-recombinante e, iii) degeneração do cromossomo Y (ou W) (CHARLESWORTH et al., 2005).

#### **1.4 DNAs repetitivos**

Nos genomas eucarióticos, a maior parte dos segmentos de heterocromatina constitutiva contém grandes somas de DNA altamente repetitivos. Além de compor os domínios heterocromáticos, as sequências de DNA repetitivo estão presentes em grande parte do genoma dos eucariotos e também de forma dispersa na eucromatina e são extremamente importantes na estrutura e organização funcional do genoma (SUMNER, 2003).

Diante deste quadro, os DNAs repetitivos são agrupados em duas classes quanto a sua organização. Os DNA repetitivos em tandem, onde a unidade de repetição é arranjada em sucessivas cópias de forma consecutiva nos domínios cromossômicos, como por exemplo, os DNAs mini e microssatélites. Estes podem ser organizados desde unidades de repetição curtas (2 pb) até sequências longas (maiores que 2.000 pb) e podem conter desde algumas poucas repetições até a compor domínios com milhares de unidades repetidas no genoma. A segunda classe é composta pelos elementos repetitivos dispersos. Essas sequências também apresentam milhares de repetições no genoma, no entanto, estão organizadas de forma dispersa pelos cromossomos.

Entre os principais elementos de repetição destas famílias estão os elementos transponíveis e retroelementos (JURKA et al., 2005, 2007). Estes ainda são classificados

como *Short Interspaced Nuclear Elements* (SINE – elementos nucleares curtos e interestaçados), e *Long Interspaced Nuclear Elements* (LINE - elementos nucleares longos e interestaçados) os LTR (*Long Terminal repeat*) e NonLTR (SUMNER, 2003).

O DNA satélite propriamente dito consiste em repetições em tandem de grande complexidade que podem ser visíveis citogeneticamente devido à formação de grandes blocos heterocromáticos que apresentam razão AT/CG distorcida. Frequentemente, estes blocos estão localizados em regiões restritivas à recombinação, como regiões heterocromáticas pericentroméricas (OLIVEIRA & WRIGHT, 1998), podem ainda ocorrer associadas ao DNA r 5S (MARTINS et al., 2006), a regiões próximas ao telômero (SAITO et al., 2007), nos cromossomos sexuais e supra-numerários (REED & PHILLIPS, 1995; MANDRIOLI et al., 2003; ARTONI et al., 2006; PARISE-MALTEMPI et al., 2007).

Historicamente, o DNA satélite foi considerado como não-funcional, relacionado à inatividade transcricional (BERIDZE, 1986). Atualmente, tem sido sugerida sua importância juntamente com proteínas específicas, nos processos da estabilidade da estrutura genômica, efeito de regulação gênica (ex. efeito de posição de variação), pareamento cromossômico e segregação, assim como na investigação de variabilidade e diversidade genética envolvendo aspectos evolutivos (O'CONNELL & WRIGTH, 1997; KURENOVA et al., 1998; MONOD et al., 2002; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009).

Os mecanismos para explicar a origem do DNA satélite tem sido diversos, entre eles estão descritos na literatura a replicação saltatória (BRITTEN & KOHNE, 1966, 1968), o crossing-over desigual (SMITH, 1974) e origem por elementos transponíveis (HEIKKINEN et al., 1995). No entanto, sabe-se atualmente que todos esses eventos acima considerados podem atuar na origem e diversificação de famílias de DNA satélite.

Outra peculiaridade dos DNAs satélites é que estes podem estar organizados em sítios específicos de um par cromossômico; no entanto, na maioria das vezes, estas unidades de repetição evoluem em paralelo (DOVER, 1986), levando a uma homogeneização intra-específica entre as unidades repetitivas (UGARKOVIC & PLOHL, 2002). Esta distribuição cromossômica é, na realidade, um reflexo do modo de evolução em concerto de sequências entre cromossomos não homólogos (PLOHL et al., 1992). Indivíduos de espécies diferentes apresentam divergências nessas sequências, levando à formação de sequências espécie-específica (UGARKOVIC & PLOHL, 2002).

A amplificação e mobilidade de DNA satélite nos cromossomos são documentadas em apenas alguns organismos (HAMILTON et al., 1990; MODI et al., 1993), podendo exercer um papel importante na evolução cariotípica, promovendo ou acelerando a evolução cromossômica (WICHMAN et al., 1991; HAMILTON, 1992; GARAGNA et al., 2001; KANTEK et al., 2009; VICARI et al., 2010). Diante da dinâmica evolutiva extremamente variável dos DNAs satélites estes podem, de fato, prover informações úteis tanto para estudos microevolutivos (no caso de DNAs satélites espécie específicos ou cromossomo específicos) (UGARKOVIC & PLOHL, 2002), como para estudos filogenéticos (onde um DNA satélite é compartilhado por algumas espécies em um determinado grupo) (PONS et al., 2002; PONS & GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009; VICARI et al., 2010). No entanto, famílias de DNA satélite podem, paralelamente, permanecer conservadas ao longo do tempo por terem evolução lenta, mantidas por baixas taxas de mutação, com reflexo na homogeneização das sequências (DE LA HERRÁN et al., 2001).

Em peixes, sequências de DNA satélite cromossomo específico ou região específica do cromossomo podem tornar-se marcadores citogenéticos úteis (SAITO et al., 2007), utilizado algumas vezes para compreender as relações filogenéticas entre diferentes táxons

(DE LA HERRÁN et al., 2001; SAITO et al., 2007), esclarecer a citotaxonomia em complexos de espécies (MANTOVANI et al., 2004; VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009), evidenciar as prováveis origens de cromossomos supranumerários (MESTRINER et al., 2000; ZIEGLER et al., 2003; JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006) e caracterizar cromossomos sexuais (DEVLIN et al., 1988, 2001) ou sugerir prováveis origem destes.

Por sua vez, sequências repetitivas sexo-específicas têm sido isoladas e mapeadas nos cromossomos de algumas espécies de peixes, incluindo *Leporinus elongatus* (NAKAYAMA et al., 1994), *Chionodraco hamatus* (CAPRIGLIONE et al., 1994), *Poecilia reticulata* (NANDA et al., 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (DEVLIN et al., 1991; STEIN et al., 2001), *Hoplias malabaricus* (BORN & BERTOLLO, 2000) entre muitos outros.

Em *Leporinus elongatus* duas famílias de DNA satélite foram isoladas (NAKAYAMA et al., 1994), sendo que uma dessas famílias foi localizada em ambos os cromossomos Z e W, enquanto que a segunda família foi específica para o cromossomo W. Estes dados permitem a construção de um modelo de diferenciação para o cromossomo W que traz importantes mecanismos de determinação do sexo em peixes.

Neste sentido, estudos pormenorizados que busquem auxiliar a compreensão da origem e diversificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Characidium*, bem como, seu modelo de dispersão e isolamento reprodutivo interespecífico e interpopulacional podem ser extremamente úteis para o entendimento da biologia e evolução deste grupo de peixes.

## 2 Justificativa e Objetivos

Na família Crenuchidae, a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW em quase a totalidade dos representantes do gênero *Characidium* estudados propicia um bom modelo para estudos da diversificação dos cromossomos sexuais em peixes. Nesse gênero, os cromossomos Z e W podem variar em forma e tamanho (VICARI et al., 2008). Entre as espécies de *Characidium* já estudadas, *C. gomesi*, *C. alipioi*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. apresentaram sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES, 2010, 2011). Nas espécies *C. gomesi* e *C. alipioi* os sítios de rDNA 45S estão em cromossomos independentes aos sexuais (CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008) enquanto as demais espécies apresentam sítios de RONS nos cromossomos Z e W (NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011), a exceção de uma população de *C. gomesi* que também apresenta rDNA nos sexuais (PANSONATO-ALVES et al., 2011). Considerando que nestas espécies os cromossomos surgiram a partir de um par ancestral homólogo, eventos estruturais tem atuado tanto na diferenciação dos cromossomos Z e W, quanto na dispersão dos rDNA nos genomas das espécies.

Desta forma, este estudo procurou realizar um mapeamento cromossômico comparativo da sonda cromossomo W e do rDNA 18S em diferentes populações de *Characidium*, inter-relacionando a diversificação do genoma, possibilitando inferências sobre a evolução cariotípica no grupo. Assim, foram objetivos deste trabalho:

Geral:

- Analisar a diversificação do cromossomo sexual W em diferentes populações/espécies de *Characidium*.

