

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

CONTRIBUIÇÃO CITOGENÉTICA À ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE EM *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE)

**RUBENS PAZZA
SÃO CARLOS – SP, 2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**CONTRIBUIÇÃO CITOGENÉTICA À ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE EM
Astyanax fasciatus (PISCES, CHARACIDAE)**

RUBENS PAZZA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo

**SÃO CARLOS – SP
2005**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

P348cc

Pazza, Rubens.

Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em
Astyanax fasciatus (Pisces, Characidae) / Rubens Pazza. --
São Carlos : UFSCar, 2005.

98 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2005.

1. Citogenética. 2. Mogi-Guaçu, Rio (MG e SP). 3.
Marcador molecular. 4. *Astyanax fasciatus*. 5. Variabilidade
genética. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

“Em seu encontro com a Natureza, a ciência invariavelmente provoca um sentimento de reverência e admiração. O próprio ato de compreender é uma celebração da união, da incorporação, ainda que numa escala muito modesta, à magnificência do Cosmos. E ao longo do tempo o desenvolvimento cumulativo do conhecimento em todo o mundo converte a ciência em algo que é quase uma metainteligência, capaz de ultrapassar as fronteiras das nações e das gerações.”

Carl Sagan

Este trabalho não poderia ser dedicado a ninguém
menos que minha companheira, ajudante, colega,
amiga, colaboradora, namorada, noiva, esposa,
amante, Karine Frehner Kavalco.

*“Quero estar aqui sempre junto a ti, quero ser aquilo tudo que alguém deve ser para alguém
que se ama tanto assim” (Paulo Ricardo, RPM)*

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais esta etapa, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram e auxiliaram a sua realização:

- Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução e ao Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos, à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela estrutura e auxílios que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

- Ao CEPTA, Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais, pela permissão para as coletas em Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP.

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, pela confiança e pelas contribuições sempre perspicazes na elaboração dos trabalhos. Pelo apoio e presteza nos momentos difíceis e por compartilhar os momentos de alegria. Enfim, pela amizade.

- Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pela sugestão do tema para o projeto.

- Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr., exemplo de dedicação e aprimoramento.

- À Dra. Terumi Hatanaka, à Profa. Dra. Maria Luiza Schwantes e ao prof. Dr. Gilberto Moraes pelas contribuições ao primeiro capítulo durante meu exame de qualificação.

- À coordenação do programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (na pessoa do Dr. Flávio H. Silva) do qual participei por dois anos como representante discente. À Rosemeire, à Regiane e à Tatiane, secretárias do programa, sempre presentes e prestativas.

- Aos professores Dr. Alberto Prioli e Dra. Sônia Prioli, pela amizade, pela acolhida em seu laboratório e pelo auxílio com os marcadores moleculares.

- Ao Dr. Paulo Buckup e MSc. Filipe Melo pela contribuição na identificação dos exemplares de *Astyanax*.

- À profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo, pela acolhida em seu laboratório e pelas oportunidades oferecidas.

- À Dra. Flora Maria de Campos Fernandes, pelas sugestões em relação aos marcadores moleculares.

- Aos técnicos Luiz (Piau) e Sr. Nelson (*in memoriam*) pelo auxílio nas coletas e pelos momentos de descontração. Ao corintiano copeiro Jorge pelo delicioso café de todo dia!

- Aos colegas do Laboratório de Citogenética da UFSCar: Ana Karina, Eloísa, Patrícia, Terumi, Célia, Priscila, Alexandra, Marcelo, Celeste, Débora, Wellington,

Elisangela, Fábio. Aos saudosos amigos Alexandre, Mercival, Daniele, Marc, Paulo, Marilena, Vítor, Carol e Marilza.

- Aos colegas do Laboratório de Genética de Peixes do Nupélia (UEM): Vanessa, Alessandra, Tiago, Leia, Renata, Talge, Fabrício e Tatiana.

- Aos colegas do Laboratório de Ictiogenética da USP: Fátima, Cinthia, Carlos, Daniela, Soraia, Sabrina, Mirian, Felipe e Vânia.

- Aos grandes amigos virtuais (vários já amigos reais): Carlos Bella, Luís Fabris, Maykon Camargo, Fábio (Victor Pax), Gabriel dCF, Eliane Evanovich, Juan Cisneros, Luís Brudna, Pierre, Danniell, Daniel (Voodoo), Alexandre (Alenonimo), Leonardo, Robson, Leandro, Alexandre Salles, Elton, Partiti, Edson Kunde, Freddy, Juliana, Ricieri Jr., Emerson, José Roberto, Stéfano, Hendrik e Ana.

- Aos meus amigos de longa data: Adriano, Cassiano, Ricardo, Cezar, Leonardo.

- Ao Filipe, Cris e Letícia, pela acolhida no Rio de Janeiro durante o depósito dos exemplares no Museu Nacional do Rio de Janeiro.

- Aos amigos distantes, vistos normalmente apenas em congressos (sempre com muita alegria e descontração): José Alves Gomes, Rodrigo Torres, Luciana Borin, Sônia Mizoguchi, Anderson Alves, Emanuel (Mané), Rita, pessoal de Natal (RN), Ligia Tchaicka, Cláudio Oliveira, Sônia e Alberto Prioli, Horácio e Márcia.

- À família de minha esposa: Sr. Sydney e Sra. Magli, Tatiana e Sydney e Dona Nory.

- À minha família: Itamar, Telma, Rafael e Janaína.

- Ao prof. Dr. Vladimir P. Margarido, por me apresentar à Citogenética de Peixes.

- À prof. Dra. Onildes M. Taschetto, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fundamental no início de minha jornada, sempre me apoiando e me direcionando para a carreira científica.

- Ao prof. Dr. Horácio F. Júlio Jr., pela amizade e pelo apoio, além da primorosa orientação durante meu mestrado.

- À Karine, minha esposa, pelo apoio e ajuda que tornaram tudo isso realidade.

- Aos doutores membros da banca que estão avaliando esta tese.

- E a todos que, porventura, eu tenha esquecido neste momento, mas que certamente merecem meus agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Resumo	x
Abstract	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Variabilidade cariotípica	1
1.2 Os peixes como material de estudos cariotípicos	4
1.3 A espécie <i>Astyanax fasciatus</i>	9
1.4 Marcadores moleculares de DNA	13
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Espécie estudada e locais de coleta	21
3.2 Preparação de cromossomos mitóticos	21
3.2.1 Técnica de suspensão celular (Bertollo <i>et al.</i> , 1978)	22
3.2.2 Técnica alternativa (Gold <i>et al.</i> , 1990)	23
3.3 AgRONS: Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos através da impregnação por nitrato de prata utilizando microondas (Kavalco e Pazza, 2004)	23
3.4 Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972)	24
3.5 Coloração cromossômica com fluorocromo Cromomicina A ₃ (Schmid, 1980)	24
3.6 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (Pinkel <i>et al.</i> , 1986; Hamkalo & Elgin, 1991; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2002)	25
3.6.1 Sondas	25
3.6.2 Preparação das lâminas	26
3.6.3 Tratamento com RNase	26
3.6.4 Pós-fixação	26

3.6.5	Pré-hibridação	27
3.6.6	Solução de hibridação	27
3.6.7	Hibridação da Sonda	27
3.6.8	Lavagens	28
3.6.9	Detecção do sinal	28
3.6.10	Montagem das lâminas	29
3.7	Extração de DNA (Aljanabi & Martinez, 1997)	29
3.8	Reações de amplificação e eletroforese	30
3.8.1	Reações de amplificação de RAPD	30
3.8.2	Reações de amplificação de ISSR.....	31
3.9	Análises dos dados	31
4	RESULTADOS.....	33
	Capítulo I - Polimorfismo cromossômico em <i>Astyanax fasciatus</i> (Teleostei, Characidae). 1 – Análises cariotípicas, Ag-RONs e mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S em citótipos simpátricos e suas possíveis formas híbridas.	34
	Capítulo II - Polimorfismo cromossômico em <i>Astyanax fasciatus</i> (Teleostei, Characidae). 2 – Distribuição da heterocromatina constitutiva e DNA satélite.....	48
	Capítulo III - Polimorfismo cromossômico em <i>Astyanax fasciatus</i> (Teleostei, Characidae). 3 – Análises de marcadores moleculares RAPD e ISSR.	62
5	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	77
6	ANEXOS	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Mapa evidenciando a distribuição dos citótipos já descritos para <i>Astyanax fasciatus</i>	18
Figura 2.1	Exemplar de <i>Astyanax fasciatus</i> com 120 mm de comprimento padrão.....	33
Figura 2.2	Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando os locais de coleta e principais rios da bacia do Alto rio Paraná. a) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP; 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Paraná; 3) rio Grande; 4) rio Tietê.....	33
Figura 2.3	Locais de coletas. (a e b) Cachoeira de Emas, Pirassununga-SP; (c) Ouro Fino-MG; e (d) Barrinha-SP.....	33
Figura 3.1	- Cariótipos de <i>Astyanax fasciatus</i> . a) citótipo padrão A: $2n = 48$; b) citótipo padrão B: $2n = 46$; c) variante 1: $2n = 46$; d) variante 2: $2n = 45$; e-h) variantes 3-6: todos com $2n = 47$, mas com distintos cariótipos. M = metacêntricos, SM = submetacêntricos, ST = subtelocêntricos, A = acrocêntricos. Barra = $5\mu\text{m}$	47
Figura 3.2	Idiogramas representativos dos citótipos padrão $2n=48$ (a) e $2n=46$ cromossomos (b), evidenciando os sítios do gene ribossômico 5S (bandas nos cromossomos) e 18S (círculos cheios).....	48
Figura 3.3	Cromossomos portadores dos genes ribossômicos, homeólogos em todos os citótipos. a) Ag-RON; b) FISH 18S; c) FISH 5S.....	48
Figura 3.4	Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando a frequência dos números cromossômicos nos respectivos pontos de coleta. A) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP.....	48
Figura 3.5	Metáfases dos citótipos padrão de <i>Astyanax fasciatus</i> . (a) citótipo $2n=46$ e (b) citótipo $2n=48$ após tratamento com cromomicina A_3 , destacando as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC. (c) citótipo $2n=48$ e (d) citótipo $2n=46$, evidenciando blocos heterocromáticos conspícuos na região telomérica de vários cromossomos.....	60

Figura 3.6	Citótipos padrão de <i>Astyanax fasciatus</i> (a) $2n=48$ e (b) $2n=46$, evidenciando os cromossomos portadores de DNA satélite As-51, após hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	61
Figura 3.7	Cariótipos variantes de <i>Astyanax fasciatus</i> evidenciando os cromossomos portadores de DNA satélite As-51, após hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH). (a) variante 1 : $2n=46$; (b) variante 2 : $2n=45$; (c) variante 3 : $2n=47$; (d) variante 4 : $2n=47$; (e) variante 5 : $2n=47$	62
Figura 3.8	Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando a frequência dos números cromossômicos nos respectivos pontos de coleta. A) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP. 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Tietê; 3) rio Grande; 4) rio Paraná.....	75
Figura 3.9	a) Dendrograma neighbor-joining, construído a partir da matriz de complementos (1-S) do coeficiente de similaridade de Nei e Li, obtida com marcadores RAPD. b) Dendrograma de máxima parcimônia, construído a partir da matriz de dados RAPD. Valores de bootstrap com 1.000 re-amostragens. B = Barrinha; CE = Cachoeira de Emas; OF = Ouro Fino; $2n=46$ e $2n=48$: citótipos padrão; $2n=45$, $2n=46v$, $2n=47$: formas cariotípicas variantes.....	76
Figura 3.10	a) Dendrograma neighbor-joining, construído a partir da matriz de complementos (1-S) do coeficiente de similaridade de Nei e Li, obtida com marcadores ISSR. b) Dendrograma de máxima parcimônia, construído a partir da matriz de dados ISSR. Valores de bootstrap com 1.000 re-amostragens. B = Barrinha; CE = Cachoeira de Emas; OF = Ouro Fino; $2n=46$ e $2n=48$: citótipos padrão; $2n=45$, $2n=46v$, $2n=47$: formas cariotípicas variantes.....	77

RESUMO

Astyanax fasciatus caracteriza-se como uma “espécie” diversificada do ponto de vista citogenético. A ocorrência simpátrica e sintópica de diferentes citótipos corrobora a hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma denominação comum. Neste trabalho foram examinados exemplares provenientes de três pontos de coleta, ao longo do rio Mogi-Guaçu, no Sudeste do Brasil: (1) próximo à sua cabeceira (Ouro Fino – MG), (2) no trecho médio do rio (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP, caracterizado pela ocorrência de uma barragem) e (3) próximo à sua foz no rio Pardo (Barrinha – SP). Foram detectados dois tipos de cariótipos com cromossomos perfeitamente pareáveis, denominados citótipos padrão, um com $2n=46$ e outro com $2n=48$ cromossomos. O citótipo $2n = 48$ foi encontrado em todos os pontos de coleta, enquanto o citótipo $2n = 46$ foi encontrado somente em Barrinha e Cachoeira de Emas. Nesta última localidade o citótipo $2n=46$ foi predominante, mas ocorrendo também formas cariotípicas variantes com $2n=45$ e 47 cromossomos, além de um variante estrutural $2n=46$. Um variante $2n=47$ cromossomos foi também encontrado em Ouro Fino. As Ag-RONs e os sítios de rDNA 18S e 5S mostraram uma distribuição conservada entre os citótipos, assim como heterocromatina constitutiva, localizada preferencialmente na região terminal do braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos e na região terminal do braço curto de um par submetacêntrico. Esta última região mostrou-se também GC rica, após coloração com cromomicina A_3 , e corresponde à localização de uma região organizadora de nucléolo. Foram detectados sítios do DNA satélite As51 na região terminal do braço longo de vários cromossomos, distribuídos em 4 pares submetacêntricos, em 3 pares subtelocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo padrão $2n=46$, e em 3 pares submetacêntricos, em 4 pares subtelocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo padrão $2n=48$. As formas cariotípicas variantes apresentaram também outros cromossomos portadores desse DNA satélite, destacando-se um cromossomo metacêntrico grande com um sítio terminal no braço longo (em dois cariótipos variantes), dois pares subtelocêntricos com um sítio intersticial extra (em um dos cariótipos variantes), e um par submetacêntrico com um sítio subterminal no braço longo (em um dos cariótipos variantes). Dados de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) mostraram-se pouco informativos quanto à análise da diversidade encontrada, indicando altos valores de migrantes por geração entre os citótipos. Dados de ISSR, “Inter-Simple Sequence Repeats”, por outro lado, mostraram uma pequena estruturação, principalmente entre os dois citótipos padrão provenientes de Barrinha, onde o Nm foi de

0,4301, com identidade genética de 0,6862 e distância genética de 0,3765. Os valores de distância genética (0,3219) e de identidade genética (0,7248) entre os citótipos $2n=48$ de Barrinha e Ouro Fino também evidenciam uma certa diferenciação entre os mesmos, indicando que a barragem de Cachoeira de Emas provavelmente seja um obstáculo ao livre fluxo entre populações situadas à jusante e à montante da mesma. Os resultados gerais obtidos com os marcadores moleculares não descartam a possibilidade de intercruzamentos entre os citótipos de *A. fasciatus*, como fonte da diversidade encontrada. É levantada a hipótese que o citótipo padrão $2n=48$ seja a forma residente do rio Mogi-Guaçu, sendo o citótipo $2n=46$ uma forma invasora, com divergência recente. Embora os cariótipos variantes apresentem uma estrutura cariotípica mais similar ao citótipo $2n=46$, há evidências de que cromossomos característicos do citótipo $2n=48$ tenham sido neles incorporados, sugerindo que tais variantes sejam decorrentes de intercruzamentos viáveis entre os dois citótipos padrão e/ou seus descendentes, os quais ainda compartilham uma série de homologia, como evidenciado na análise dos marcadores cromossômicos. A presença de um maior número de sítios As-51 em alguns variantes reforça, de certa forma, a sua origem por intercruzamentos. Os sítios As-51, que se mostraram específicos para algumas formas variantes, poderiam ser decorrentes de rearranjos cromossômicos complementares, propiciando novas localizações desse DNA satélite nos cariótipos.

ABSTRACT

Astyanax fasciatus is characterized as a cytogenetically diverse species. Sympatric and syntopic occurrence of distinct cytotypes corroborates the hypothesis that *A. fasciatus* might represent a species complex sharing a common denomination. In this work, specimens from three collection sites along Mogi-Guaçu River, on Southeastern Brazil, were examined: (1) close to headwaters (Ouro Fino – MG), (2) in the mean river portion (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP, characterized by the presence of a dam) and (3) close to river mouth at Pardo river (Barrinha – SP). Two karyotypes bearing perfectly paired chromosomes, named standard cytotypes, were identified; one of them with $2n=46$ and another one with $2n=48$ chromosomes. The cytotype $2n = 48$ was found in all collection sites, whereas the cytotype $2n = 46$ was restricted to Barrinha and Cachoeira de Emas. In this latter locality, the cytotype $2n=46$ was predominant, but variant karyotypical forms were also reported, bearing $2n=45$ and 47 chromosomes, besides a structural variant with $2n=46$. A variant with $2n=47$ chromosomes was also found in Ouro Fino. The Ag-NORs and 18S and 5S rDNA sites showed a conserved distribution among cytotypes, as well as the constitutive heterochromatin, preferentially located at terminal region on the long arms of submetacentric, subtelocentric and acrocentric chromosomes and terminal region on short arms of a submetacentric pair. This latter region showed to be GC-rich after chromomycin A_3 staining and it corresponds to the location of a Nucleolar Organizer Region. Sites bearing the satellite DNA As51 were detected at terminal region on the long arms of several chromosomes, distributed over 4 submetacentric pairs, 3 subtelocentric pairs and one acrocentric pair in the standard cytotype $2n=46$, and over 3 submetacentric pairs, 4 subtelocentric pairs and one acrocentric pair in the standard cytotype $2n=48$. The variant karyotypical forms also presented other chromosomes bearing such satellite DNA, remarkably at a large metacentric chromosome bearing a terminal site on the long arms (found in two variant karyotypes), two subtelocentric pairs bearing additional interstitial site (found in one variant karyotype), and one submetacentric pair bearing a subterminal site on the long arms (found in one variant karyotype). Data based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) were poorly informative to analyze the reported diversity, indicating a high number of migrants per generation among cytotypes. On the other hand, data from ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) showed a low structuring, mainly between two standard cytotypes from Barrinha, where a Nm value of 0,4301 was observed, with a genetic identity of 0,6862 and genetic distance of 0,3765. The values of genetic distance (0,3219) and genetic identity (0,7248) between cytotypes with $2n=48$ from

Barrinha and Ouro Fino also evidenced a slight differentiation, indicating that the dam at Cachoeiras de Emas is probably a barrier to gene flow among populations located upstream and downstream the dam. The obtained results with molecular markers do not discard the possibility of inbreeding among the cytotypes of *A. fasciatus*, as a source of the diversity found. Hypothetically, the standard cytotype with $2n=48$ might be the resident form at Mogi-Guaçu River, while the cytotype with $2n=46$ would represent an invasive form, showing recent divergence. Although the variant karyotypes present a karyotypical structure similar to the cytotype with $2n=46$, there are evidences that chromosomes typical from the cytotype with $2n=48$ have been incorporated, suggesting that such variants may be derived from viable crossings among standard cytotypes, and/or their offsprings, which share some homologies, as demonstrated by chromosomal markers. The presence of a higher number of As-51 sites in some variants reinforces their inbreeding origin. The As-51 sites, which showed to be specific for some variant forms, might be originated by complementary chromosomal rearrangements, propitious to new locations of this satellite DNA on karyotypes.

*“Se não podemos pensar por nós mesmos, se não
estamos dispostos a questionar a autoridade,
somos apenas massa de manobra nas mãos
daqueles que detêm o poder.”*
Carl Sagan



Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Variabilidade cariotípica

Nos primórdios dos estudos citológicos o número cromossômico das espécies não parecia ter alguma importância evolutiva (White, 1954). Morgan, Bridges e Sturtevant (1925, *apud* White, 1954) afirmaram que as comparações entre os cariótipos de diferentes espécies tinham pouco significado, pois o importante não era a forma e tamanho dos cromossomos, mas sim, os genes que eles continham. Estudos posteriores demonstraram a importância dos estudos cromossômicos, primeiramente na observação citológica de sítios de recombinação (na verificação de quiasmas durante a meiose) e, mais tarde, na observação de mudanças evolutivas nos cariótipos causadas por mudanças estruturais envolvendo quebras e fusões (White, *opus cit.*). Em humanos, o estudo das alterações cromossômicas relacionadas a doenças representa o campo de maior interesse. Por outro lado, em animais o interesse em estudos cromossômicos normalmente reside nas relações evolutivas, filogenéticas e taxonômicas, bem como na produção animal e conservação.

Em geral, toda espécie animal e vegetal tem um complemento cromossômico característico, o cariótipo, que pode ser considerado como a maneira em que o DNA nuclear daquela espécie está fracionado em cromossomos (White, 1977). Uma vez que diversas espécies podem compartilhar características primárias como número cromossômico e fórmula cariotípica, a busca de marcadores cromossômicos cada vez mais aprimorados é de suma importância nas análises comparativas, bem como no estudo da organização genômica das espécies. Dentre os marcadores cromossômicos mais amplamente utilizados estão os bandamentos C, G, Q, R, Ag-RON, enzimas de restrição, além da localização de seqüências específicas no genoma, através da Hibridação Fluorescente *in situ*.

White (1977) indica algumas exceções em relação ao cariótipo de uma espécie como complemento cromossômico característico. Estas são as diferenças de cariótipo entre os dois sexos; diferenças de cariótipos entre as linhagens somática e a germinativa; diferenças de cariótipo entre os indivíduos de uma população, devido a um polimorfismo equilibrado; variação geográfica do cariótipo dentro de uma espécie (raças cromossômicas); ocorrência de indivíduos com cariótipos anormais em uma população, sendo esta anormalidade apresentada em todas as células ou serem mosaicos por possuírem dois ou mais tipos de células com cariótipos diferentes.

As variações cromossômicas não programadas podem ser desvantajosas, neutras ou vantajosas para o indivíduo. As desvantajosas são eliminadas da população, enquanto as neutras ou vantajosas permanecem, contribuindo para a variação cariotípica natural das espécies (Guerra, 1988).

Entre os animais, inúmeros casos de variações cariotípicas em populações naturais já foram registrados, envolvendo diferentes tipos de rearranjos. *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), por exemplo, é uma espécie de roedor de nossa fauna que se destaca por uma grande diversidade cariotípica. Fusões cêntricas e inversões pericêntricas envolvendo dois pares de autossomos, inversões pericêntricas em outros 3 pares cromossômicos, trissomia no par 7 e presença de duas fêmeas X0 parecem ser os eventos responsáveis pelos 28 diferentes cariótipos presentes nessa espécie, em regiões da Mata Atlântica dos Estados de São Paulo e Bahia, Brasil (Fagundes *et al.*, 1998). Polimorfismos Robertsonianos parecem ser os responsáveis por diversos casos de variação cariotípica numérica, como em *Crocidura attenuata* (Mammalia, Insectivora) do sul da China, onde o número fundamental $NF=54$ permanece constante, com variações do número diplóide entre 35 e 38 cromossomos (Motokawa *et al.*, 2001). Este é também o caso de *Oryzomys subflavus*

(Rodentia, Cricetidae), com variações no número diplóide de 50, 49, 48 e 46 cromossomos (Maia e Hulak, 1981).

As variações cromossômicas determinantes de raças cromossômicas por vezes podem estar associadas a características morfológicas, bioquímicas e genéticas. Um exemplo interessante é o do musaranho *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae), com cerca de 65 raças cromossômicas onde a raça “Valais” passou recentemente por uma reavaliação taxonômica, sendo elevado ao status de espécie, *Sorex antinorii* (Brunner *et al.*, 2002).

Um polimorfismo estável ocasionado por uma zona de hibridação de populações parapátricas de duas raças cromossômicas de uma espécie de tuco-tuco (Rodentia) pode ser observada no Sudeste do Brasil (Gava e Freitas, 2002). Neste caso, 7 sítios polimórficos foram detectados e em outros 15 sítios os números diplóides estavam fixados em 46 ou 48 cromossomos.

Entre os peixes também são conhecidos casos de variações cromossômicas em populações naturais, onde fissões e fusões cêntricas, inversões e presença de cromossomos supranumerários parecem ser os eventos mais freqüentes, seguidos por alguns casos de poliploidia.

1.2 – Os peixes como material de estudos cariotípicos

Os peixes representam um grupo de vertebrados bastante grande e diversificado. Segundo Nelson (1994), são cerca de 24.600 espécies. Este número equivale aproximadamente ao número de espécies conhecidas de todos os demais vertebrados.

A ordem Characiformes apresenta 10 famílias com cerca de 237 gêneros e pelo menos 1343 espécies. Destas, cerca de 208 são africanas e o restante do Sudoeste dos Estados Unidos, do México e das Américas Central e do Sul (Nelson, 1994). Dentro desta ordem

encontra-se a família Characidae, a maior e mais complexa dentre as demais, compreendendo cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros (Britski *et al.*, 1988).

Segundo Lucena (1993), as relações de parentesco entre Characidae e as demais famílias de Characiformes têm sido muito prejudicadas devido às dúvidas quanto ao monofiletismo da família, ocasionado pelo grande número de espécies incluídas nesta, e pela imensa variedade de formas por ela suportada, dificultando, assim, proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro da mesma.

O gênero *Astyanax* compreende os peixes popularmente chamados de lambaris ou piabas. Em recente revisão foram listadas cerca de 90 espécies válidas, as quais encontram-se *insertae sedis* dentro da família Characidae (Reis *et al.*, 2003). Este gênero tem como principais características nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de 3 vezes ou menos no comprimento padrão e escamas de tamanho normal cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1988).

Os estudos citogenéticos têm fornecido contribuições importantes à taxonomia deste grupo tão diversificado de vertebrados, caracterizando desde grupos de peixes com cariótipos relativamente conservados, como no caso das famílias Curimatidae (Venere e Galetti Jr, 1989; Feldberg *et al.*, 1992 e 1993; Navarrete e Julio Jr, 1997), e Anostomidae (Galetti Jr *et al.*, 1981 e 1984; Martins e Galetti Jr, 1998), até grupos apresentando grandes variações cromossômicas inter e intrapopulacionais, como no caso do gênero *Hoplias* (Erythrinidae), mais especificamente no grupo “*malabaricus*”, cujos estudos em diversas populações evidenciam pelo menos 7 citótipos distintos (Bertollo *et al.*, 2000), sendo encontrados até 3 destes em condições de simpatria e sintopia sem qualquer caso de hibridismo (Pazza e Júlio Jr, 2003).

Uma outra espécie de Erythrinidae, *Hoplerythrinus unitaeniatus* mostrou-se polimórfica em uma população amazônica, coletada no rio Negro (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988). Quatro citótipos distintos foram detectados, todos eles com 48 cromossomos, mas com variações na morfologia cromossômica, onde inversões pericêntricas parecem estar implicadas nesse polimorfismo (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988). Esta mesma população apresentou também uma fêmea portando 72 cromossomos, sendo decorrente de uma triploidia natural (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990). O número diplóide de 48 cromossomos para *Hoplerythrinus unitaeniatus* com fórmula cariotípica caracterizada por 48 cromossomos do tipo meta-submetacêntrico foi também detectado em outras populações da América do Sul (Corrientes – Argentina, Miranda e Porto Velho – Brasil), enquanto exemplares do Suriname apresentaram $2n = 48$ cromossomos, sendo 46 M-SM e 2 ST-A (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001). Os mesmos autores, entretanto, encontraram um distinto citótipo para esta espécie coletada no Parque Estadual do rio Doce (Brasil), apresentando $2n = 52$ cromossomos (46 M-SM e 6 A). A sugestão dos autores é que o citótipo de $2n = 52$ cromossomos seja uma condição ancestral para este grupo de peixes. Adicionalmente, variações intrapopulacionais e intra-indivuais também já foram identificadas nesta espécie (Diniz, 2003).

Rearranjos Robertsonianos estão frequentemente associados a populações polimórficas de salmonídeos, como na truta Arco-íris (*Salmo gairdneri*), onde ocorrem números diplóides de 59, 60, 61, 62 e 63 cromossomos, não variando o número fundamental de 104 (Hartley e Horne, 1982).