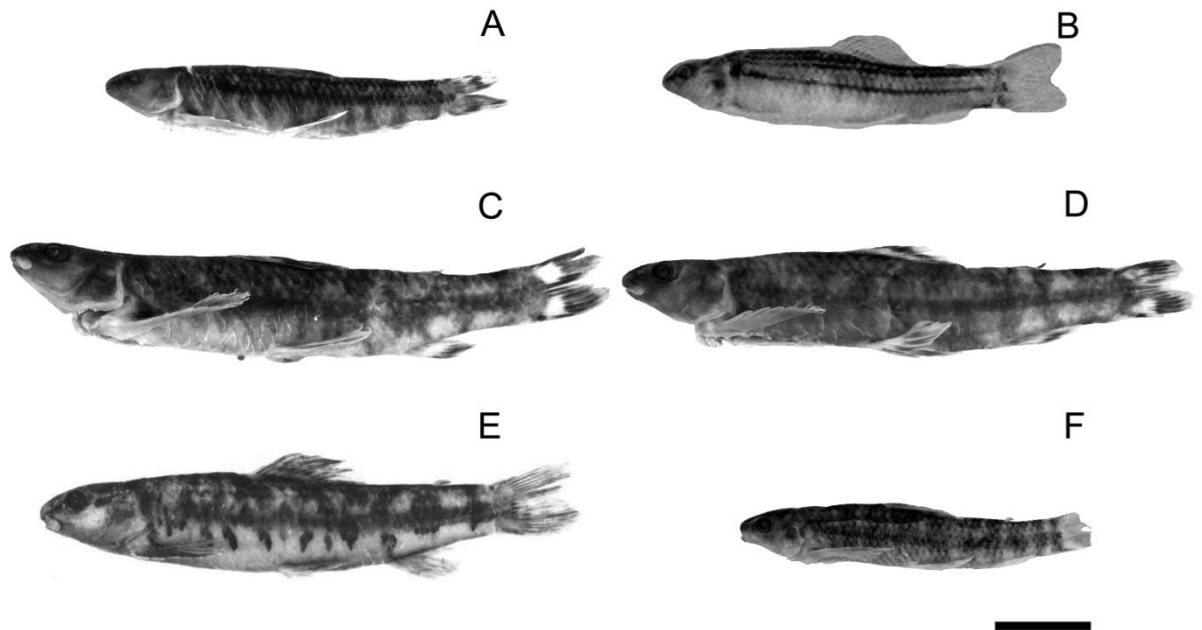
Específicos:

- Realizar um mapeamento comparativo da sonda cromossomo W e do rDNA 18S em diferentes representantes do gênero *Characidium*.
- Realizar uma análise comparativa entre espécies do gênero *Characidium* portadoras e não portadoras de sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW;
- Utilizar os resultados com o intuito de analisar relações evolutivas dentro do gênero *Characidium*;

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Material biológico

Os exemplares (figura 1) foram coletados com, peneiras e foram transportados vivos para o laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual de Ponta Grossa, campus de Uvaranas (PR), onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos.



**Figura I.** Espécies do gênero *Characidium* analisadas neste estudo. Em (A) *Characidium gomesi*, localidade rio Verde (PR) bacia do rio Tibagi; em (B) *Characidium gomesi* população do ribeirão Minhoca (MG) bacia do rio São Francisco; em (C) *Characidium gomesi* fêmea da localidade do rio Grande (SP) bacia do Alto Paraná; em (D) macho de *Characidium gomesi* da localidade do rio Grande (SP) bacia do Alto Paraná; em (E) *C. lauroi* da localidade do ribeirão Grande (SP) bacia do Paraíba do Sul e; (F) *C. zebra* da localidade do rio Passa Cinco (SP) bacia do Alto Paraná. Barra = 10 mm.

### 3.2 Metodologias

As preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas pela técnica de “*air drying*”, conforme descrito por Bertollo et al. (1978) – (Anexo I). O bandamento C seguiu o procedimento descrito por Sumner (1972) – (Anexo II). Foi utilizada a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para mapear as sequências do cromossomo W e do rDNA 18S sobre os cromossomos de *C. gomesi* da população do rio Verde-PR, da população do rio Grande-SP e ribeirão Minhoca-MG; *C. lauroi* da localidade de ribeirão Grande-SP e; *C. zebra* da localidade de Passa Cinco-SP. As sondas foram obtidas e gentilmente cedidas por: sonda cromossomo W de *Characidium gomesi* (VICARI et al., 2010) e; sonda rDNA 18S (HATANAKA & GALETTI, 2004). Os procedimentos de marcação da sonda rDNA 18S foram realizados por reação de *Nick Translation* conforme as orientações dos fabricantes (Anexo V). Os cromossomos W, depois de submetidos ao bandamento C, foram microdissectados conforme descrito por Vicari et al. (2010) (Anexo III). As reações de DOP-PCR para amplificação da sonda cromossomo W seguiram os procedimentos descritos por Telenius et al. (1992), com as adaptações para cromossomos submetidos ao bandamento C (VICARI et al., 2010) – (Anexo IV). O procedimento geral da FISH baseou-se na técnica descrita por Pinkel et al. (1986) – (Anexo VI). Os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e de acordo com a morfologia (LEVAN et al., 1964), obedecendo à regra de razão de braços (Anexo VII).

## **4 Resultados**

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

### Capítulo I

#### **4.1 Diversificação cariotípica, pintura cromossômica e diferenciação dos cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae)**

## **Diversificação cariotípica, pintura cromossômica e diferenciação dos cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae)**

### **Resumo**

Neste estudo, foi obtida uma sonda do cromossomo sexual W de *C. gomesi* por microdissecção cromossômica posterior ao bandamento C, amplificação por DOP-PCR e realização de pintura cromossômica comparativa desta sonda W juntamente com o rDNA 18S em algumas populações/espécies do gênero provenientes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras: *C. gomesi* do rio Verde (PR), *C. gomesi* do rio Grande (SP), *C. gomesi* do ribeirão Minhoca (MG), *C. lauroi* do ribeirão Grande (SP) e *C. zebra* do rio Passa Cinco (SP). A análise convencional das populações de *C. gomesi* do ribeirão Minhoca e rio Verde, ainda não descritas, demonstraram o número diplóide de 50 cromossomos e presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW em estágio avançado de diferenciação. Com a utilização da dupla FISH com sonda W e rDNA 18S nas populações de *C. gomesi*, *C. lauroi* e *C. zebra* foi possível hipotetizar uma via de diferenciação para os cromossomos sexuais neste grupo de peixes neotropicais. A transposição/translocação da região organizadora de nucléolo (RON) para um proto cromossomo sexual deve ter sido um primeiro evento nesta diferenciação. Posteriormente, a heterocromatinização de outros DNAs repetitivos não associados a RON modelaram alterações na morfologia dos cromossomos Z e W. Nas espécies *C. gomesi* e *C. alipioi* onde a heterocromatinização do W é intensa, a RON sofreu nova transposição para autossomos. Ainda, foi discutido o isolamento biogeográfico e a diferenciação dos cromossomos sexuais em *Characidium* como eventos essenciais ao isolamento reprodutivo e especiação no grupo.

**Palavras chave:** Peixes neotropicais, citogenética, diferenciação sexual, citotaxonomia, FISH.

## Introdução

A família Crenuchidae está amplamente distribuída por sistemas de água doce entre a América do Sul e Central, nesta família, o gênero *Characidium* é o mais representativo, incluindo 50 espécies consideradas válidas (BUCKUP, 2003). Embora estas espécies apresentem um número diplóide conservado de 50 cromossomos, com uma predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o gênero *Characidium* apresenta amplas variações interespecíficas e interpopulacionais, como por exemplo: (i) variação intra e interindividual de cromossomos B em *C. gomesi* (citado como *C. fasciatum*), *C. pterostictum*, *C. oiticicai* e *C. gomesi* (MAISTRO et al., 1998; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011); (ii) sistemas de cromossomos sexuais com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW em *C. gomesi*, *C. alipioi*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011); (iii) variações na localização e número de sítios de rDNA em diferentes pares cromossômicos (MAISTRO et al., 1998, 2004; VICARI et al., 2008; PANSONATO-ALVES et al., 2010) e; (iv) ocorrência de triploidia natural em *C. gomesi* (CENTOFANTE et al., 2001).

Relacionado aos cromossomos sexuais, Vicari et al. (2008) consideraram a existência de um proto cromossomo sexual para espécies de *Characidium* e, tanto o cromossomo Z quanto o W tiveram modificações na morfologia, provavelmente devido a mecanismos de duplicações, deleções e/ou inversões em relação à provável condição ancestral. Ainda, neste mesmo estudo consideraram a heterocromatinização do cromossomo W como evento essencial a diferenciação deste sistema em *Characidium*. Posteriormente, Pansonato-Alves et al. (2011) inferiram que a ocorrência de RONS nos cromossomos ZW da maioria das espécies estudadas de *Characidium* poderia remeter a um

estado ancestral, presente no par de proto cromossomos sexuais, anterior ao processo de heterocromatinização.