Thode *et al.* (1988) encontraram uma variação no número diplóide de *Gobius fallax* (Perciformes) de $2n = 38 - 43$ cromossomos, onde o número de cromossomos de dois braços decresce com o aumento do número de cromossomos de um braço, mantendo o número fundamental, sendo também um caso típico de rearranjos Robertsonianos. De acordo com as evidências disponíveis, o cariótipo ancestral desse grupo deveria apresentar 48

cromossomos acrocêntricos. Os autores encontraram ainda, em algumas células de alguns indivíduos analisados, um pequeno cromossomo de dois braços. As análises mitóticas e meióticas permitiram sugerir que polimorfismos herdados, tanto quanto de origem somática, estariam implicados nos rearranjos encontrados, sendo que algumas translocações podem envolver mais que dois pares de acrocêntricos simultaneamente (Thode *et al.*, 1988).

Um outro exemplo interessante de variabilidade cariotípica ocorre em *Apareiodon affinis* (Parodontidae). Jorge e Moreira-Filho (2000) detectaram 10 citótipos para essa espécie ao longo da bacia do baixo rio Paraná, todos eles com $2n = 54$ cromossomos, diferindo na fórmula cariotípica. É sugerido que inversões pericêntricas em cromossomos de dois braços, dando origem a cromossomos com um único braço e alterando o número fundamental, foram os eventos responsáveis por essa variação. Por outro lado, o grande número de citótipos distintos pode ser também fruto de intercruzamentos entre indivíduos polimórficos, dando origem às diferentes combinações cromossômicas constatadas (Jorge e Moreira-Filho, 2000).

Polimorfismos intra-individuais, embora em menor número, são também detectados entre os peixes. Fatores como não-disjunção meiótica/mitótica, presença de cromossomos B e produtos de translocações Robertsonianas podem estar envolvidos nestes casos. Borin e Martins-Santos (2000) identificaram um indivíduo de *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) coletado no rio Iguaçu – PR (Brasil) com um polimorfismo intra-individual. Além das células normais, com $2n = 54$ cromossomos (40M + 12SM + 2ST), células com 55 e 56 cromossomos também foram encontradas. O polimorfismo foi atribuído a uma não-disjunção pós-zigótica seguido de uma fissão cêntrica, originando um indivíduo mosaico.

Um outro caso de mosaicismo neste mesmo gênero foi relatado por Torres *et al.* (2002), para a espécie *T. paolence* coletado no Estado de São Paulo (Brasil). Neste caso,

além das células normais contendo 54 cromossomos, outros 4 conjuntos foram caracterizados, sendo $2n = 55$ (54 mais um cromossomo subtelocêntrico pequeno), $2n = 56$ (54 mais um cromossomo subtelocêntrico e um microcromossomo) e $2n = 57$ (54 mais um par de cromossomos subtelocêntrico e um microcromossomo). Os autores sugerem que tal variação pode ser resultante de não-disjunção somática, caracterizando uma aneuploidia pós-zigótica. Em relação aos microcromossomos, é sugerido que tenham surgido a partir de quebras ocorridas em alguns pares do cariótipo. O fato de que sejam provavelmente fragmentos acêntricos de cromatina explica a sua não ocorrência na totalidade das células (Torres *et al.*, 2002).

Entre os Characidae, a espécie *Astyanax scabripinnis* tem se mostrado extremamente variável do ponto de vista citogenético, apresentando uma grande diversidade cromossômica. Moreira-Filho *et al.* (1978) descreveram um número diplóide de 50 cromossomos em *Astyanax scabripinnis paranae* coletados no Ribeirão dos Bicudos (Brotas – SP). Desde então, diversos estudos têm demonstrado a presença de várias formas de cromossomos supranumerários neste grupo (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1992 e 1994a; Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993; Fauaz *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 1996; Porto-Foresti *et al.*, 1997; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Néó *et al.*, 2000a, 2000b; Mestriner *et al.*, 2000), casos de triploidia natural (Dias *et al.*, 1992; Fauaz *et al.*, 1994 e Maistro *et al.*, 1994b), além de variações no número cromossômico e/ou variações nas formas cromossômicas (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Maistro, 1991; Souza e Moreira-Filho, 1995; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a; entre outros). Dados citogenéticos associados a estudos morfológicos utilizando a análise de variáveis canônicas claramente demonstraram que na realidade *A. scabripinnis* trata-se de um complexo de espécies isoladas nas cabeceiras de pequenos tributários de grandes sistemas hidrográficos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a).

Igualmente entre os Siluriformes, como em *Callichtys callichtys* (Callichthyidae) ocorrem exemplos da necessidade de revisões taxonômicas decorrentes de resultados citogenéticos (Venere e Galetti Jr, 1986; Oliveira *et al.*, 1988a; Porto e Feldberg, 1993; Sanches e Fenocchio, 1996; Kavalco e Margarido, 2000), assim como é verificado na família Sternopygidae (Almeida-Toledo, 1978; Foresti *et al.*, 1981).

Bertollo *et al.* (1986) ressaltam como contribuições concretas da citogenética para a taxonomia uma boa caracterização cromossômica das espécies, a evidência cariotípica para as suas relações evolutivas, o suporte adicional para a identificação de espécies taxonomicamente problemáticas e a reunião de evidências sobre possíveis casos de espécies crípticas.

White (1978) afirma que, em regra, não se pode esperar que os rearranjos cromossômicos se estabeleçam nas populações quando reduzem significativamente a fertilidade dos indivíduos heterozigotos. Quatro fatores podem, separadamente ou em combinação, levar à fixação de um novo variante cromossômico: deriva genética, direcionamento meiótico, vantagem seletiva do novo homocariótipo e intercruzamentos (White, 1978). Com uma análise algébrica, Hedrick (1981) afirmou que quatro situações constituem importantes mecanismos do ponto de vista teórico: direcionamento meiótico somente; direcionamento meiótico em combinação com deriva genética; intercruzamentos em combinação com vantagem seletiva do novo homocariótipo; e intercruzamentos em combinação com deriva genética. Os efeitos dos rearranjos sobre o “fitness” do heterozigoto híbrido parecem variar de acordo com o grupo de organismos, parecendo ter mais efeitos sobre plantas que animais (Rieseberg, 2001). Desta forma, muitos estudos sobre diversidade e polimorfismos cromossômicos em populações naturais ainda se fazem necessários, para a melhor compreensão destes na evolução cariotípica bem como na evolução orgânica de uma espécie.

1.3 - A espécie *Astyanax fasciatus*

Dados citogenéticos sobre *A. fasciatus* concentram-se principalmente em resumos de congressos científicos e dissertações de mestrado, havendo poucos artigos publicados sobre a espécie (Tabela 1). De maneira geral, as populações já analisadas caracterizam-se por um cariótipo variável, com números diplóides compreendidos entre $2n = 45$ e $2n = 48$ cromossomos. Variações na morfologia dos cromossomos foram evidenciadas quando analisadas diferentes populações com um mesmo número diplóide, além da ocorrência de formas cariotípicas variantes.

Jim e Toledo (1975) analisaram exemplares do rio Meia Ponte, na região de Goiânia (GO), e observaram um número diplóide de $2n = 46$ cromossomos, sendo 28 cromossomos submetacêntricos (SM) e 18 cromossomos acrocêntricos (A).

Morelli *et al.* (1983) observaram em exemplares coletados na cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu (região de Pirassununga – SP), um número diplóide de 46 cromossomos, sendo 14 cromossomos metacêntricos (M), 20 cromossomos submetacêntricos (SM), 10 cromossomos subtlocêntricos (ST) e 2 cromossomos acrocêntricos (A). Os mesmos autores, em exemplares coletados na lagoa Pontal da Volta, no rio Juquiá (próximo a Registro – SP), obtiveram um número diplóide de 48 cromossomos, sendo 10 M, 24 SM, 12 ST e 2 A.

Na mesma região do rio Mogi-Guaçu, Paganelli (1990) determinou um cariótipo um pouco diferente, sendo $2n = 46$ cromossomos compostos por 12 M, 20 SM, 10 ST e 4 A. Este mesmo resultado foi obtido por Daniel-Silva (1996), entretanto, além deste citótipo a autora obteve também 3 outros citótipos que denominou de variantes. Um deles apresentou uma variação provavelmente decorrente de uma inversão paracêntrica denotada pela diferença na localização de uma banda-C positiva em um dos homólogos de um par de cromossomos subtlocêntricos. Um outro exemplar apresentou um número diplóide de 45 cromossomos, cujo bandamento por enzimas de restrição demonstrou um rearranjo no qual a

fusão de um cromossomo acrocêntrico com um cromossomo submetacêntrico deu origem a um cromossomo metacêntrico grande. O outro citótipo variante encontrado em 3 exemplares mostrou um número diplóide de 47 cromossomos, onde houve a presença de um cromossomo submetacêntrico extra.

Justi (1993) analisou *A. fasciatus* do rio Paraibuna (Bacia dos rios costeiros), rio Piracicaba (Bacia do rio Tietê), córrego da Porta e rio São Francisco (Bacia do rio São Francisco). Os exemplares do rio Paraibuna mostraram um número diplóide de 48 cromossomos, sendo 8 M, 18 SM, 12 ST e 10 A; já os exemplares do rio Piracicaba mostraram um número diplóide de 46 cromossomos, sendo 12 M, 20 SM, 10 ST e 4 A; para a Bacia do rio São Francisco dois citótipos foram definidos: $2n = 48$ cromossomos para o córrego da Porta (8 M, 10 SM, 24 ST e 6 A) e $2n = 46$ cromossomos para a calha do rio São Francisco (6 M, 24 SM, 8 ST e 8 A). O cariótipo $2n = 48$ cromossomos também foi observado em espécimes da Represa de Furnas - MG, no rio Sapucaí (Swerts *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos por Heras (1998) aumentam ainda mais a variabilidade cariotípica encontrada em *A. fasciatus*. Um número diplóide de 48 cromossomos foi verificado em exemplares coletados no ribeirão do Paiol Grande, Bacia do rio Paraná (região de São Bento do Sapucaí – SP); no rio Paraibuna, Bacia do Leste (Paraibuna – SP); córrego da Porta, Bacia do rio São Francisco (Três Marias – MG); e também na região de Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu. Nesta região foi verificado mais 3 citótipos além deste. Dois deles apresentando $2n = 46$ cromossomos com uma pequena variação na fórmula cariotípica, e um outro apresentando $2n = 47$ cromossomos, onde aparece um cromossomo submetacêntrico grande sem par. Outros locais de coleta apresentaram número diplóide de 46 cromossomos, com pequenas variações na fórmula cariotípica: rio Passa-Cinco (Ipeúna – SP); rio Jacaré-Guaçu (Araraquara – SP); e córrego da Barra Funda (São José do Rio Preto – SP) todos pertencentes à bacia do Alto Paraná.

Um cromossomo B metacêntrico grande, totalmente heterocromático, foi descrito por Moreira-Filho *et al.* (2001) em exemplares coletados no rio São Francisco.

Desta forma, dois citótipos principais parecem ocorrer no grupo *A. fasciatus*, sem considerar pequenas variações na fórmula cariotípica que poderiam ser devidas a problemas de classificação cromossômica: $2n = 46$ cromossomos e $2n = 48$ cromossomos, cada um deles apresentando variantes específicos. Um fato interessante decorre da observação do tamanho do primeiro par de cromossomos metacêntricos em relação aos demais. Para a família Characidae, parece ser uma característica importante o fato do primeiro par de cromossomos metacêntricos ser relativamente maior que o segundo par do complemento (Scheel, 1973; Morelli *et al.*, 1983; Portela *et al.*, 1988; Daniel-Silva, 2001; entre outros). Este fato é facilmente observado em *A. fasciatus* com citótipo $2n = 48$. No citótipo $2n = 46$, entretanto, esta ocorrência não é tão marcante, sendo que o tamanho dos cromossomos decresce de maneira mais gradual. Este fato foi também observado por Guimarães *et al.* (1995) em 3 espécies da subfamília Glandulocaudinae (Characidae), e por Portela *et al.* (1988) para 3 espécies da subfamília Tetragonopterinae (*Tetragonopterus chalceus*, *Piabina argentea* e *Bryconamericus stramineus*). Esta observação permite diferenciar os citótipos variantes $2n = 45$ e $2n = 47$ do rio Mogi-Guaçu (Daniel-Silva, 1996), como sendo variantes do citótipo $2n = 46$. Por sua vez, o citótipo variante $2n = 47$ nesse mesmo rio (Heras, 1998) já parece derivar do citótipo $2n = 48$ cromossomos. Entretanto, nos cariótipos mostrados por Justi (1993) pode-se ver claramente uma exceção a esse fato nos exemplares coletados na calha principal do rio São Francisco, onde o citótipo $2n = 46$ apresentou o primeiro par de cromossomos metacêntrico bem maior que os demais cromossomos do complemento, assim como nos espécimes coletados no rio Juquiá (Morelli *et al.*, 1983), onde o citótipo $2n = 48$ não apresenta o primeiro par bem diferenciado em relação aos demais.

Particularmente no que se refere à região de Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu, o cariótipo padrão $2n = 46$ cromossomos tem sido o mais representativo, com seus variantes $2n = 45$ e $2n = 47$ cromossomos pouco freqüentes. Em adição, o cariótipo padrão $2n = 48$ cromossomos pode ser também eventualmente encontrado, com um possível variante $2n = 47$ cromossomos. Provavelmente este seja um local de contenção de diferentes populações migratórias, que ali convergem em determinadas épocas do ano, ficando retidas pela barragem da Cachoeira de Emas.

Em relação ao padrão de bandamento, pouco foi realizado em *A. fasciatus*. Os dados referentes à banda-C sugerem poucas marcações pericentroméricas em vários cromossomos, com blocos teloméricos mais fortes na maioria deles, geralmente associados às Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), que se mostram múltiplas, variando de 1 a 10 cromossomos marcados pelo nitrato de prata.

A digestão por enzimas de restrição e a incorporação de BrdU permitiu um padrão de bandas que possibilitou um pareamento mais específico dos cromossomos homólogos, permitindo inclusive a identificação dos cromossomos envolvidos no rearranjo observado no citótipo $2n = 45$ cromossomos, detectado por Daniel-Silva (1996). O padrão de banda R também possibilitou considerar o primeiro par de cromossomos metacêntricos como homeólogos nas espécies *A. bimaculatus*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* e *A. schubarti* (Daniel-Silva, *op. cit.*).