A ocorrência de um sistema simples de determinação sexual originários de um processo de heterocromatina diferencial em um dos cromossomos sexuais é um evento comum entre peixes (OLIVEIRA et al., 2007). Nesse processo, a etapa inicial da diferenciação poderia ocorrer a partir da origem e acúmulo de algumas classes de DNA repetitivos em um dos homólogos do par de proto cromossomos sexuais. Esta heterocromatinização promove a supressão de eventos de recombinação e favorece a evolução independente deste cromossomo e/ou região cromossômica (JOHN, 1988; RICE, 1996; STEINEMANN & STEINEMANN, 1992, 2001).

Deste modo, realizou-se pintura cromossômica comparativa da sonda cromossomo sexual W de *C. gomesi* juntamente com o rDNA 18S para avaliar a origem, identidade de composição e diferenciação dos cromossomos sexuais em populações de *C. gomesi*, *C. lauroi* e *C. zebra* e, deste modo, inferir sobre a evolução, filogenia e biogeografia do grupo.

## **Material e Métodos**

### *Espécies analisadas e preparações cromossômicas*

Para este estudo foram utilizadas preparações cromossômicas de peixes do gênero *Characidium* de diferentes populações (Tabela II).

As preparações cromossômicas das espécies analisadas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de “air drying” (BERTOLO et al., 1978). As preparações cromossômicas foram submetidas a coloração convencional por Giemsa e Bandamento C (SUMNER, 1972) para a determinação do número diplóide, fórmula

cromossômica, caracterização de cromossomos sexuais e posterior utilização em ensaios de hibridação *in situ* fluorescente.

#### *Sondas cromossômicas*

Essencialmente, foram utilizadas duas sondas para mapeamento destas regiões/cromossomos sobre os cromossomos das espécies de *Characidium*: (1) a sonda do rDNA 18S, isolada a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr., 2004) e; (2) uma sonda do cromossomo W de *Characidium gomesi* (população do ribeirão Minhoca, bacia do rio São Francisco), isolada neste trabalho pelo método de microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C segundo método de Sumner et al. (1972), aqui denominada de sonda W (VICARI et al., 2010).

#### *Microdissecção do cromossomo W de Characidium gomesi e reação de DOP-PCR*

Cromossomos W de *Characidium gomesi* da população do ribeirão Minhoca, bacia do rio São Francisco (MG) foram microdissectados a partir de metáfases submetidas ao bandamento C para a identificação precisa do cromossomo sexual. As microdissecções cromossômicas foram realizadas em microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico (Narishige). Para a microdissecção foram utilizados capilares de vidro de diâmetro de aproximadamente 0,7  $\mu\text{m}$ , os quais foram preparados utilizando o “micropipette puller” (Narishige). Foram microdissectados 16 cromossomos W de *C. gomesi*, os quais foram transferidos para um microtubo e utilizados na reação de “Degenerated Oligonucleotide Primier – Polymerase Chain Reaction” (DOP-PCR). As reações de DOP-PCR seguiram o procedimento geral descrito por Telenius et al. (1992), com algumas modificações (VICARI et al., 2010). A reação de PCR consistiu de 1 x ThermoSequenase reaction buffer, 400  $\mu\text{M}$  de dNTP, 2  $\mu\text{M}$  of DOP primer – 5’

ccgactcgagnnnnnnnatgtgg 3'. O microtubo foi aquecido a 95° C por 10 min, seguido da adição de 10 U de ThermoSequenase. A primeira amplificação foi realizada via RAMP-PCR: 3 min a 94°; 12 ciclos de baixa estringência (1 min e 30 s a 94°C, 2 min a 32°C aumentando 0,2°C/s até 72°C e, 2 min a 72°C), seguidos por 30 ciclos de alta estringência (1 min e 30 s a 94°C, 1 min e 30 s a 52°C e 1 min e 30 s a 72°C). Os produtos obtidos foram checados em gel de agarose 1%. A seguir, foram aliquotados 2 µl do primeiro produto de PCR e realizada uma nova reação de amplificação num volume final de 50 µl (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dNTP, 2 µM DOP primer = 5'-ccgactcgagnnnnnnnatgtgg-3' e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 3 min a 94°; 35 ciclos: 1 min e 30 s a 90°C, 1 min e 30 s a 52°C e 1 min e 30 s a 72°C.

#### *Hibridação in situ fluorescente (FISH)*

Foram realizadas FISH nos representantes do gênero *Characidium* analisados utilizando as sondas do rDNA 18S e do cromossomo W. A sonda rDNA 18S foi marcada com biotina pela técnica de *nick translation*, utilizando o composto biotina 16 - dUTP (Nick Translation Biotin - Roche). A sonda W, por sua vez, foi marcada em reação de DOP-PCR utilizando o nucleotídeo modificado digoxigenina 11-dUTP (Roche). A mistura da PCR consistiu de (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, dGTP e dCTP, 280 µM de dTTP, 120 µM de dUTP 11- digoxigenina, 2 µM DOP primer e 2 U de *Taq* polimerase). O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL sonda, 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato dextrano) seguiu o procedimento geral descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos Avidina FITC (Sigma) e anti digoxigenina rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e

analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subteloicêntricos (st), dependendo da sua razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos cariótipos.

## Resultados

A análise citogenética das cinco populações de *Characidium* mostrou um número diplóide conservado de 50 cromossomos (Tabela III). A análise convencional dos cariótipos das populações de *C. gomesi* do rio Verde-PR e ribeirão Minhoca-MG, aqui descritos pela primeira vez, permitiu evidenciar além do número diplóide, fórmulas cariotípicas diferenciadas para a população do rio Verde-PR (32m+18sm), em machos e (31m+18sm+1st), em fêmeas e, no ribeirão Minhoca, (32m+18sm) tanto em machos quanto em fêmeas (Fig. 2 a, c). As fêmeas de ambas as populações apresentaram um par de cromossomos heteromórficos, correspondentes aos cromossomos sexuais Z e W (Fig. 2 b, d). Em ambas as populações, o cromossomo Z é um metacêntrico de tamanho médio, apresentando uma banda heterocromática proximal no braço longo. Por outro lado, o cromossomo W é subteloicêntrico, totalmente heterocromático e maior em tamanho que o cromossomo Z para a população do rio Verde (Fig. 2c), enquanto na população do ribeirão Minhoca, o cromossomo W se apresenta metacêntrico, totalmente heterocromático e um pouco menor em tamanho que o cromossomo Z (Fig. 2a).

A reação de DOP-PCR a partir dos cromossomos W de *C. gomesi* submetidos ao bandamento C evidenciou um arrasto em gel de agarose entre 100 a 500 pb, com uma intensidade maior na região de 300 pb (Fig. 3a). A utilização da sonda W sobre metáfases de *C. gomesi* do ribeirão Minhoca e rio Verde mostrou alta eficiência com sítios positivos

em regiões terminais de alguns autossomos, na região proximal do braço longo do cromossomo Z, e na totalidade do cromossomo W (Fig. 3b, c).

A dupla FISH com sondas do rDNA 18S e sonda W sobre os cromossomos de *C. gomesi* das regiões estudadas evidenciou as seguintes marcações: *C. gomesi* do rio Verde-PR apresentou seis sítios de rDNA 18S localizados em região terminal no braço longo do par sm 17, sm 22, em um dos homólogos do par sm 20 e no braço curto de um dos homólogos do par 1. A sonda W apresentou alguns autossomos com pequenos sítios terminais marcados, o cromossomo Z com um sítio proximal no braço longo, além do cromossomo W subtelocêntrico totalmente marcado (Fig. 4a). *Characidium gomesi* do ribeirão Minhoca-MG e rio Grande-SP apresentaram marcações similares entre si com apenas o par sm 18 portando rDNA 18S em região terminal do braço longo. A sonda W foi localizada principalmente em região proximal do cromossomo Z e na totalidade do cromossomo W metacêntrico, além de alguns pequenos sítios terminais em autossomos (Fig. 4 b, c, d).

*Characidium lauroi* do ribeirão Grande-SP apresentou o rDNA 18S localizado sobre o par metacêntrico n. 2, considerado par sexual da espécie, o qual apresenta um heteromorfismo de tamanho, onde o cromossomo Z apresentou sítio terminal no braço curto e o W em região terminal do braço longo. A sonda W em *C. lauroi* evidenciou pequenos e dispersos sítios sobre os cromossomos Z e W além de regiões terminais de alguns autossomos (Fig. 4e). Por sua vez, *C. zebra* do rio Passa Cinco-SP, não evidenciou sistema de cromossomos heteromórficos e o rDNA 18S foi localizado na região subterminal do braço longo do par sm 23 e pequenas e dispersas marcas da sonda W sobre os cromossomos do complemento cariotípico (Fig. 4f).

## Discussão

Um grupo de especial interesse em citogenética é a família Crenuchidae por representar um excelente modelo de estudo sobre a diversificação de cromossomos sexuais (VICARI et al., 2008). Em *Characidium* o número diplóide de 50 cromossomos é verificado em todas as espécies do gênero já estudadas e a macroestrutura cariotípica de  $32m + 18 sm$  é a situação mais comumente verificada (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

Os resultados aqui obtidos também demonstram uma alta similaridade cariotípica para as populações de *C. gomesi* do ribeirão Minhoca (MG) e do rio Verde (PR) em relação a outras populações já estudadas desta espécie (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; VICARI et al., 2008; PANSONATO-ALVES et al., 2011). Apesar da aparente conservação do cariótipo, as populações de *C. gomesi* tem se diversificado principalmente pela alteração na estrutura e diversificação dos cromossomos sexuais Z e W e número de sítios de rDNA maior, reforçado pela restrição do fluxo gênico proporcionado pelo isolamento em bacias hidrográficas distintas, como proposto por Vicari et al. (2008).

As primeiras descrições cariotípicas em *Characidium* se reportaram a populações de *C. zebra*, sendo a única entre as dez espécies do gênero estudadas citogeneticamente que não apresenta heteromorfismo de cromossomo sexual (BUCKUP, 1993). De acordo com uma análise morfológica, *C. zebra* apresenta vários caracteres plesiomórficos sendo assim considerado basal na filogenia de *Characidium* (BUCKUP, 1993). Vicari et al. (2008) já consideraram as características cromossômicas presentes em *C. zebra* como possíveis plesiomorfias para o gênero. Dessa forma, alterações nos cariótipos de outras espécies,

quando comparados ao de *C. zebra* poderiam ser explicadas pela ocorrência de rearranjos cromossômicos.

A espécie *C. lauroi* teve seu cariótipo descrito pela primeira vez por Centofante et al. (2003). Neste estudo, os autores propuseram a presença de cromossomos sexuais para *C. alipioi* e não descreveram a ocorrência de cromossomos sexuais em *C. lauroi* devido a inexistência de heterocromatinização diferencial e, no entanto, relataram a ocorrência de um par heteromórfico portador das RONS. Posteriormente, Pansonato-Alves et al. (2010) avaliaram de forma comparativa sete espécies do gênero: *C. zebra*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *Characidium* sp. e *C. schubarti* e concluíram que apenas *C. zebra* não apresentava cromossomos sexuais diferenciados, enquanto todas as demais apresentaram os cromossomos sexuais em diferentes estágios de heterocromatinização do W e, tanto o Z quanto o W portando RONS em regiões terminais.

*Characidium gomesi* é outra espécie do gênero que apresenta cromossomos sexuais sendo o W totalmente heterocromático (MAISTRO et al., 1998; CENTOFANTE et al., 2001). Pansonato-Alves et al. (2011) avaliaram diferentes populações de *C. gomesi* e constataram que uma destas apresentava RONS nos cromossomos sexuais, e todas as demais, apresentaram RONS em pares autossômicos. Entre as espécies de *Characidium* que possuem cromossomos sexuais, somente *C. gomesi* e *C. alipioi* apresentaram as RONS exclusivamente nos autossomos (CENTOFANTE et al., 2003), sugerindo assim ser esta uma condição derivada entre estas espécies (PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011).

A exemplo do que ocorre em outros peixes, como *Hoplias malabaricus* (BORN & BERTOLLO, 2000; CIOFFI et al., 2010); no gênero *Triportheus* (ARTONI & BERTOLLO, 2002) e em Salmonidae (REED & PHILLIPS, 1997), a presença de RONS associadas a heterocromatina localizada sobre os cromossomos sexuais pode ter também facilitado a diferenciação do par sexual heteromórfico em *Characidium*. A heterocromatina

está muitas vezes relacionada à ocorrência de rearranjos cromossômicos em peixes neotropicais envolvendo as RONS e esta porção do genoma tem sido associada à formação de polimorfismos, uma condição prévia a fixação do heteromorfismo sexual cromossômico (para uma revisão ver VICARI et al., 2010).

A obtenção e utilização da sonda cromossomo W de *C. gomesi* em pintura cromossômica comparativa demonstrou que os DNAs repetitivos presentes nos cromossomos sexuais das diferentes populações desta espécie mantêm uma alta identidade e tem proporcionado a diversificação morfológica destes cromossomos. Ainda, com a presença de sítios da sonda W verificada em autossomos, mesmo que de forma dispersa por regiões terminais de todas as populações/espécies analisadas é possível inferir que as unidades repetitivas que compõem e diferenciaram os cromossomos sexuais de *Characidium* estão distribuídas pelo gênero, corroborando assim a hipótese de origem comum para este sistema ZZ/ZW (VICARI et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2011), reforçando o estado monofilético e suscitando hipóteses sobre a série de transformação dos cromossomos sexuais no gênero.

Diante deste cenário, de presença de sítios da sonda W sobre os cromossomos é possível hipotetizar que os cromossomos sexuais de *Characidium* tiveram uma origem comum e podem ter diversificado na seguinte via: (i) a condição ancestral sem a presença de cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados poderia ser representada por *C. zebra*. Neste caso, não há evidências de um par de proto cromossomos sexuais diferenciados, a RON está localizada na região subterminal de um par submetacêntrico pequeno e a sonda W se apresenta dispersa na região terminal de alguns cromossomos. (ii) O segundo passo considera a ocorrência de um processo de eliminação da permuta de segmentos entre os homólogos durante a meiose, decorrente de rearranjos cromossômicos estruturais (BEÇAK & BEÇAK, 1969) ou a partir da origem e acúmulo de algumas classes

de DNA repetitivos em um dos homólogos do par de proto cromossomos sexuais (SINGH et al., 1980). Essa situação poderia estar representada pelo par sexual de *C. lauroi*, considerando que o mecanismo de translocação e/ou transposição da RON para o par metacêntrico número 2 portando sítios da sonda W de forma dispersa e, subsequente geração do heteromorfismo de tamanho observado na espécie poderia ter gerado a restrição a recombinação na meiose. Uma hipótese alternativa para *C. lauroi*, sugere que a origem e diversificação do par sexual teria ocorrido de forma independente às outras espécies (PANSONATO-ALVES et al., 2010), reforçado pela pouca identidade da sonda W ao genoma da espécie, menos parcimonioso visto que os próprios autores atribuem a presença da RON nos proto cromossomos sexuais anterior ao evento de heterocromatinização. (iii) Posteriormente, o evento de heterocromatinização dos cromossomos conduziria a diferenciação dos tipos de cromossomos Z e W existentes por acúmulo das sequências da sonda W, como visualizado em um estágio intermediário em *C. lanei* (NOLETO et al., 2009; VICARI et al., 2010). (iv) Na sequência, com a intensa heterocromatinização do cromossomo W observada em *C. gomesi* e *C. alipioi* é possível inferir que eventos de transposição realocaram os sítios de RONS em um par autossômico submetacêntrico (par 17 ou 18).

Pansonato-Alves et al. (2011) encontraram uma população classificada como *C. gomesi* que apresenta a RON ainda presente nos cromossomos sexuais. Esta é uma forte evidência que a RON pode ter sido transposta para outro par cromossômico, e que esta condição seria seletivamente favorável para escapar da intensa heterocromatinização do W de algumas populações e reforça mais uma vez a origem comum do sistema ZW em *Characidium*.

Mesmo diante de toda a mobilidade da RON pelos genomas de *Characidium*, a grande maioria das espécies analisadas apresentam um único par portador do rDNA maior.

Apenas duas populações de *C. gomesi* do sul do Brasil, uma do córrego Quebra Perna (PR), com dez sítios autossômicos (VICARI et al., 2008) e outra do rio Verde (PR), com seis sítios autossômicos (presente estudo) apresentaram múltiplas localizações destes sítios cromossômicos. Estas são condições claramente derivadas e que representam uma instabilidade pouco frequente nestes peixes.

A história evolutiva e consequentemente diversificação cromossômica de *Characidium* está intimamente associada ao isolamento de populações em cabeceiras de rios de sistemas hidrográficos distintos (CENTOFANTE et al., 2003; VICARI et al., 2008; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011). Segundo Weitzman et al. (1988), os principais rios do sul e sudeste do Brasil estão atualmente separados por barreiras que impedem a dispersão de espécies e populações, o que favorece a ocorrência de eventos que determinam o isolamento dos grupos.

As características topográficas e fisionômicas das regiões amostradas para *Characidium* proporcionam uma ampla gama de ambientes distintos, o que favorece a ocorrência de um grande número de populações, cada uma das quais adaptadas a um subconjunto particular destes ambientes. Assim, da mesma forma que proposto por Buckup (1991) a predominância de cursos d'água relativamente pequenos favorece a ocorrência de espécies de pequeno porte, com limitado potencial de dispersão espacial e tendências de fixação de divergências genéticas interpopulacionais. Dessa forma, as constituições cariotípicas e as diferentes morfologias e composição dos cromossomos sexuais de *Characidium* poderiam ser fixados a partir do ancestral comum nas diferentes espécies/populações, promovendo a diversificação intra e interespecífica, contribuindo para o processo de especiação.