Os dados citogenéticos de *A. fasciatus*, descritos nesta seção, estão resumidos na Tabela 1.1 e Figura 1.1.

1.4 - Marcadores moleculares de DNA

Marcadores moleculares são proteínas ou seqüências de DNA polimórficos que podem ser usados como indicadores de variação do genoma. Os marcadores moleculares

isoenzimáticos normalmente são chamados de marcadores bioquímicos. Com o advento da tecnologia da amplificação de segmentos de DNA *in vitro* via reação de polimerase em cadeia (PCR), novas ferramentas para o estudo do genoma puderam ser desenvolvidas e métodos estatísticos de análise acompanharam este desenvolvimento, permitindo a manipulação de grandes quantidades de dados (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores moleculares como o RFLP (polimorfismo no comprimento do fragmento) e o VNTR (número variável de repetições em *tandem*), ou minissatélites, são marcadores que não utilizam PCR, mas utilizam a hibridação de sondas específicas marcadas com isótopos radioativos ou luminescentes. O RFLP baseia-se na clivagem do DNA nuclear com enzimas de restrição, que encontram seqüências específicas formando padrões distintos de tamanho dos fragmentos. A análise envolve a comparação de indivíduos com mutações que causaram a perda ou o ganho de seqüências de reconhecimento destas enzimas (Beebe e Rowe, 2004). O VNTR difere do RFLP por utilizar sondas para a detecção dos polimorfismos baseadas na seqüência-núcleo homólogas às seqüências repetidas dos minissatélites, de maneira que todos os locos hipervariáveis são detectados simultaneamente, formando um perfil complexo de bandas múltiplas no autorradiograma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Novos marcadores foram desenvolvidos explorando a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). Esta técnica consiste na amplificação seletiva de uma região escolhida da amostra de DNA. A amplificação por PCR de uma amostra requer dois primers de oligonucleotídeos, íon magnésio e uma enzima DNA polimerase termoestável. Os primers de oligonucleotídeos delimitam a região do DNA que será amplificada. Em um ciclo da PCR, três eventos distintos devem acontecer: a desnaturação do DNA molde; o anelamento dos primers; e a síntese de DNA por uma polimerase termoestável. Devido às elevadas temperaturas necessárias para a desnaturação do DNA molde, a utilização da DNA polimerase de um organismo que habita regiões muito quentes, o *Thermus aquaticus*, se torna essencial.

Esta enzima é resistente à desnaturação em tratamento quente. Mais detalhes sobre a técnica de PCR podem ser vistos nas publicações de Dieffenbach e Dveksler (1995), Brown (2001), entre outros.

Entre os marcadores moleculares baseados em PCR mais utilizados atualmente estão o AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), os microssatélites ou SSR (seqüências simples repetidas), as seqüências de DNA conhecidas ou não como genes ribossômicos e seqüências espaçadoras intergênicas transcritas ou não (IGS, ITS ou NTS), o RFLP de DNA mitocondrial ou cloroplástico, o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e o ISSR (inter-seqüências simples repetidas).

A análise de AFLP consiste na clivagem do DNA com duas enzimas de restrição, a ligação de adaptadores específicos nos terminais dos fragmentos obtidos, seguida de amplificação via PCR deste DNA utilizando-se sondas específicas para os adaptadores e posterior separação dos fragmentos em gel de alta resolução (Vos *et al.*, 1995). O grande número de fragmentos gerados e resolvidos em um único gel e o grande poder de detecção de variabilidade genética são as vantagens deste marcador, limitado pelo baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que apenas um alelo é detectado e pelos requerimentos técnicos e de suprimentos necessitados (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites consistem de pequenas seqüências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos em *tandem*. Através de PCR, utilizando-se primers de seqüências flanqueadoras do microssatélite, as regiões de repetição são amplificadas e cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Tautz, 1989). A expressão co-dominante e o multialelismo tornam os marcadores SSR os de maior informação de polimorfismos, apesar da grande quantidade de trabalho necessária para o desenvolvimento prévio dos marcadores (Tautz, *opus cit.*).

As análises utilizando seqüenciamento de regiões específicas do genoma tornaram-se possíveis com o desenvolvimento de seqüenciadores de DNA automatizados, possibilitando gerar quantidades substanciais de dados para comparação. Desde análises comparativas de seqüências gênicas (como os genes ribossômicos 12S e 16S mitocondriais ou 5S nuclear) na reconstrução de árvores filogenéticas até medidas de variações como polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), podem ser efetuadas utilizando-se estas metodologias.

O RAPD é um marcador molecular amplamente empregado para análises de variabilidade genética por sua simplicidade e rapidez, embora assim como o AFLP, não apresentem informações genéticas por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Outra vantagem do RAPD é não necessitar de informações genéticas prévias das amostras em estudo (Beebe e Rowe, 2004). O RAPD é basicamente uma variação da técnica de amplificação via PCR, utilizando um primer único de seqüência arbitrária que irá amplificar uma região aleatória do genoma analisado.

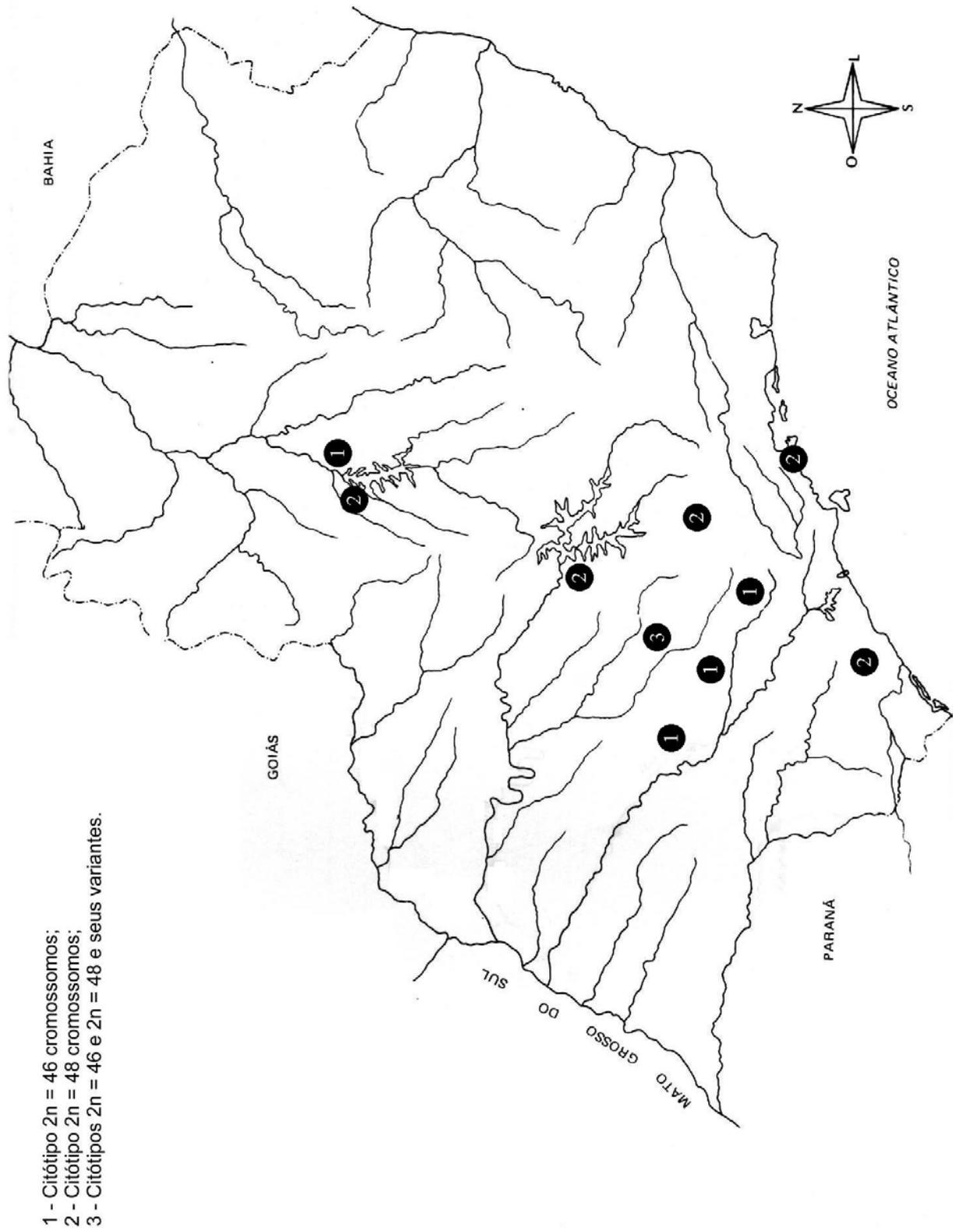
Os marcadores ISSR são gerados de reações de PCR com primer único, desenhado a partir de repetições de dois ou três nucleotídeos ancorados em uma seqüência de um a três nucleotídeos que visam eliminar artefatos decorrentes de *slippage* (Zietkiewicz *et al.*, 1994). As regiões amplificadas representam a seqüência entre dois sítios de microssatélites e a ausência de bandas é interpretada como divergência do primer ou perda de um locus pela deleção do sítio SSR ou rearranjo cromossômico (Wolfe e Liston, 1998). Algumas vantagens deste marcador são as pequenas quantidades de DNA necessárias para as reações, o pequeno volume das reações de PCR, a hiper-variabilidade dos padrões de banda e facilidade na detecção delas, além das altas temperaturas de anelamento nas reações de PCR que reduzem a quantidade de artefatos e erros na reação (Wolfe *et al.*, 1998a).

Marcadores moleculares de DNA são utilizados como ferramenta para os mais diversos estudos, desde análises de variabilidade genética, fluxo gênico e identificação de espécies até diferenças sexuais nos níveis de comportamento individual e estruturas de populações. Embora muito utilizados para fins de melhoramento genético de espécies cultivadas (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Liu e Wendel, 2001; Vasconcellos *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2003; entre outros), a utilização destes marcadores em populações naturais têm alcançado grande êxito na estimativa de parâmetros genéticos, evolutivos e visando a conservação (Wolfe *et al.*, 1998a e b; Arcade *et al.*, 2000; Haig *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2003; Hatanaka e Galetti Jr., 2003; entre outros).

Tabela 1 – Dados citogenéticos sobre *Astyanax fasciatus*.

Local de Coleta	Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula Cariotípica	Ref.
Rio Meia Ponte (Goiânia – GO)		46	28SM e 18A	1
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	46	14M, 20SM, 10ST e 2A	2
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	46	12M, 20SM, 10ST e 4A	3,5
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	45	13M, 19SM, 10ST e 3A	5
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	47	12M, 21SM, 10ST e 4A	5
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	46	12M, 20SM, 8ST e 6A	6
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	46	13M, 20SM, 8ST e 5A	6
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	47	13M, 20SM, 8ST e 6A	6
Rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP)	Bacia do Paraná	48	12M, 20SM, 8ST e 8A	6
Rio Piracicaba (Piracicaba - SP)	Bacia do Paraná	46	12M, 20SM, 10ST e 4A	4
Rio Passa-Cinco (Ipeúna – SP)	Bacia do Paraná	46	14M, 18SM, 10ST e 4A	6
Rio Jacaré-Guaçu (Araraquara – SP)	Bacia do Paraná	46	12M, 20SM, 8ST e 6A	6
Córrego da Barra-Funda (Ribeirão Preto – SP)	Bacia do Paraná	46	12M, 20SM, 8ST e 6A	6
Ribeirão do Paiol Grande (São Bento do Sapucaí – SP)	Bacia do Paraná	48	12M, 20SM, 12ST e 4A	6,8
Rio Sapucaí (Represa de Furnas – MG)	Bacia do Paraná	48	8M, 18SM, 14ST e 8A	7
Rio Paraná (Santa Fé do Sul – SP)	Bacia do Paraná	48	-	9
Rio Juquiá (Registro – SP)	Bacia do Leste	48	10M, 24SM, 12ST e 2A	2
Rio Paraibuna (Paraibuna - SP)	Bacia do Leste	48	8M, 18SM, 12ST e 10A	4
Rio Paraibuna (Paraibuna – SP)	Bacia do Leste	48	8M, 18SM, 12ST e 10A	6
Córrego da Porta (Três Marias – MG)	Bacia do São Francisco	48	8M, 10SM, 24ST e 6A	4
Córrego da Porta (Três Marias – MG)	Bacia do São Francisco	48	10M, 14SM, 14ST e 10A	6
Rio São Francisco (Três Marias – MG)	Bacia do São Francisco	46	6M, 24SM, 8ST e 8A	4
Rio São Francisco (Três Marias – MG)	Bacia do São Francisco	46	8M, 22SM, 8ST e 8A	6

1 – Jim & Toledo (1975); 2 – Morelli *et al.* (1983); 3 – Paganelli (1990); 4 – Justi (1993); 5 – Daniel-Silva (1996); 6 – Heras (1998); 7 – Swerts *et al.* (1998); 8 – Centofante *et al.* (2003); 9 – MBA Marques (dados não publicados). M – Metacêntrico; SM – Submetacêntrico; ST – Subtelocêntrico e A – Acrocêntrico.



1

Figura 1.1 – Mapa evidenciando a distribuição dos citótipos já descritos para *Astyanax fasciatus*.

“Darwin foi quem ele foi, e pensou o que ele pensou, com todos os seus defeitos. E agora está morto. O darwinismo, por outro lado, tem mais de nove vidas. Promete ser imortal.”
Daniel Dennet



Objetivos

2 – OBJETIVOS

Os dados disponíveis permitem caracterizar *Astyanax fasciatus* como uma “espécie” cromossomicamente diversificada, apresentando um cariótipo não conservativo, com evidências de distintos citótipos, cada um deles com seus variantes específicos. Tais citótipos podem ser encontrados em condições de alopatria, assim como de simpatria e sintopia, reforçando a hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma denominação comum. Portanto, a proposta do presente trabalho é a de uma investigação citogenética mais específica neste grupo de peixes, buscando novas informações que possibilitem uma melhor **caracterização e compreensão de sua biodiversidade**.