Por fim, a obtenção da sonda W e a pintura cromossômica comparativa juntamente com o rDNA 18S em algumas espécies de *Characidium* propiciou inferir sobre a

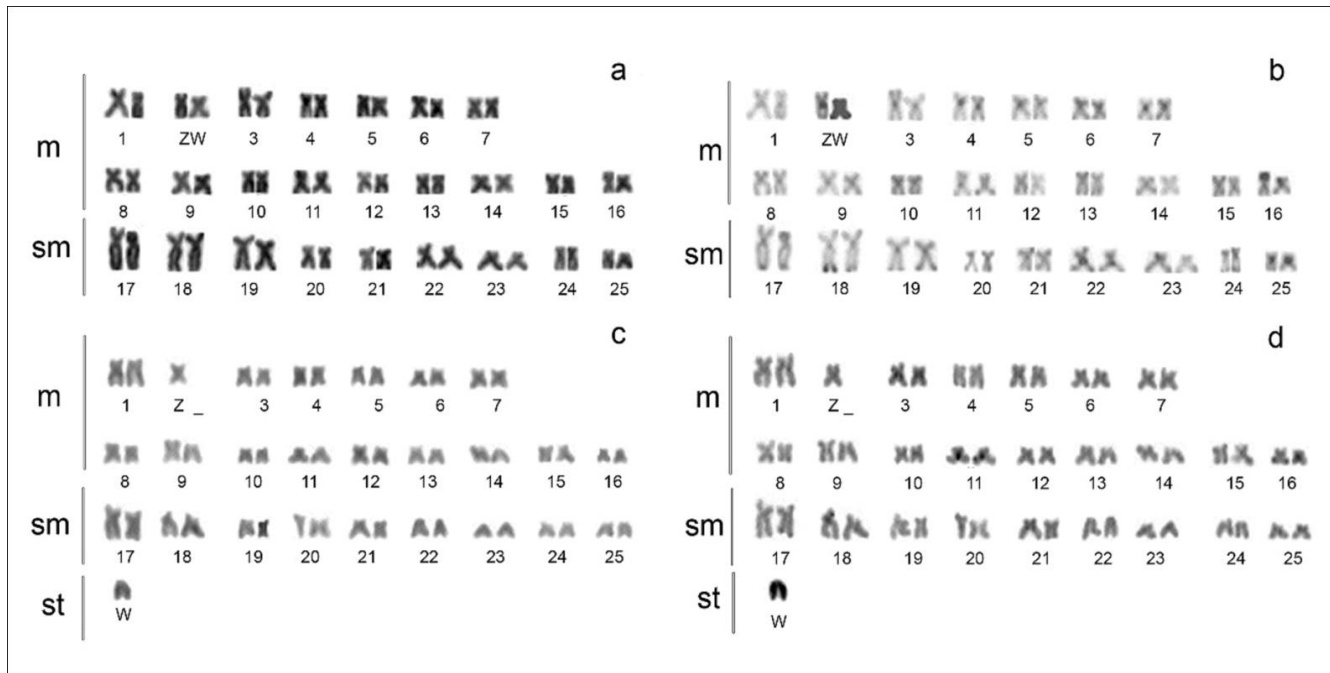
diferenciação dos cromossomos sexuais no grupo e ainda, possibilitou um melhor entendimento das características cromossômicas e biogeográficas do gênero atuando na diferenciação populacional, isolamento reprodutivo e especiação.

### **Agradecimentos**

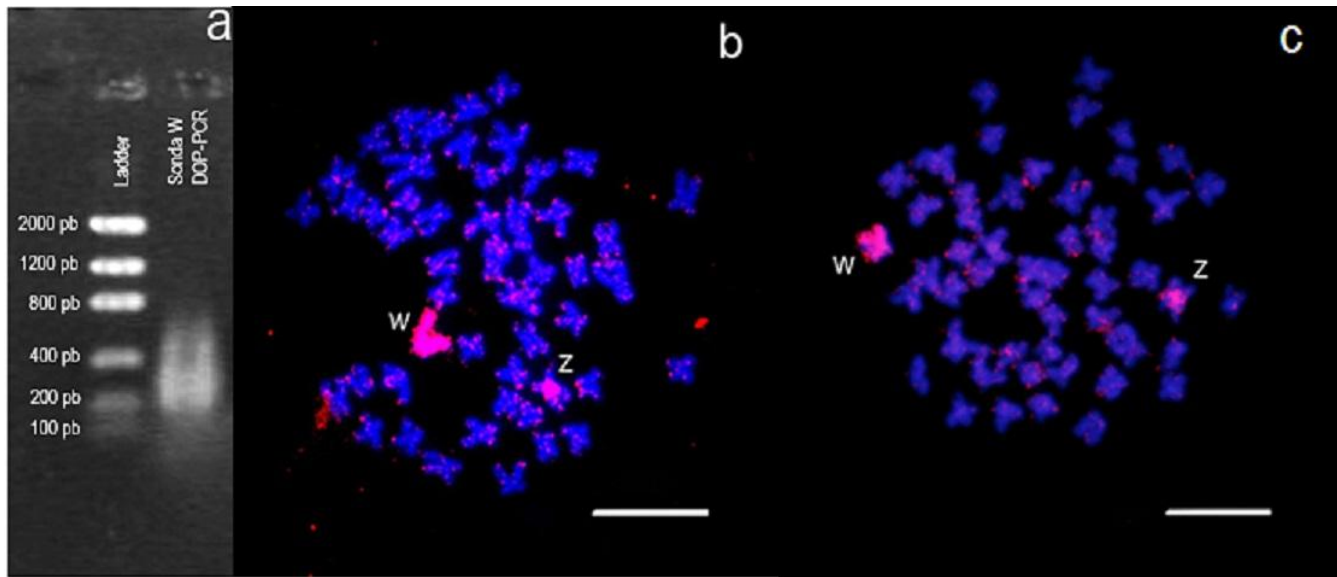
Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Somos gratos também ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela assistência nas atividades de campo e laboratório.

### **Referências Bibliográficas**

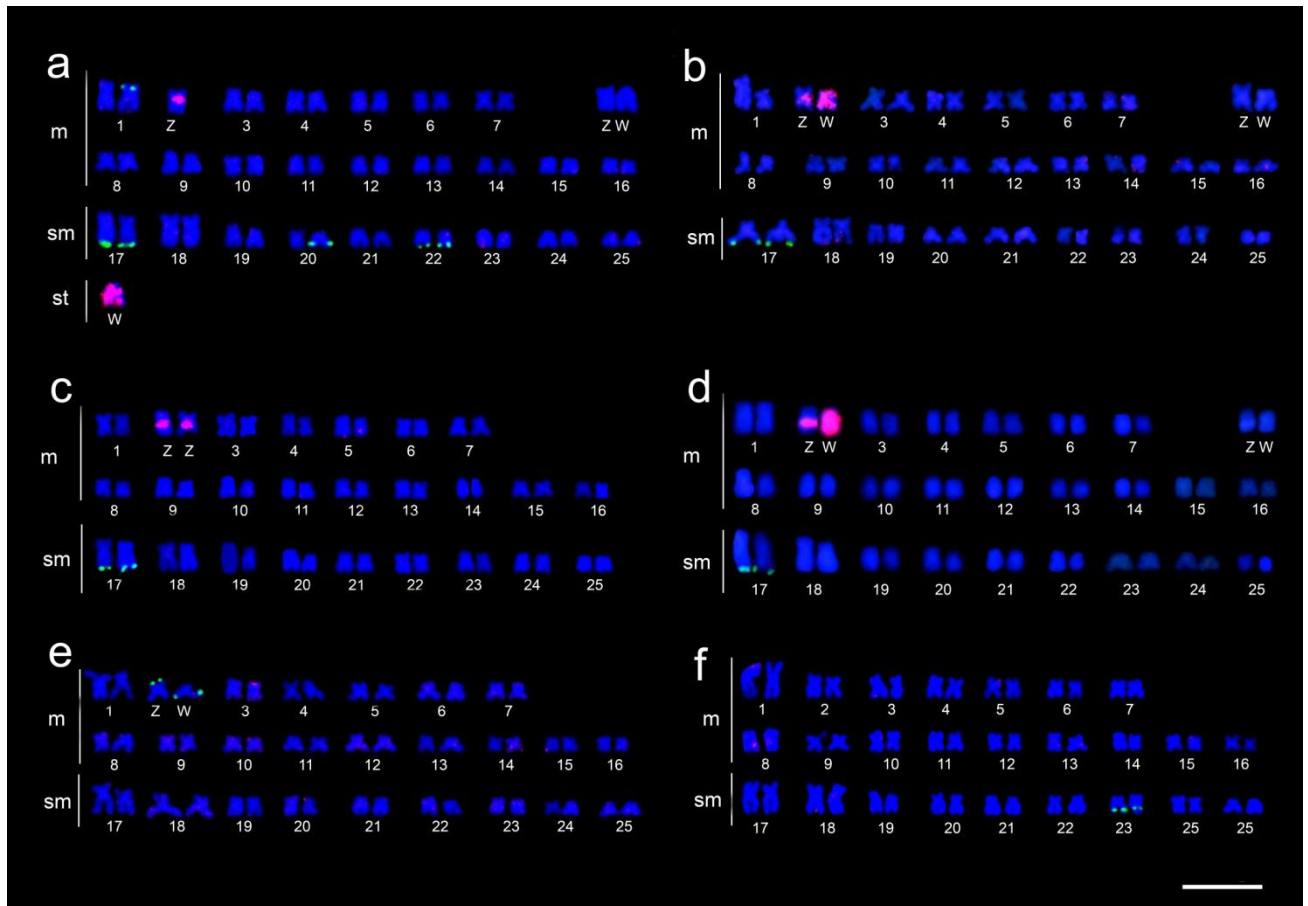
As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.