Para tanto, pretende-se:

- a) Identificar marcadores cromossômicos para a caracterização dos diferentes citótipos, possibilitando uma identificação mais precisa dos mesmos com o emprego de distintas metodologias de estudo;
- b) Intensificar as análises na região de Cachoeira de Emas (rio Mogi-Guaçu, SP), ao longo de diferentes épocas do ano, considerando ser este um local que tem se apresentado como uma área de simpatria e sintopia de diferentes citótipos e formas variantes. Assim sendo, esta região mostra-se fundamental para a análise da diversidade de *A. fasciatus*, a investigação de possíveis formas híbridas e o esclarecimento da problemática do grupo como um possível complexo de espécies;
- c) Mapear a distribuição geográfica dos citótipos de *A. fasciatus* no rio Mogi-Guaçu, tanto à jusante da Cachoeira de Emas como à sua montante, assim como no rio Pardo, principal afluente do Mogi-Guaçu, em regiões próximas

à sua cabeceira e próximas à sua foz. Esta distribuição, associada com os demais dados já disponíveis em literatura, também constitui um instrumento importante no contexto do estudo proposto, podendo inclusive possibilitar evidências de prováveis migrações de citótipos distintos e a caracterização da região de Cachoeira de Emas como uma possível zona de contenção de diferentes populações migradoras de *A. fasciatus*.

- d) Utilizar marcadores moleculares de RAPD e ISSR para avaliar a proximidade entre os diferentes citótipos e correlacioná-los com os dados citogenéticos.

*“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através
da ignorância que podemos solucioná-los”
Isaac Asimov*



Material e Métodos

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Espécie estudada e locais de coleta

Foram estudados exemplares de *Astyanax fasciatus* (Figura 3.1) coletados no rio Mogi-Guaçu em Cachoeira de Emas, município de Pirassununga – SP (139 exemplares), em Ouro Fino – MG (21 exemplares) e em Barrinha – SP (22 exemplares) (Figura 3.2 e 3.3). Amostras de fígado foram mantidas em etanol 98%, a -20°C, até o momento do uso. Os exemplares foram fixados em formaldeído 10% durante 48 horas e posteriormente transferidos para etanol 70%.

3.2 - Preparação de cromossomos mitóticos

O órgão utilizado para a obtenção de metáfases mitóticas foi a porção anterior do rim, uma vez que esta possui função hematopoiética e em peixes as hemácias são nucleadas. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Bertollo *et al.* (1978), que consiste na extração, dissociação e hipotonização celular, seguido de sucessivas centrifugações e fixações com metanol/ácido acético, 3:1, descartando-se o sobrenadante. O material fixado foi acondicionado em tubos de “Eppendorf” e armazenado em freezer, para posterior análise.

Para se obter uma boa análise cromossômica, foi necessária a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Para isso, foi utilizada a indução do aumento na frequência mitótica nas células de defesa através da injeção de uma suspensão de levedura, segundo Lee & Elder (1980).

Para se determinar o número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa e análise em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, sob

aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram fotografadas em filme Kodak Imagelink, preto e branco, ISO 25, e ampliadas em papel Kodak Kodabrome. As fotografias dos cromossomos foram recortadas e, em seguida, os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan *et al.* (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (M);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (SM);

RB= 3,01-7,00, subtlocêntrico (ST);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (A).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos.

As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro e os cromossomos dispostos em pranchas, separados de acordo com a sua morfologia e tamanhos.

As imagens de Ag-RON, FISH, banda-C e fluorocromos foram capturadas através de sistema digital de análise de imagens Media Cybernetics^R, utilizando-se o software Image Pro Plus^R.

3.2.1 - Técnica de suspensão celular (Bertollo *et al.*, 1978)

1- Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção 1 mL/100 g de peso animal durante 30-40 minutos após o qual sacrifica-se o animal e retira-se o rim anterior.

2- Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em uma cuba de vidro contendo 7-10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.

- 3- Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.
- 4- Incubar o material em estufa a 37°C durante 25-30 minutos.
- 5- Pingar 5-10 gotas de fixador metanol/ácido acético (3:1), ressuspender o material, e centrifugá-lo durante 10 minutos a 900 rpm.
- 6- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 7-10 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugá-lo durante 10 minutos.
- 7- Repetir o passo número 6 mais duas vezes.
- 8- Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material, e ressuspender o material.
- 9- Acondicionar o material em tubos de plásticos do tipo Eppendorf e guardá-lo no refrigerador.

3.2.2 - Técnica alternativa (Gold *et al.*, 1990)

Alternativamente, frações do rim anterior foram também colocadas em solução de Hanks, dissociadas e incubadas por 25 minutos a 37°C, com 1-2 gotas de solução de colchicina 0,0125%. Após esse procedimento, o material foi hipotonizado e fixado segundo a técnica de suspensão celular.

3.3 - AgRONS: Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos através da impregnação por nitrato de prata utilizando microondas (Kavalco e Pazza, 2004)

- 1- Colocar sobre uma lâmina previamente preparada 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina 25% (0,5 g de gelatina incolor + 50 mL de H₂O + 0,5 mL de ácido fórmico).
- 2- Adicionar sobre cada gota de gelatina 2 gotas de AgNO₃ 25%.

3- Cobrir com lamínula e levar ao microondas em potência máxima por 6 segundos.

4- Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente.

5- Secar a lâmina e corar com Giemsa 5% por 30 segundos.

6- Deixar secar e observar ao microscópio.

3.4 - Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972)

Para a detecção de heterocromatina constitutiva (bandas-C), utilizou-se a técnica convencional de Sumner (1972), com algumas adaptações.

1- Tratar a lâmina com HCl 0,2N por 15 minutos a temperatura ambiente.

2- Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.

3- Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C por 15 minutos.

4- Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.

5- Colocar a lâmina em solução aquosa de Ba(OH)₂ 5% a 42°C durante 1 minuto e meio.

6- Mergulhar a lâmina três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar secar.

7- Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC por 30 minutos.

8- Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar e corar com Giemsa 6% durante 5 minutos.

3.5 - Coloração cromossômica com fluorocromo Cromomicina A₃ (Schmid, 1980)

1- Colocar 150µL da solução de Distamicina A (0,3mg/mL sobre a lâmina), cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos, escorrer a lamínula e lavar em tampão McIlvaine; deixar secar por alguns minutos;

- 2- Acrescentar 150 μ L da solução de Cromomicina A₃ sobre a lâmina, cobrir novamente com lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro;
- 3- Escorrer a lamínula e lavar o material em três banhos sucessivos no tampão McIlvaine, por aproximadamente 1 minuto cada;
- 4- Deixar secar ao ar e montar com lamínula utilizando como meio uma solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso;
- 5- Deixar a lâmina guardada em temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias;
- 6- Analisar a lâmina em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

3.6 - Hibridação Fluorescente *in situ* (Pinkel et al., 1986; Hamkalo e Elgin, 1991; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2002) com modificações.

3.6.1 – Sondas

As sondas disponíveis (rDNA 18S; rDNA 5S e DNA satélite As-51) foram marcadas fluorescentemente com uridina biotinizada (BdUTP) segundo o protocolo do Kit de Nick Translation Bionik Labeling System, da Invitrogen®:

- 1- Pipetar em um tubo de 1,5mL no gelo:
 - 5 μ L 10x dNTP mix;
 - __ μ L (1 μ g) DNA;
 - __ μ L água destilada (q.s.p. 45 μ L);
 - 5 μ L 10x Enzima mix.
- 2- Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g);
- 3- Incubar a 16°C por uma hora; Obs.: para hibridações com sondas pequenas, pode-se incubar por até duas horas.

- 4- Adicionar 5 μL de Stop Buffer;
- 5- Precipitar o DNA com acetato de sódio (5 μL) e etanol absoluto gelado (110 μL). Misturar invertendo o tubo. Levar a freezer -20°C por duas horas, ou overnight;
- 6- Centrifugar a 15000g por dez minutos;
- 7- Cuidadosamente remover o sobrenadante e secar o pellet;
- 8- Ressuspender o pellet em 50 μL de água autoclavada;
- 9- Repetir os passos 5 e 6;
- 10- Ressuspender em 80 μL de tampão TE [10mM Tris-HCl (pH 7.5) – 1mM EDTA] e armazenar a 20°C . Caso utilize a sonda no mesmo dia, pode-se adicionar água destilada no lugar do TE.

3.6.2 - Preparação das lâminas:

- 1- Pingar 1 a 3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa e aquecida a 65°C e deixar secar ao ar.

3.6.3 - Tratamento com RNase:

- 1- Incubar as lâminas em 90 μL de RNase 0,4% em 2xSSC, por uma hora em câmara úmida a 37°C .
- 2- Lavar três vezes em 2xSSC por cinco minutos;
- 3- Lavar durante cinco minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

3.6.4 - Pós-fixação

- 1- Pós-fixar as lâminas em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM de cloreto de magnésio durante dez minutos, em temperatura ambiente;

2- Lavar as lâminas durante cinco minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente;

3- Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70% (agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada;

3.6.5 - Pré-hibridação

1- Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C;

2- Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada.

3- Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se a solução de hibridação.

3.6.6 - Solução de hibridação

Adicionar aos 80µL de sonda marcada:

1- 200 µL de formamida pura;

2- 80 µL de sulfato dextrano 50% (concentração final de 10%);

3- 40 µL de 20xSSC.

3.6.7 – Hibridação da sonda

1- Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;

2- Colocar 40 µL da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula;

3- Deixar as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C overnight.

3.6.8 – Lavagens

- 1- Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por cinco minutos apenas para tirar a lamínula. Escorrer bem as lâminas sem deixar secar;
- 2- Lavar duas vezes em formamida 20% em 0,1xSSC a 42°C durante cinco minutos cada;
- 3- Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42°C durante cinco minutos cada;
- 4- Lavar uma vez em 2xSSC a 42°C durante cinco minutos;
- 5- Lavar as lâminas em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos em temperatura ambiente;

3.6.9 – Detecção do sinal

- 1- Incubar as lâminas em tampão NFDm por quinze minutos;
- 2- Lavar duas vezes em Tween 20/20xSSC por cinco minutos cada, em temperatura ambiente;
- 3- Incubar as lâminas com 90 µL de solução de FITC-avidina, durante trinta minutos em câmara úmida escura em temperatura ambiente;
- 4- Lavar três vezes em Tween 20/20xSSC por cinco minutos em temperatura ambiente;
- 5- Incubar as lâminas com 90 µL de solução de anti-avidina (conjugada com biotina) durante trinta minutos em câmara úmida escura em temperatura ambiente;
- 6- Repetir passo 4 (lavagem);
- 7- Repetir passo 3 (FITC);
- 8- Repetir passo 4 (lavagem);
- 9- Repetir passo 5 (anti-avidina);
- 10- Repetir passo 4 (lavagem);

- 11- Repetir passo 3 (FITC);
- 12- Repetir passo 4 (lavagem);
- 13- Desidratar em série alcoólica de etanol 70% (agitação), 85% e 100%, por cinco minutos cada e deixar secar ao ar.

3.6.10 – Montagem das lâminas:

As lâminas devem ser montadas com 25 μ L da solução de iodeto de propídio (contracorante) e antifade. Alternativamente pode-se utilizar o antifade da marca Vector®, Vectashield Mounting Medium with PI (1,5 μ g/mL).

3.7 – Extração do DNA (Aljanabi & Martinez, 1997) com modificações

Para a extração do DNA a partir de tecido de fígado, utilizou-se o seguinte protocolo de extração salina:

- 1- Retirar uma amostra de fígado (em torno de 100mg);
- 2- Em um tubo tipo Eppendorf de 1,5mL, homogeneizar bem a amostra em 400 μ L de tampão salino (NaCl 0,4M, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0) utilizando um pistilo de plástico;
- 3- Adicionar 40 μ L de SDS 20% (concentração final de 2%) e 8 μ L de proteinase K (20mg/mL – concentração final de 400 μ g/mL) e misturar bem;
- 4- Incubar a amostra à 55-65°C por pelo menos uma hora ou “overnight”;
- 5- Adicionar 300 μ L de NaCl 6M e mexer em vortex por um minuto em alta velocidade;
- 6- Centrifugar por 30 minutos à 10.000 g;
- 7- Transferir o sobrenadante para tubos limpos;
- 8- Adicionar igual volume de isopropanol e misturar bem;

- 9- Incubar a -20°C por 1h ou “overnight”;
- 10- Centrifugar por 20 minutos, 4°C, a 10.000 g;
- 11- Descartar o sobrenadante e lavar o pelet em etanol 70% (centrifugar por 10 minutos na velocidade máxima);
- 12- Secar o pelet e ressuspender em TE ou água estéril (de 50 a 300uL);
- 13- Quantificar uma alíquota do DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (20ug/100mL).

Após a quantificação, as amostras foram incubadas durante 1 hora, com 2 µL RNase 10 mg/mL, a 37°C, por 1 hora, para eliminação de impurezas, como RNA. Para otimização das reações de ISSR e RAPD, o material foi lavado em fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. O DNA foi então precipitado em etanol 100% e NaCl 5 M, armazenado a -20°C e quantificado. Utilizou-se para comparação visual alíquotas de DNA de fago λ. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e coradas com brometo de etídeo (20 µg/100 mL).

3.8 – Reações de amplificação e eletroforese

3.8.1 - Reações de amplificação de RAPD

Nos testes iniciais das reações de PCR foram utilizados 19 primers, sendo 10 do kit X (2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15 e 16) e 9 do kit W (3, 4, 9, 13, 14, 15, 16, 17 e 19) da Operon Technologies (Alameda, CA, USA) e DNA de *Astyanax fasciatus*. Os primers que produziram número significativo de fragmentos e bandas visíveis foram escolhidos para as análises de RAPD. As reações de PCR continham tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 mM, dNTP 0,2 mM, *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen) 1 U/reação, DNA 10 ng e água deionizada até completar um volume final de 13 µL. As reações foram aquecidas a 94°C por 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos de 1

minuto a 94°C; de 1 minuto a 36°C e de 2 minutos a 72°C. Imediatamente após o último ciclo, as reações foram mantidas a 72°C por 10 minutos, a 20°C por mais 10 minutos e então resfriadas a 4°C. O DNA amplificado pela reação de PCR foi submetido à eletroforese (3 V.cm⁻¹ por 5-6 horas) em gel de agarose a 1,4% e corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). Em cada reação foi incluído um controle negativo, contendo o mix de reação sem o DNA. Os géis foram visualizados sob radiação UV e as imagens foram capturadas com o sistema EDAS-290 da Kodak. O tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando-se um padrão (Ready-Load 100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

3.8.2 - Reações de amplificação de ISSR

Nos testes iniciais das reações de PCR foram utilizados 8 primers (GGAC)₃A, (GGAC)₃C, (GGAC)₃T, (TGTC)₄, (GGAC)₄, (GGAT)₄, (TAGG)₄, (GACA)₄ e DNA de *Astyanax fasciatus*. Os primers que produziram número razoável de fragmentos e bandas visíveis foram escolhidos para as análises de ISSR. As reações de PCR continham tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 mM, dNTP 0,2 mM, *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen) 1 U/reação, DNA 10ng, e água deionizada até completar um volume final de 13 µL. As reações foram submetidas a 5 ciclos de 45 segundos a 94°C; de 1 minuto a 51°C e de 1 minuto a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C; de 1 minuto a 48°C, de 1 minuto a 72°C e então resfriadas a 4°C. O DNA amplificado pela reação de PCR foi submetido à eletroforese, seguindo a mesma metodologia empregada para as análises de RAPD.

3.9 - Análise dos dados

A distância genética, baseada nos marcadores RAPD e ISSR, bem como a identidade genética, foram estimadas de acordo com Nei (1978) e o número de migrantes por

geração (Nm) foi calculado a partir da estimativa do G_{ST} (Slatkin e Barton, 1989), utilizando-se o software Popgen 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Os dendrogramas, baseados nos índices de similaridade de Nei e Li (1979) e Jaccard, bem como os dendrogramas de parcimônia, foram construídos com o software MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

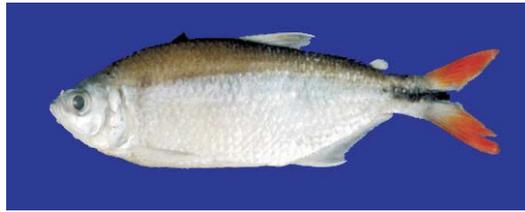


Figura 2.1 - Exemplar de *Astyanax fasciatus* com 120 mm de comprimento padrão.

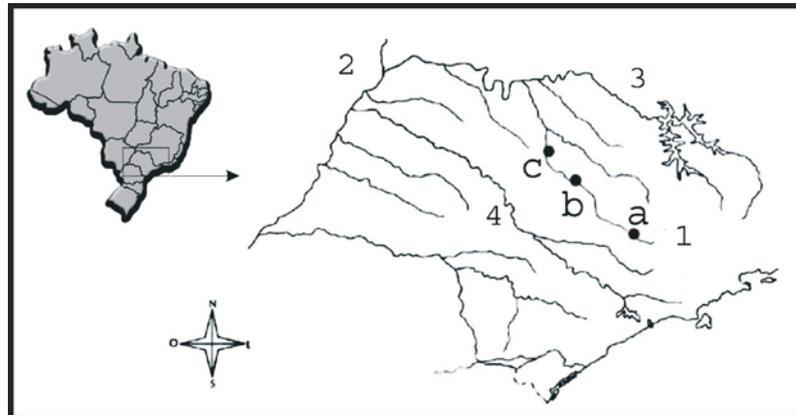


Figura 2.2 - Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando os locais de coleta e principais rios da bacia do Alto rio Paraná. a) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP; 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Paraná; 3) rio Grande; 4) rio Tietê.



Figura 2.3 - Locais de coletas. (a e b) Cachoeira de Emas, Pirassununga-SP; (c) Ouro Fino-MG; e (d) Barrinha-SP.

“A frase mais deliciosa que se pode ouvir na ciência, aquela que todos os cientistas adoram, não é ‘Eureka’, mas ‘que engraçado’.”
Isaac Asimov



Resultados

4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos estão organizados em três capítulos que correspondem a três artigos submetidos ou em fase de preparação para submissão para a apreciação de revistas científicas. As referências bibliográficas encontram-se ao final deste volume.

CAPÍTULO I - POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 1 – Análises cariotípicas, Ag-RONs e mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S em citótipos simpátricos e suas possíveis formas híbridas.

Submetido à revista *Cytogenetic and Genome Research*.

CAPÍTULO II - POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 2 – Distribuição da heterocromatina constitutiva e DNA satélite.

Submetido à revista *Heredity*.

CAPÍTULO III - POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 3 – Análises de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

Em preparação para ser submetido à revista *Genetica*.

“A melhor maneira de ter uma boa idéia é ter muitas idéias”.
Linus Pauling



Capítulo I

POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 1 – Análises cariotípicas, Ag-RONs e mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S em citótipos simpátricos e suas possíveis formas híbridas.

Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C.

RESUMO

Astyanax fasciatus pode ser caracterizada como uma “espécie” diversificada do ponto de vista citogenético, apresentando distintos citótipos, cada um deles com seus variantes específicos. A ocorrência simpátrica e sintópica de diferentes citótipos reforça a hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma denominação comum. No presente trabalho foram examinados exemplares provenientes de três pontos de coleta, ao longo do rio Mogi-Guaçu no Sudeste do Brasil: (1) próximo à sua cabeceira (Ouro Fino – MG), (2) no trecho médio do rio (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP) e (3) próximo à sua foz no rio Pardo (Barrinha – SP). O citótipo $2n = 48$ cromossomos foi encontrado em todos os pontos de coleta, enquanto o citótipo $2n = 46$ cromossomos foi encontrado somente em Barrinha e Cachoeira de Emas. Nesta última localidade o citótipo $2n=46$ foi predominante ocorrendo, contudo, outras formas cariotípicas com $2n=45$ e 47 cromossomos, além de um variante estrutural do citótipo $2n=46$. Um espécime com $2n=47$ cromossomos foi também encontrado em Ouro Fino. A análise das Ag-RONs, bem como a localização dos genes ribossômicos 18S e 5S mostrou-se conservada em todos os citótipos. As evidências encontradas indicam que os cariótipos variantes devem ser decorrentes de intercruzamentos entre os citótipos padrão ($2n=46$ e 48) e/ou seus descendentes. Isto sugere uma plasticidade cariotípica para esta espécie, onde pelo menos alguns cariótipos variantes não teriam efeitos deletérios para os seus portadores.

INTRODUÇÃO

Entre os animais, inúmeros casos de variações cariotípicas podem ser encontrados englobando diversos tipos de rearranjos cromossômicos, alguns deles evidenciando grande variabilidade intraespecífica, como em Rodentia (Maia e Hulak, 1981; Fagundes *et al.*, 1998; Gava e Freitas, 2002) e Insectivora (Motokawa *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002).

Entre os peixes neotropicais também são conhecidos casos de variações cromossômicas em populações naturais, onde fissões e fusões cêntricas, inversões e presença de cromossomos supranumerários parecem ser os eventos mais frequentes, seguidos por alguns casos de poliploidia. Tais variações têm sido particularmente destacadas em prováveis complexos de espécies, como em *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000; Pazza e Julio Jr, 2003) e *Astyanax scabripinnis* (Moreira Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a; Maistro *et al.*, 1998), bem como em *Apareiodon affinis* (Jorge e Moreira-Filho, 2000), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz e Bertollo, 2003) e *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2000).

Análises citogenéticas prévias em *Astyanax fasciatus* permitiram identificar pelo menos dois tipos de cariótipos ou citótipos principais, $2n=46$ e 48 cromossomos (Jim e Toledo, 1975; Morelli *et al.*, 1983; Paganelli, 1990; Justi, 1993; Daniel-Silva, 1996; Heras, 1998). Adicionalmente, em Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu (Estado de São Paulo, Brasil), foi observada uma variação cariotípica tanto numérica como estrutural nessa espécie (Paganelli, 1990, Daniel-Silva, 1996; Heras, 1998). No presente trabalho procurou-se analisar a origem e frequência dessa variação, principalmente no que se refere à localidade de Cachoeira de Emas.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Astyanax fasciatus* foram coletados em três pontos ao longo do rio Mogi-Guaçu, no Sudeste do Brasil (Figura 2.2): Ouro Fino – MG, próximo à sua cabeceira (21 exemplares), Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP, no trecho médio do rio (139 exemplares) e Barrinha – SP, próximo à sua confluência com o rio Pardo (22 exemplares). Na região de Cachoeira de Emas, foram feitas diversas coletas, em diferentes meses do ano, com o intuito de se detectar possíveis variações na frequência de distintas formas cariotípicas.

Preparações cromossômicas e Ag-RON

Para as preparações cromossômicas foi utilizada a metodologia de Gold *et al.* (1990), que consiste na dissociação de porções da região anterior do rim em sais de Hanks ou, alternativamente, utilizando-se meio de cultura RPMI e TC199 sem antibióticos ou fitohemaglutinina. Depois de dissociado, o material foi encubado em tubos de centrífuga de 15mL com 5 gotas de colchicina 0,025%, por 25 minutos à 37°C. Passado este tempo, o material foi centrifugado à 1000rpm em temperatura ambiente por 10 minutos, retirado o sobrenadante e adicionada solução hipotônica de KCl 0,75M, encubando-se por 25 minutos à 37°C, seguindo, então, o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978). A impregnação por nitrato de prata evidenciando as Ag-RONs seguiu a metodologia descrita por Kavalco e Pazza (2004).

Para se determinar o número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa e análise em microscópio óptico, onde as melhores metáfases foram fotografadas em filme Kodak Imagelink™, ISO 25. Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em ordem decrescente de tamanho, sendo classificados em metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos (Levan *et al.*, 1964).

Hibridação fluorescente “in situ”

Para as hibridações fluorescentes *in situ* (FISH), foram utilizadas sondas de genes ribossômicos 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e 5S (Martins e Galetti Jr, 1999). As lâminas com os cromossomos foram incubadas com 90uL de solução de RNase 0,4% em 2xSSC, a 37°C por uma hora, cobertas por lamínula; lavadas 3 vezes com 2xSSC e uma vez com 1xPBS em temperatura ambiente por 5 min. As lâminas foram, então, incubadas em uma solução de pós-fixação (1% formaldeído, 50mM MgCl em 1xPBS) em temperatura ambiente por 10 min, lavadas com 1xPBS por 5 min e desidratadas em etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 min cada, e secadas ao ar. Os cromossomos foram desnaturados com formamida 70% em 0,1xSSC a 70°C por 5 minutos, desidratadas conforme descrito acima e secadas ao ar. A sonda foi marcada por “nick translation” com UTP-biotina de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). As sondas marcadas foram desnaturadas em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10% em 2xSSC) a 100°C por 10 min. As lâminas com cromossomos desnaturados foram incubadas com 40uL da solução de hibridação a 37°C “overnight”. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas com formamida 20% em 0,1xSSC (três vezes), com 0,1xSSC (duas vezes) e com 2xSSC (uma vez) a 42°C por 5 min cada; e com solução de lavagem (Tween 20 0,005% em 5xSSC) por 5 min em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em uma solução de NFDM (leite em pó desnatado) em 5xSSC por 15 min em temperatura ambiente. Foram lavadas com solução de lavagem duas vezes por 5 min cada. Após, foram incubadas com avidina-fluoresceína (FITC-avidina) em solução de NFDM em câmara úmida escura em temperatura ambiente por 30 min (procedimento de detecção). Foram lavadas três vezes com solução de lavagem por 5 min cada. O sinal foi amplificado com uma incubação com 90uL de solução de anti-avidina (conjugada com biotina) em NFDM, em temperatura ambiente, por 30 min em câmara úmida escura e as

lâminas foram lavadas três vezes com solução de lavagem por 5 min cada, seguida por outro procedimento de detecção. O passo de amplificação foi repetido. Após, as lâminas foram desidratadas em etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 min cada e secadas ao ar. As lâminas foram então montadas com antifade “Vectashield Mounting Medium” com iodeto de propídio (1,5µg/mL) (Vector Laboratories). As imagens de FISH foram capturadas com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics) em microscópio Olympus BX-50.

RESULTADOS

Astyanax fasciatus do rio Mogi-Guaçu apresentou dois citótipos principais, aqui chamados de citótipos padrão por apresentarem um pareamento regular dos cromossomos: citótipo A: $2n = 48$ cromossomos (8M, 22SM, 12ST, 6A e NF=90) (Figura 3.1-a) e citótipo B: $2n = 46$ cromossomos (12M, 20SM, 10ST, 4A e NF=88) (Figura 3.1-b). Destacam-se as diferenças de tamanho do primeiro e segundo pares de cromossomos M, ST e A, entre os dois citótipos, cujos idiogramas são apresentados na Figura 3.2. Além destes dois citótipos, foram também encontrados alguns cariótipos variantes numéricos e estruturais: variante 1 - 46 cromossomos, diferindo do citótipo padrão B por apresentar dois cromossomos metacêntricos sem homologia (tamanhos claramente distintos) (Figura 3.1-c); variante 2 - 45 cromossomos, semelhante ao variante 1, mas apresentando também a ausência de um dos homólogos do primeiro par de cromossomos acrocêntricos (Figura 3.1-d); variante 3 - 47 cromossomos, diferindo do padrão B pela ausência de um dos homólogos do primeiro par de cromossomos submetacêntricos, pela presença de três pares de cromossomos acrocêntricos, e pelo tamanho do segundo par de cromossomos subtelo-cêntricos (Figura 3.1-e); variante 4 - 47 cromossomos, diferindo do padrão B pela presença de um cromossomo submetacêntrico pequeno extra e pelo tamanho do segundo par de cromossomos acrocêntricos (Figura 3.1-f);

variante 5 - 47 cromossomos, diferindo do padrão B por um cromossomo acrocêntrico extra, similar ao último cromossomo do complemento (Figura 3.1-g); variante 6 - 47 cromossomos, diferindo do padrão B por um cromossomo acrocêntrico extra, de tamanho intermediário aos dois pares de acrocêntricos (Figura 3.1-h). Este último variante foi coletado em Ouro Fino – MG, enquanto todos os demais foram coletados em Cachoeira de Emas.

A impregnação por nitrato de prata mostrou múltiplos pares cromossômicos portadores de regiões organizadoras de nucléolos, variando de 2 a 8 cromossomos, sendo mais freqüentemente observada a presença de dois cromossomos com Ag-RONs (Figura 3.3-a). Destaca-se, em todas as formas cariotípicas, a ocorrência de um par de cromossomos submetacêntricos portadores de um sítio ribossômico na região subterminal do braço curto. Este par esteve presente em todas as metáfases analisadas e sempre com marcações bem conspícuas. Por outro lado, as demais marcações apresentaram-se diminutas, sempre teloméricas e principalmente no braço longo de cromossomos subtelocêntricos e/ou acrocêntricos. A hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sonda do gene ribossômico 18S, mostrou um par cromossômico fortemente marcado nos sítios correspondentes às Ag-RONs, em todos os tipos de cariótipos (Figura 3.3-b). Marcações diminutas foram também detectadas na região telomérica do braço longo de cromossomos subtelocêntricos e/ou acrocêntricos, em coincidência com as Ag-RONs. Estas marcações são de difícil detecção e não foram sempre visualizadas em todas as metáfases analisadas.