**Figura II.** Cariótipos de fêmeas de *Characidium gomesi*. Em (a, b) coloração convencional por Giemsa e bandamento C sequencial para a população do ribeirão Minhoca, bacia do rio São Francisco (MG). Em (c, d) coloração convencional por Giemsa e bandamento C sequencial para a população do rio Verde, bacia do rio Tibagi (PR). Barra = 10µm.



**Figura III.** Em (a) gel de agarose 1% evidenciando a amplificação do cromossomo W de *Characidium gomesi* da população do ribeirão Minhoca, MG; (b) metáfase de fêmea de *Characidium gomesi* da população do rio Verde, PR, hibridizada com sonda do cromossomo W e; (c) metáfase de *Characidium gomesi* da população do ribeirão Minhoca, MG, hibridizada com sonda do cromossomo W. Barra = 10 $\mu$ m.



**Figura IV.** Localização dos sítios W e 18S por FISH em *Characidium*. Em (a) cariótipo de fêmea de *Characidium gomesi*, localidade rio Verde (PR); em (b) cariótipo de fêmea de *C. gomesi* localidade de ribeirão Minhoca (MG); (c) cariótipo de macho de *C. gomesi* da localidade de rio Grande (SP); (d) cariótipo de fêmea de *C. gomesi* da localidade de rio Grande; (e) cariótipo de fêmea de *C. lauroi* de ribeirão Grande; (f) cariótipo de fêmea *C. zebra* do rio Passa Cinco (SP). Barra= 10µm.

**Tabela II.** Espécies de *Characidium* estudadas, respectiva localidade, bacia hidrográfica, número de fêmeas (F) e machos (M).

| <i>Espécies</i>               | <i>Localidade</i>        | <i>Bacia<br/>Hidrográfica</i> | <i>F</i> | <i>M</i> | <i>Total</i> |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------|----------|--------------|
| <i>Characidium<br/>gomesi</i> | Rio Verde (PR)           | Rio Tibagi                    | 36       | 8        | 44           |
| <i>Characidium<br/>gomesi</i> | Rio Grande (SP)          | Alto Paraná                   | 7        | 10       | 17           |
| <i>Characidium<br/>gomesi</i> | Ribeirão Minhoca<br>(MG) | São Francisco                 | 5        | 2        | 7            |
| <i>Characidium<br/>lauroi</i> | Ribeirão Grande<br>(SP)  | Paraíba do<br>Sul             | 2        | 3        | 5            |
| <i>Characidium<br/>zebra</i>  | Rio Passa Cinco<br>(SP)  | Alto Paraná                   | 4        | 8        | 12           |

**Tabela III.** Fórmula cromossômica, ocorrência de cromossomos sexuais, sítios sonda W e rDNA 18S nas espécies/populações de *Characidium* analisadas.

| Espécies                  | Local                 | Fórmula Cromossômica         | Sistema Sexual | Sonda W                                                                                                          | Sítios 18s                                                               |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <i>Characidium gomesi</i> | Rio Verde (PR)        | ♂ 32m+18sm<br>♀ 31m+18sm+1st | <b>ZZ/ZW</b>   | Região proximal do braço longo do Z, W st totalmente marcado, além de sítios autossômicos terminais e dispersos. | 6 sítios autossômicos (pares 17 e 22, além de um homólogo do 1 e do 20). |
| <i>Characidium gomesi</i> | Rio Grande (SP)       | ♂ e ♀ 32m+18sm               | <b>ZZ/ZW</b>   | Região proximal do braço longo do Z, W m totalmente marcado, além de sítios autossômicos terminais e dispersos.  | Região terminal do par 18.                                               |
| <i>Characidium gomesi</i> | Ribeirão Minhoca (MG) | ♂ e ♀ 32m+18sm               | <b>ZZ/ZW</b>   | Região proximal do braço longo do Z, W m totalmente marcado, além de sítios autossômicos terminais e dispersos.  | Região terminal do par 18.                                               |
| <i>Characidium lauroi</i> | Ribeirão Grande (SP)  | ♂ 32m+18sm<br>♀ 31m+18sm+1st | <b>ZZ/ZW</b>   | Sítios autossômicos e no W de forma dispersa.                                                                    | Par n. 2 ZW. Braço curto do Z e longo do W.                              |
| <i>Characidium zebra</i>  | Rio Passa Cinco (SP)  | 32m+18sm                     | <b>Ausente</b> | Sítios autossômicos de forma dispersa.                                                                           | Subterminal do par 23                                                    |

## 5 Considerações finais

Resultados de citogenética convencional foram obtidos pela primeira vez para as populações de *C. gomesi* do ribeirão Minhoca, bacia do rio São Francisco (MG) e rio Verde, bacia do rio Tibagi (PR). Ambas as populações mostraram um número diplóide de 50 cromossomos considerado conservado neste gênero (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011). A fórmula cariotípica verificada para a população do ribeirão Minhoca foi de 32m+18sm em machos e fêmeas e de 32m+18sm em machos e 31m+18sm+1st em fêmeas para a população do rio Verde. Além do heteromorfismo de um par cromossômico, a heterocromatinização diferencial de um cromossomo é condizente com a ocorrência de sistema de cromossomos sexuais nesta espécie (MAISTRO et al., 1998, 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008; PANSONATO-ALVES et al., 2011). O cromossomo Z possui tamanho metacêntrico médio, apresentando uma banda heterocromática proximal no braço longo em ambas as populações. Já o cromossomo W é metacêntrico, totalmente heterocromático e um pouco menor em tamanho que o cromossomo Z para a população do ribeirão Minhoca (MG). Na população do rio Verde, o cromossomo W é subtelocêntrico, totalmente heterocromático e um pouco maior em tamanho que o cromossomo Z. Estas evidências reforçam a hipótese de Vicari et al. (2008) que propuseram a diferenciação do par sexual ZW em *Characidium* associado ao isolamento biogeográfico como fonte para mecanismos de isolamento reprodutivo e especiação.

Também neste estudo, foi obtida uma sonda do cromossomo sexual W de *C. gomesi* a partir da microdissecção do W, método descrito em Vicari et al., (2010). A pintura cromossômica com a sonda W de *C. gomesi* evidenciou uma alta eficiência da

sonda para o mapeamento destas regiões sobre os cromossomos das espécies de *Characidium*, especialmente as portadoras de sistemas de cromossomos sexuais. Na sequência, foram realizados mapeamentos da sonda rDNA 18S e sonda cromossomo W em diferentes populações e espécies de *Characidium*. Os resultados obtidos mostraram uma identidade da sonda W sobre os cromossomos de *Characidium* tornando possível hipotetizar a via de diferenciação dos cromossomos sexuais no grupo.

O mapeamento do rDNA 18S demonstrou uma movimentação destes sítios na história evolutiva do gênero *Characidium*. Possivelmente, a condição basal é representada por *C. zebra*, o qual detém os sítios de RONS no par sm 23. Um evento de transposição/translocação poderia ter realocado as RONS em um par semelhante ao n 2 de *Characidium*. Alterações na morfologia dos cromossomos restringiriam a recombinação e originariam um par de cromossomos sexuais semelhante ao encontrado em *C. lauroi*. A partir de então, os cromossomos sexuais sofreriam processos de heterocromatinização e alteração em morfologia nas diferentes populações/espécies do gênero.

A intensa heterocromatização do W observada em *C. gomesi* e *C. alipioi* pode ter proporcionado uma vantagem seletiva ao rearranjo de transposição das RONS novamente para pares autossômicos. Ainda, o grande número de sítios de rDNA maior observado em populações do sul do Brasil, associado a estágio avançado de diferenciação do cromossomo W, pode ser associado a condições de caracteres apomórficos no grupo.