FISH, utilizando sonda de rDNA 5S, mostrou que estas seqüências gênicas estão localizadas na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos e também na região telomérica do braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos, em todos os cariótipos (Figura 3.3-c).

A distribuição e freqüência das diferentes formas cariotípicas quanto ao número diplóide, em relação aos pontos de coleta, podem ser visualizadas na Figura 3.4 e

Tabela 3.1.

DISCUSSÃO

Astyanax fasciatus foi originalmente descrito por Cuvier, em 1819, como *Chalceus fasciatus*, tendo como localidade típica os “rios do Brasil” (Eigenmann, 1921). Segundo o autor, *Astyanax fasciatus* é encontrado sintopicamente com *A. taeniatus* e *A. scabripinnis* no Sudeste do Brasil, sendo fácil a distinção entre as espécies quando coletadas em um mesmo rio, existindo, porém, uma certa dificuldade para sua identificação quando os espécimes de todos os rios são reunidos. Tal fato foi também considerado por Vanzolini *et al.* (1964), em estudos comparativos entre populações do rio Mogi-Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP), e do rio Corumbataí (SP), para as espécies *A. fasciatus* e *A. schubarti*.

Em *A. fasciatus* foram identificadas pelo menos dois citótipos ou formas cariotípicas, representativos de diferentes populações da espécie, apresentando $2n = 46$ e 48 cromossomos. No presente trabalho, ambos os citótipos foram encontrados e se mostraram freqüentes no rio Mogi-Guaçu. O citótipo $2n = 48$ foi mais freqüente em Ouro Fino – MG e Barrinha – SP, enquanto o citótipo $2n = 46$ foi predominantemente encontrado em Cachoeira de Emas (Fig. 5). Ao longo das diversas coletas efetuadas nessa última localidade, o citótipo $2n=46$ manteve essa freqüência, ao lado do citótipo $2n=48$ e de algumas formas cariotípicas variantes que, embora menos freqüentes, mostraram uma certa regularidade (Tabela 3.1).

É notório o número de variações cromossômicas numéricas e estruturais em *A. fasciatus*, encontradas em sintopia na região de Cachoeira de Emas, em adição aos dois citótipos “tipo padrão” ($2n=46$ e $2n=48$ cromossomos). Parece pouco provável que esses diversos cariótipos variantes (pelo menos 6 tipos detectados – Figura 3.1 c-h) sejam decorrentes de casos distintos de alterações cromossômicas. Antes, tais variações parecem resultar de um possível intercruzamento aleatório entre os dois citótipos tipo padrão e/ou seus

descendentes. Se assim for, haveria uma relativa plasticidade cariotípica para esta espécie, onde pelo menos algumas combinações cromossômicas não teriam efeitos deletérios suficientes para a inviabilidade de seus portadores. A favor dessa hipótese, temos a presença de cromossomos marcadores do citótipo padrão A ($2n=48$) nos cariótipos variantes. Embora esses variantes mantenham uma macroestrutura cariotípica predominantemente similar à do citótipo padrão B ($2n=46$), cromossomos marcadores do citótipo padrão A podem ser facilmente identificados como, por exemplo, um subtelocêntrico grande (pares 17-18) nos variantes 1, 2 e 3 e acrocêntricos grandes (par 23) nos variantes 4 e 6. Infelizmente, bandamentos múltiplos nem sempre são facilmente obtidos em peixes, os quais permitiriam identificar, com maior precisão, a presença de outros cromossomos provavelmente decorrentes de uma introgressão genética.

É possível que Cachoeira de Emas seja uma região de contenção de diferentes populações que ali convergem durante migrações dessa espécie (Heras, 1998), podendo assim facilitar a detecção de diferentes formas cariotípicas presentes. O fato de que o citótipo $2n = 48$ cromossomos foi mais freqüentemente encontrado nas duas localidades opostas à região de Cachoeira de Emas no rio Mogi-Guaçu (Figura 3.4), bem como em outros rios pertencentes à bacia do rio Grande (Tabela 3.2), permite sugerir que este seja o possível citótipo residente do rio Mogi-Guaçu. É interessante também observar que em algumas populações analisadas da bacia do rio Tietê predomina o citótipo $2n=46$ cromossomos (Tabela 3.2), o qual é também predominante em Cachoeira de Emas. Assim sendo, a elevada freqüência do citótipo $2n = 46$ cromossomos nesta região, lembra o comportamento de espécies invasoras, que podem aumentar em muito a sua freqüência em relação à espécie nativa com quem competem. A invasão deste citótipo no rio Mogi-Guaçu poderia ter ocorrido através do rio Paraná (Figura 2.2), com o qual os rios Tietê e Grande têm conexão, ou por meio de pequenas enchentes em locais onde cabeceiras de pequenos afluentes dos rios Mogi-Guaçu e Tietê estão próximas. Se

A. fasciatus $2n=46$ for de fato um citótipo invasor é possível que a “plasticidade cariotípica” proposta para essa espécie possa representar um fator positivo para o seu sucesso, principalmente se considerarmos a importância dos rearranjos genômicos e hibridizações no processo invasivo (Lee, 2002).

As Ag-RONs, bem como a localização dos genes ribossômicos 18S e 5S mostraram-se bastante conservados (Figura 3.3-a e b), indicando uma grande proximidade entre os dois citótipos padrão, sugerindo uma divergência cariotípica recente entre os mesmos. A ocorrência de Ag-RONs múltiplas, com “sítios principais” mais conspícuos e sempre ativos, ao lado de “sítios secundários” com atividade variável, parece ser comum no gênero *Astyanax* (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998b; Mantovani *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2001; Kavalco e Moreira-Filho, 2003). Igualmente comuns são os sítios de rDNA 18S conspícuos, ao lado de sítios diminutos e pouco nítidos (Ferro *et al.*, 2001; Kavalco e Moreira-Filho, 2003). Um modelo de ativação em cascata foi proposto por Zurita *et al.* (1998). Neste modelo, os fatores de transcrição ligar-se-iam aleatoriamente em qualquer cístron ribossômico. Por isso, as RONS que tiverem mais cístrons, ou seja, mais cópias de genes ribossômicos, serão ativadas preferencialmente. Após este passo, os fatores de transcrição ainda disponíveis ligar-se-iam aos demais cístrons de maneira cooperativa, tendo os promotores de cístrons adjacentes mais afinidade com os fatores de transcrição (Zurita *et al.*, 1998). Os autores ainda sugerem a forte tendência de que um cromossomo portador de RON seja completamente ativado antes que o seu homólogo comece a ter fatores de transcrição ligados a ele. Este modelo pode se aplicar aos casos onde ocorrem RONS mais conspícuas e geralmente ativas (“sítio principal”), ao lado da atividade variável dos pequenos “sítios secundários”, como observado em *A. scabripinnis* (Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Kavalco e Moreira-Filho, 2003), *A. giton* e *A. parahybae* (Kavalco e Moreira-Filho, 2003), e *A. fasciatus* (presente trabalho).

A ocorrência de 2 pares de cromossomos portadores de rDNA 5S (Fig. 3.3-c) mostra-se predominante em alguns grupos de peixes Neotropicais, como na família Anostomidae (Martins e Galetti Jr., 1999, 2000 e 2001) e nos gêneros *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001) e *Astyanax* (Ferro *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002b; Kavalco *et al.*, 2004a; presente estudo). Almeida-Toledo *et al.* (2002b), destacam a localização constante de um cluster de rDNA 5S na região pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos, em 5 espécies de *Astyanax*. Por sua vez, *A. scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2004a) e *A. paraguayae* (Kavalco *et al.*, 2004a) mostram esse mesmo resultado, assim como *A. fasciatus*, no presente trabalho (Fig. 3.3-c). A ausência deste cromossomo marcador nas espécies *A. giton* e *A. intermedius*, além de um número bem maior de sítios de rRNA 5S (Kavalco *et al.*, 2004a), reforçam a hipótese de polifiletismo no gênero *Astyanax* (Weitzman e Malabarba, 1998).

A hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um complexo de espécies já foi várias vezes considerada (Justi, 1993; Garutti e Britski, 2000; Melo, 2001; Centofante *et al.*, 2003). Na realidade, populações que apresentam cariótipos com um mesmo número diplóide ($2n = 46$ e 48) podem também evidenciar algumas diferenças na fórmula cariotípica, mostrando também uma diferenciação estrutural entre eles (Justi, 1993; Heras, 1998). Assim sendo, os citótipos padrão $2n = 46$ e 48 cromossomos podem representar espécies distintas nesse grupo, ou pelo menos populações cromossomicamente diferenciadas de *A. fasciatus*, mantendo uma certa potencialidade de intercruzamento. De fato, as variações cariotípicas ora observadas apontam para possíveis formas híbridas viáveis. O papel dos rearranjos cromossômicos na especiação tem sido bastante discutido por diversos autores, como White (1978), Sites Jr e Moritz (1987), King (1993), Rieseberg (2001), Rockman e Rowell (2002) e Navarro e Barton (2003), e alguns trabalhos já correlacionam a evolução cariotípica com filogenia de seqüências de DNA (Ortí *et al.*, 1996; Wang e Lan, 2000; García *et al.*, 2001;

Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004). Modelos clássicos de especiação cromossômica inferem que, uma vez que os indivíduos híbridos são parcialmente estéreis, as mudanças cromossômicas podem atuar como barreiras ao fluxo gênico entre populações e facilitar o isolamento reprodutivo.

A ocorrência de haplótipos de RFLP, compartilhados entre a população de *A. fasciatus* de Pirassununga (Cachoeira de Emas) e uma população proveniente do rio Tietê, sugere uma separação recente entre as duas populações ou a ocorrência de fluxo gênico entre elas (Moysés e Almeida-Toledo, 2002), reforçando a proposta de proximidade entre essas populações. De fato, estudos em andamento, utilizando marcadores moleculares (RAPD e ISSR), indicam a ocorrência de fluxo gênico entre os citótipos $2n=46$ e $2n=48$, na região de Cachoeira de Emas. Em adição, análises cromossômicas adicionais também estão sendo desenvolvidas, com o intuito de complementar as considerações ora apresentadas sobre a distribuição e origem da variação cromossômica em *Astyanax fasciatus*.

AGRADECIMENTOS

Estudo financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 01/02777-5).

Tabela 3.1 – Distribuição dos números cromossômicos observados em *Astyanax fasciatus* nos três pontos de coleta, e em relação aos diferentes meses do ano em Cachoeira de Emas.

Ano Mês	Ouro Fino	Cachoeira de Emas											Barrinha	Total
		2001					2002		2003					
		03	04	05	07	09	10	11	12	01	08	02		
2n = 45	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	3
2n = 46	-	19	17	7	5	5	15	4	12	7	10	13	5	119
2n = 47	1	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	6
2n = 48	20	2	-	-	2	2	5	1	4	1	-	-	17	54
Total	21	22	18	7	7	8	23	5	17	8	10	14	22	182

Tabela 3.2 – Distribuição cariotípica de algumas populações de *Astyanax fasciatus* nas bacias dos rios Grande, Tietê e Paraná (Brasil).

Bacia hidrográfica/Localidade	2n	Referência
Bacia do rio Grande		
Rio Mogi-Guaçu	46	1,2,3,4,5
Rio Mogi-Guaçu	45	4,5
Rio Mogi-Guaçu	47	3,4,5
Rio Mogi-Guaçu	48	3,5
Rio Paiol Grande	48	3,6
Rio Barra Funda	46	3
Rio Sapucaí	48	7
Bacia do rio Tietê		
Rio Jacaré-Guaçu	46	3
Rio Passa-Cinco	46	3
Rio Piracicaba	46	8
Rio Tietê	46	8
Bacia do rio Paraná		
Rio Paraná (Sta. Fé do Sul, SP)	48	9

Referências: 1 – Morelli *et al.*, 1983; 2 – Paganelli, 1990; 3 – Heras, 1998; 4 – Daniel-Silva, 1996; 5 – presente trabalho; 6 – Centofante *et al.*, 2003; 7 – Swertz *et al.*, 1998; 8 – Justi, 1993; 9 – M.B.A. Marques (dados não publicados).

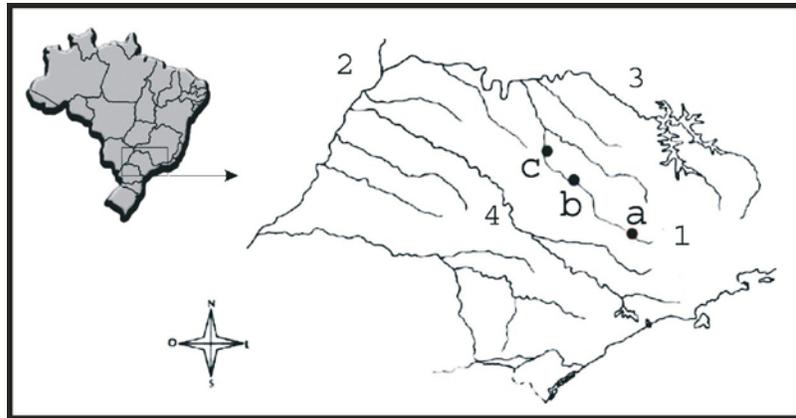


Figura 1 - Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando os locais de coleta e principais rios da bacia do Alto rio Paraná. a) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP; 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Paraná; 3) rio Grande; 4) rio Tietê.