Por fim, a diversificação de *Characidium* é intimamente ligada aos seus habitats, geralmente de cabeceiras de rios, isolados em sistemas hidrográficos distintos. Este isolamento geográfico restringe o fluxo gênico, proporcionando a fixação de rearranjos cromossômicos em populações da espécie. Dessa forma, é possível propor que o isolamento biogeográfico associado a diversificação dos cromossomos sexuais e dos rDNA de *Characidium* tem atuado fortemente no isolamento reprodutivo e especiação do grupo.

## 6 Referências Bibliográficas

ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Complex Sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genetica**, v. 64, p. 165-169, 1984.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, v. 89, p.15-19, 2002.

ARTONI, R. F. et al. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, p. 277-284. 2006.

BEÇAK, W.; BEÇAK, M. L. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpents. **Cytogenetics**, v.8, p. 247-262, 1969.

BELLAFRONTE, E. et al. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**, v.75, p.2313–2325, 2009.

BERIDZE, T. **Satellite DNA**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1986. 149p.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Genética**, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Genética**. v. 2, n. 1, p. 17-37, 1979.

BERTOLLO, L. A. C, TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosome in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v. 48, p. 1-12, 1983.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 153-159. 1986.

BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, n.7, p. 603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. et al. Chromosome evolution in the erythrinidae fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity**, v. 93, p. 228-233, 2004.

BORN G. G.; BERTOLLO, L. A. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with 2n=42 chromosomes. **Genetica**, v. 110, n. 1, p.1-9, 2000.

BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Nucleotide sequence repetition in DNA. **Carnegie Intuitions of Washington Year Book**, v. 65, p. 78-106, 1966.

BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Repeat sequences in DNA. **Science**, v. 161, p. 529-540, 1968.

BUCKUP, P. A. 1991. **The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes**. 1991. 391f. Tese. The Univesity of Michigan, Michigan, 1991.

BUCKUP, P. A. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 108, p. 224-245, 1993.

BUCKUP, P. A.; REIS, R. E. Characidiin genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes) in Southern Brazil, with description of three new species. **Copeia**, v. 3, p. 531-548, 1997.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P. et al (Eds) **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs 2 ed. 1998.

BUCKUP, P. A. Family Crenuchidae (South American Darters). In: REIS, R.; KULLANDER, E. S. O.; FERRARIS Jr. C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. 2003; p 87-95.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Série Livros 23. Rio de Janeiro, RJ. 2007, 195 p.

BUSSIEK, M. et al. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. **Journal of Structural Biology**. v.167, n. 1, p.36 -46, 2009.

CAPRIGLIONE, T. et al. Satellite DNAs heterochromatin and sex chromosomes in *Chianodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). **Polar Biology**. v. 14, p. 285-290, 1994.

CARAGNA, S. et al. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n.1, p. 171-175, 2001.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**. v. 5, n. 3, p. 253-260, 2001.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. A ZZ/ZW sex chromosomes system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 55, n. 2, p. 139-150, 2002.

CENTOFANTE, L. et al. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**. v. 138, n. 3, p. 213-218, 2003.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-20, 1994.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. The degeneration of Y chromosomes Philosophical Transactions of the Royal Society of London: **Biological Sciences**, v. 355, n. 1403, p. 1563-72, 2000.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. & MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-28, 2005.

CIOFFI, M. B. et al. Differentiation of the XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome. **Sexual Development**. v. 4, p. 176-185, 2010.

DE LA HERRÁN, R. et al. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, p. 432–436, 2001.

DEVLIN, R. H.; HOLM, D. G.; GRIGLIATTI, T. A. The influence of whole arm trisomy on gene expression in *Drosophila*. **Genetics**. v. 118. p. 87-101, 1988.

DEVLIN, R. H.; McNEIL, B. K.; DONALDSON, E. M. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**. v.48, n. 9, p. 1606-1612, 1991.

DOBZHANSKY, T. H.; EPLING, C. The suppression of crossing over in inversion Heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 34, p. 137-141, 1948.

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.

ENDLER, J. A. Natural Selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. **Evolution**, v. 34, n. 1, p. 76-91, 1980.

FELDBERG, E. et al. Karyotype evolution in Curimatidae (teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**, v. 36, n. 2, p. 372-376, 1993.

GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v. 47, p. 289-298, 1994.

GALETTI JR., P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375-382, 1995.

GRIFFIN, D. K. et al. Early origins of the X and Y chromosomes: lessons from tilapia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 99, n.1-4, p.157-63, 2002.

HAMILTON, M. J.; HONEYCUTT, R. L.; BAKER, R. J. Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. **Chromosoma**, v. 99, n. 5, p. 321–329. 1990.

HAMILTON, M. J.; HONG, G. H.; WICHMAN, A. Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from in situ hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 60, p. 40–44. 1992.

HATANAKA, T.; GALETTI, Jr. P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

HEIKKINEN, E. et al. The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 4, n. 5, p. 604-614, 1995.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. **Chromosoma**, v. 117, n. 1, p. 77-87, 2008.

JESUS, C. M.; GALETTI, Jr. P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, p. 25-32, 2003.

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

JOHN, B. The biology of heterochromatin. Pp. 1-147. In: Verma, R. S. (Ed.). **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. Cambridge University Press, 301p. 1988.

JURKA, J. et al. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 110, p. 462-467, 2005.

JURKA, J. et al. Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p. 241–259, 2007.

KANTEK, D .L. Z. et al. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. D (Characiformes:Characidae) from the Upper Iguaçu River (PR). **Folia biologica**, v. 21, p. 201–206, 2009.

KURENOVA, E. et al. Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. **Chromosoma**, v. 107, n. 5, p. 311-20, 1998.

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

LUCENA, C. A. S. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Telestei, Ostariophysi, Characiformes). 1993. Tese de Doutorado. 125 f. Universidade de São Paulo: São Paulo, 1993.

LUNDBERG, J. G. African-South American freshwater fish clades and continental drift: Problems with a paradigm. p. 156-199 In: **Biological relationships between Africa and South America** (P. Goldblatt, ed.). Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut.

LUNDBERG, J. G. et al. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 87, p. 26-62, 2000.

MAISTRO, E. L. et al. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica**, v. 104, p. 1-7, 1998.

MAISTRO, E. L. et al. Cytogenetic analysis of A, - Bchromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). **Cytologia**. v. 69, p. 181-186, 2004.

MANDRIOLI, M.; CARLO MACICARDI, G.; MAREC, F. Cytogenetic and molecular characterization of the MDSATI satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) **Chromosome Research**, v.11, n. 1, p. 51-56, 2003.

MARTINS, C. et al. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, n. 1, p. 133-41, 2006.

MATSUDA, M. Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. **Annual Reviews of Genetics**, v. 39, p. 293-307, 2005.

MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p.1–9, 2000.

MICHELLE, J. L.; TAKAHASHI, C. S. Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). **Cytologia**, v. 42, p. 535-537, 1977a.

MICHELLE, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (pisces). **Cytologia**, v. 42, p. 539-546. 1977b.

MIYAZAWA, C. S.; GALETTI JR., P. M. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces:Characiformes, Characidiinae). **Cytologia**. v. 59, p. 73-79, 1994.

MODI, W. S; GALLAGHER, D. S, WOMACK, J. E. Molecular organization and chromosomal location of six highly repeated DNA families in the bovine genome. **Animal Biotechnology**., v. 4, p. 143–161,1993.

MONOD, C.; AULNER, N.; CUVIER, O.; KÄS, E. Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila* satellites. **EMBO Journal**, v. 3, n. 8, p. 747-52, 2002.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Karyotypic studies of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). **Caryologia** v. 38, n. 1, p. 47-55. 1985.

MYERS, G. S. Freshwater fishes and West Indian zoogeography. **Annu. Rep. Smithson. Inst.** p. 339-364, 1938.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 2 ed. Canadá: John Wiley & Sons Inc. 1984. 523p.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed.Canadá: John Wiley & Sons Inc., 2006, 601p.

NOLETO, R. B. et al. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. **Journal of Fish Biology**. v. 75, p. 448-453, 2009.

NAKAYAMA, I. et al. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, p. 31-39, 1994.

NANDA, I. W. et al. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **Journal of the Molecular Evolution**, v. 30, p. 456-462, 1990.

O'CONNEL, M.; WRIGTH, J. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331-363, 1997.

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Research**, v. 6, n. 3, p. 205-11, 1998.

OLIVEIRA, C., F. FORESTI & L. F. ALMEIDA-TOLEDO. 2007. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. Pp. 111-164. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (Eds.). **Fish Cytogenetics**. Enfield, Science Publisher, 502p.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **System Biology**. v.46, n.1, p.75-100, 1997.

PANSONATO-ALVES, J. C. P. et al. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n.1, p. 77-86, 2010.

PANSONATO-ALVES, J. C. P. et al. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**, v. 78, n.1, p. 183-194, 2011.

PARISE-MALTEMPI, P. P. et al. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 3, p. 218-23, 2007.

PEICHEL, C. L. et al. The master sex- determination locus in three spine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. **Current Biology**, v. 14, n. 16, p. 1416-24, 2004.

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

PONS, J.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E. Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. **Chromosome Research**, v.10, n.7, p. 597-606, 2002.

PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v. 313, p. 169–177, 2003.

PLOHL, M. et al. Evidence for random distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. **Genetica Research**, v. 60, p. 7-13, 1992.

REED, K. M.; PHILLIPS, R.B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma**, v. 104, p. 242-251, 1995.

REED, K. M., PHILLIPS, R. B. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. **Chromosoma**, v. 5, p. 221-227, 1997.

RICE, W. R. Sexually antagonistic genes: experimental evidence. **Science** v. 256, n. 5062, p.1436-9, 1992.

RICE, W. R. Evolution of the Y sex chromosome in animals. **Bioscience**, v. 46, p. 331-343, 1996.

SAITO, Y.; EDPALINA, R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, n. 2, p. 157-66, 2007.

SCAVONE, M. D. P., BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLINI, M. M. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios**, v. 80, p. 223-227, 1994.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P. (eds) **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs. 1998.

SCHEEL, J. J. **Fish Chromosome and their evolution. Internal report of denmarks akvarium**. Charlottenlund, Denmark, 22p. 1973.

SILVA, A. R.; MAISTRO, E. L. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado river, Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, p. 459-463, 2006.

SINGH, L., PURDOM, I. F.; JONES, K. W. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. **Chromosoma Research**, v. 79, p. 137-157, 1980.

SMITH, G. P. Unequal crossover and evolution of multigene families. **Quantitative Biology**, v. 38, p. 507-513, 1974.

SOLA, L.; CATAUDELLA, S.; CAPANNA, E. New developments in vertebrate cytotaxonomy III. Karyology of bony fishes: A review. **Genetica**, v. 54, p. 285-328, 1981.

STEIN, J.; PHILLIPS, R. B.; DEVLIN, R. H. Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenetics and Cells Genetics**, v. 92, p. 108-110, 2001.

STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 7591-7595, 1992.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Biased distribution of repetitive elements: a landmark for neo-Y chromosome evolution in *Drosophila miranda*. **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 93, p. 228-233, 2001.

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

SUMNER, A. T. **Chromosomes**: organization and function. Malden, Blackwell Publishing, 2003.

TELENIUS, H. et al. Degenerate oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v.13, p. 718-725, 1992.

TOLEDO, V.; FERRARI, I. Estudo citogenético em três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Científica**, v. 4, p. 101-106. 1976.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955-5959, 2002.

UJ, A. Etude comparative de l'osteologie cranienne des poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. 1990. Dissertation, Univ. Geneve, Geneve, Switzerland. 1990.

VAN DOORN, G. S.; KIRKPATRICK, M. Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 909-12, 2007.

VARI, R. P. The Neotropical fish familiy Ctenoluriidae (Teleostei:Ostariophysi: Characiformes): Supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. **Smithson. Contrib. Zool.** v. 564, p.1-97, 1995.

VARI, R. P. 1998. Higher level phylogenetic concepts within Characiforms (Ostariophysi), a historical review. Pp.111-122. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 603p.

VICARI, M. R. et al. Cytogenetics and biogeography: considerations about yhe natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguacu river. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.2, p.297-303, 2006.

VICARI, M. R. et al. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**. v. 134, p. 311-317, 2008.

VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 2010.

WEITZMAN, S. H.; FINK, W. L. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiformes. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. v. 150, p. 339-395, 1983.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei, Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in Eastern and Southeastern Brazil. Pp. 379-427. In: VANZOLINI, P. E.; HEYER, W. R. (Eds.). **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, 488p.

WICHMAN, H. A. et al. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Heredity**, v. 82, p. 369–377, 1991.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K. et al. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**. v. 11, p. 23–25, 2003.

## 7 Anexos

### *Anexo I: Obtenção dos cromossomos mitóticos*

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizado o procedimento descrito por Bertollo et al. (1978). Foi injetado intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025 %, na proporção de 1 ml/100 g de peso. Os peixes então foram mantidos em aquário bem aerado durante 50-60 minutos, posteriormente foram anestesiados com benzocaína diluída a 0,01% e sacrificados. A porção do rim anterior foi retirada e dissociada com uma seringa desprovida de agulha em cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M). O tecido dissociado foi incubado em estufa a 37°C durante 25-30 minutos, que depois foi re-suspendido com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de centrífuga. Foi adicionado neste tubo algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), o material foi novamente ressuspendido repetidas vezes, foi centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm e depois foi descartado o sobrenadante. Após a centrifugação foi adicionado 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspendido e centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm, este passo foi repetido mais uma vez. Foi então descartado o sobrenadante e adicionado uma quantidade de fixador para que se obtivesse uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml), re-suspendido e adicionado em freezer para posterior utilização. Para confecção de lâminas foi pingado de 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. A lâmina estava limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorresse e permitisse que o material ficasse aderido sobre a lâmina. O material foi então deixado secar ao ar e corado com solução de Giemsa a 5 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

***Anexo II: Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG***

O procedimento seguiu o protocolo de Sumner (1972). As lâminas contendo o material celular foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Elas então foram incubadas a 28°C em solução de Bário ( $\text{Ba (OH)}_2$ ) durante 1 a 2 minutos. Depois as lâminas foram submersas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavadas com água destilada. O material foi então imerso em solução salina 2x SSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavado em água destilada e secado ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 2 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

**Anexo III: Microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C (VICARI et al., 2010)**

Os cromossomos W de *Characidium gomesi* (bacia do São Francisco, MG) depois de submetidos ao bandamento C foram microdissectados em microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico Transferman (Eppendorf). A microdissecção foi realizada com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 µm. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo. Um total de 16 cromossomos W com bandamento C extremamente visível e contrastante foram microdissectados. Estes cromossomos foram então transferidos para um microtubo e utilizados na reação de “Degenerated Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction” (DOP-PCR).

**Anexo IV: Iniciador oligonucleotídeo degenerado – reação em cadeia da polimerase  
(DOP-PCR)**

A reação DOP-PCR seguiu o procedimento descrito por Telenius et al. (1992) com adaptações (VICARI et al., 2010). A reação de polimerização consistiu de tampão 1x (*ThermoSequenase* - GE healthcare), 400  $\mu$ M de dNTP, 2  $\mu$ M do primer DOP– 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG - 3'. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler Gradient System (Biosystems R). O microtubo foi aquecido a 95°C por 10 minutos, seguido da adição de 10 U de *ThermoSequenase*. A primeira amplificação foi realizada via RAMP-PCR: 3 minutos a 94°C; 12 ciclos de baixa estrigência (1 minuto e 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 32°C aumentando 0,2°C/s até 72°C e 2 minutos a 72°C), seguidos por 30 ciclos de alta estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C). Os produtos obtidos foram corridos em gel de agarose 1 %, onde o tamanho esperado foi corresponde a um arrasto entre 100 – 500 pb.

A segunda reação de amplificação foi feita com 100 ng do primeiro produto de PCR realizando-se uma nova reação de amplificação num volume final de 50  $\mu$ l. A reação foi composta de tampão (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl) 1X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2 mM  $MgCl_2$ ; 400 mM de dNTP, 2mM de primer DOP = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de *Taq* DNAPolimerase. As reações de polimerização foram constituídas por: 3min a 94°C; 35 ciclos de 1 min. e 30 s a 90°C, 1min. e 30 s a 52°C e 1 min. e 30 s a 72°C.

***Anexo V: Marcação de sondas por nick translation***

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante (Roche). Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x ml água qsp; x ml sonda (equivalente a 1mg); 4 mL mix de nick translation; completar para o volume total de 20 ml; colocar em banho Maria a 15° C por 1 hora e 30 minutos; interromper com 1 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0; aquecer por 10 minutos a 65° C.

**Anexo VI: Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel et al., 1986)****A. MARCAÇÃO DAS SONDAS**

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 14 - dATP (Bionick Labeling System - Invitrogen) ou digoxigenina 11 dUTP (Dig Nick Translation, Roche) e também por PCR utilizando concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 14 dATP - Invitrogen ou digoxigenina 11 dUTP - Roche). O produto desta reação foi precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, foi descartado o sobrenadante, deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

**B. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS**

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, tratadas com solução de RNase (100  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 1 hora, em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$ , lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x /  $\text{MgCl}_2$  50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a  $70^{\circ}\text{C}$ , por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

### **C. HIBRIDAÇÃO E DETECÇÃO DOS SINAIS CORRESPONDENTES**

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida, lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão NFDM a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda, foram colocados sobre as lâminas 90 µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/µl, permanecendo por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (**Fluka**).

**Anexo VII: Análise dos resultados**

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), e subtelocêntricos (st), e acrocêntricos (a) dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos. Os sinais de FISH foram visualizados de acordo com PINKEL et al. (1986) e analisados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX50). As imagens dos cromossomos foram capturadas usando o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).