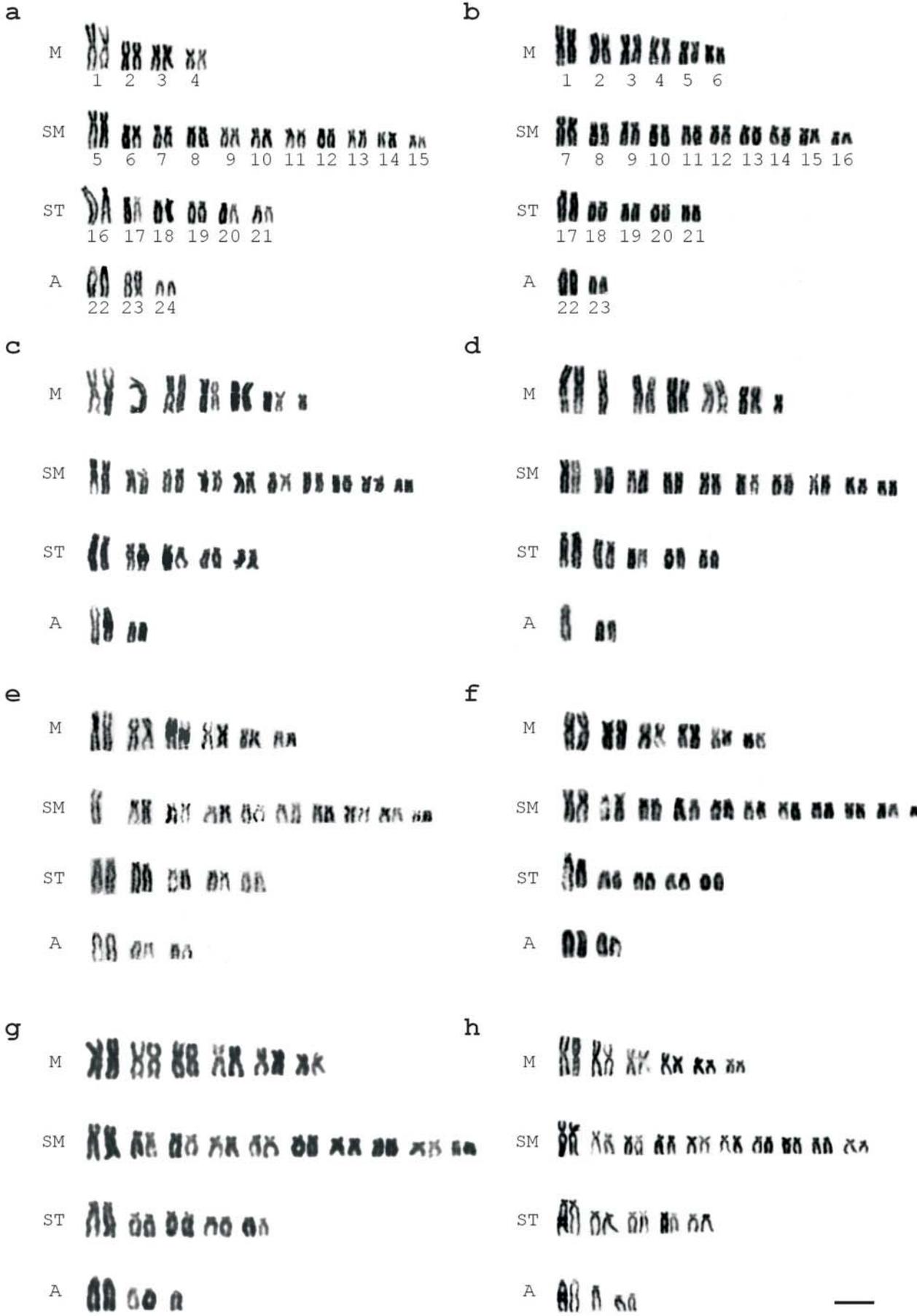


Figura 3.1 - Cariótipos de *Astyanax fasciatus*. a) citótipo padrão A: $2n = 48$; b) citótipo padrão B: $2n = 46$; c) variante 1: $2n = 46$; d) variante 2: $2n = 45$; e-h) variantes 3-6: todos com $2n = 47$, mas com distintos cariótipos. M = metacêntricos, SM = submetacêntricos, ST = subtlocêntricos, A = acrocêntricos. Barra = 5 μ m.

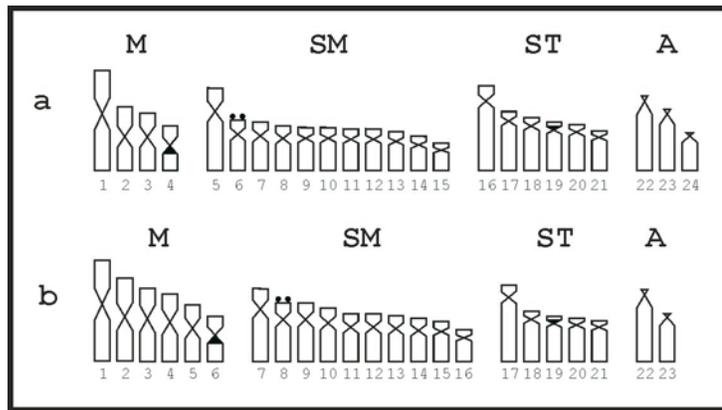


Figura 3.2 - Idiogramas representativos dos citótipos padrão $2n=48$ (a) e $2n=46$ cromossomos (b), evidenciando os sítios do gene ribossômico 5S (bandas nos cromossomos) e 18S (círculos cheios).

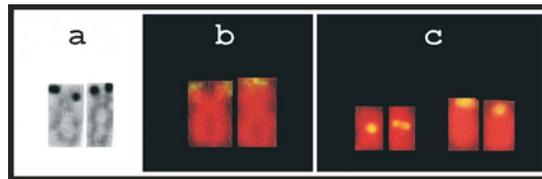


Figura 3.3 - Cromossomos portadores dos genes ribossômicos, homeólogos em todos os citótipos. a) Ag-RON; b) FISH 18S; c) FISH 5S.

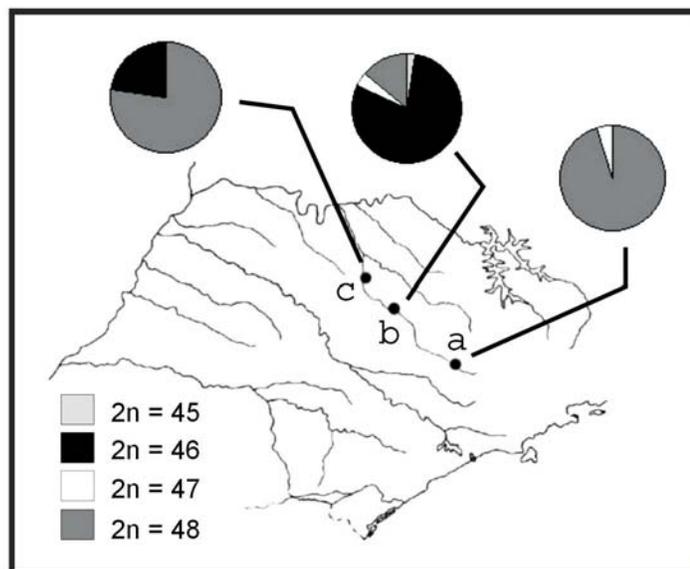


Figura 3.4 - Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando a frequência dos números cromossômicos nos respectivos pontos de coleta. A) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP.

*“A intuição, não testada e não comprovada, é uma
garantia insuficiente da verdade”.*
Bertrand Russell



Capítulo II

POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 2 – Distribuição da heterocromatina constitutiva e DNA satélite.

Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C.

RESUMO

O gênero *Astyanax* é amplamente distribuído pela região Neotropical e tem sido alvo de inúmeros estudos que atestam sua diversidade. O estudo da composição de seqüências repetitivas, bem como sua localização nos cromossomos, tem fornecido importantes subsídios para estudos evolutivos nos mais diversos organismos. Com o objetivo dar continuidade aos estudos sobre as possíveis relações entre diferentes citótipos de *Astyanax fasciatus*, encontrados no rio Mogi-Guaçu (Estado de São Paulo, Brasil), foram analisados bandamentos C, com cromomicina A₃ e hibridação fluorescente *in situ* com uma seqüência de DNA repetitivo (As51) previamente isolada de *Astyanax scabripinnis*. A heterocromatina constitutiva mostrou-se distribuída na região terminal do braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos e na região terminal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos, em ambos os citótipos padrão. Esta última região mostrou-se também GC rica após coloração com cromomicina A₃, e corresponde à localização de uma região organizadora de nucléolo, conforme já evidenciado em estudos anteriores. Foram detectados sítios de DNA satélite preferencialmente localizados na região terminal do braço longo de vários cromossomos, distribuídos em 4 pares submetacêntricos, em 3 pares subtlocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo padrão 2n=46, e em 3 pares submetacêntricos, em 4 pares subtlocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo padrão 2n=48. Algumas formas cariotípicas (cariótipos variantes), que divergem dos 2 citótipos tipo padrão, apresentaram também outros cromossomos portadores de DNA satélite As51,

destacando-se um cromossomo metacêntrico grande com um sítio terminal no braço longo (em dois cariótipos variantes), dois pares subtelocêntricos com um sítio intersticial extra (em um dos cariótipos variantes), e um par submetacêntrico com um sítio subterminal no braço longo (em um dos cariótipos variantes). É possível que o citótipo padrão $2n=46$ seja uma população invasora no rio Mogi-Guaçu, apresentando intercruzamento com o citótipo padrão $2n=48$. Assim, os cariótipos variantes representariam possíveis descendentes viáveis, onde rearranjos cromossômicos complementares poderiam propiciar novas localizações do DNA satélite analisado.

INTRODUÇÃO

O padrão de distribuição das bandas-C tem desempenhado um papel importante no estudo da diversificação cariotípica dos peixes Characiformes, como é o caso dos gêneros *Brycon* (Margarido e Galetti Jr., 1999) e *Leporinus* (Galetti Jr., *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 1998; Margarido e Galetti Jr., 2000), onde a macroestrutura cariotípica é relativamente constante, mas com diferenças marcantes quanto à heterocromatina entre espécies. A análise de DNAs satélites em peixes neotropicais, embora relativamente recente, tem fornecido dados importantes quanto à composição da heterocromatina e provável origem de cromossomos supranumerários e sexuais (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003).

A espécie *Astyanax fasciatus* tem sido considerada um complexo de espécies por estar amplamente distribuída pelos rios brasileiros e apresentar características cariotípicas diversas. Análises citogenéticas permitiram identificar pelo menos dois tipos de cariótipos ou citótipos principais, $2n=46$ e 48 cromossomos (Jim e Toledo, 1975; Morelli *et al.*, 1983; Paganelli, 1990; Justi, 1993; Daniel-Silva, 1996; Heras, 1998). Em Cachoeira de Emas (rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil), os dois citótipos padrão ocorrem sintopicamente,

além de algumas formas cariotípicas variantes com 45, 46 e 47 cromossomos (Daniel-Silva, 1996; Pazza *et al.*, 2005a). É possível que o citótipo padrão, com $2n=48$ cromossomos, seja o mais antigo na região e que o citótipo com $2n=46$ seja uma forma invasora, bastante similar à forma residente (Pazza *et al.*, 2005a).

Dando continuidade aos estudos sobre as possíveis relações entre os diferentes citótipos e as formas variantes, buscou-se caracterizar a heterocromatina constitutiva pelo bandamento C e coloração com cromomicina A₃, além da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com uma seqüência de DNA repetitivo (As51).

MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes de *Astyanax fasciatus* foram coletados em três regiões distintas ao longo do rio Mogi-Guaçu, situado na região Sudeste do Brasil (Figura 2.2): Ouro Fino – Estado de Minas Gerais (MG), nas proximidades de sua cabeceira (21 exemplares), Cachoeira de Emas, Pirassununga – Estado de São Paulo (SP), no trecho médio do rio (139 exemplares) e Barrinha – Estado de São Paulo (SP), próximo à sua confluência com o rio Pardo (22 exemplares).

Preparações cromossômicas e bandamentos

As preparações cromossômicas foram obtidas conforme Gold *et al.* (1990) e Bertollo *et al.* (1978). O bandamento-C e a coloração pelo fluorocromo Cromomicina A₃ seguiram as metodologias de Sumner (1972) e Schmid (1980), respectivamente. A classificação dos tipos cromossômicos em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtlocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), baseou-se na razão de braços, segundo Levan *et al.* (1964).

Hibridação fluorescente “in situ”

Para a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), foi utilizada sonda do DNA satélite pAs-51, isolada a partir de *A. scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000). As lâminas com os cromossomos foram incubadas com 90 µL de solução de RNase 0,4% em 2xSSC, a 37°C por uma hora, cobertas por lamínula; lavadas 3 vezes com 2xSSC e uma vez com 1xPBS em temperatura ambiente por 5 min. As lâminas foram, então, incubadas em uma solução de pós-fixação (1% formaldeído, 50 mM MgCl em 1xPBS) em temperatura ambiente por 10 min, lavadas com 1xPBS por 5 min e desidratadas em etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 min cada, e secadas ao ar. Os cromossomos foram desnaturados com formamida 70% em 0,1xSSC a 70°C por 5 minutos, desidratadas conforme descrito acima e secadas ao ar. A sonda foi marcada por “nick translation” com UTP-biotina de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). As sondas marcadas foram desnaturadas em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10% em 2xSSC) a 100°C por 10 min. As lâminas com cromossomos desnaturados foram incubadas com 40uL da solução de hibridação a 37°C “overnight”. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas com formamida 20% em 0,1xSSC (três vezes), com 0,1xSSC (duas vezes) e com 2xSSC (uma vez) a 42°C por 5 min cada; e com solução de lavagem (Tween 20 0,005% em 5xSSC) por 5 min em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em uma solução de NFDM (leite em pó desnatado) por 15 min em temperatura ambiente. Foram lavadas com solução de lavagem duas vezes por 5 min cada. Após, foram incubadas com avidina-fluoresceína (FITC-avidina) em solução de NFDM em câmara úmida escura em temperatura ambiente por 30 min (procedimento de detecção). Foram lavadas três vezes com solução de lavagem por 5 min cada. O sinal foi amplificado com uma incubação com 90uL de solução de anti-avidina (conjugada com biotina) em NFDM, em temperatura ambiente, por 30 min em câmara úmida escura e as lâminas foram

lavadas três vezes com solução de lavagem por 5 min cada, seguida por outro procedimento de detecção. O passo de amplificação foi repetido. Após, as lâminas foram desidratadas em etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 min cada e secadas ao ar. As lâminas foram então montadas com antifade “Vectashield Mounting Medium” com iodeto de propídio (1,5 µg/mL) (Vector Laboratories). As imagens de FISH foram capturadas com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics) em microscópio Olympus BX-50.

Identificação dos citótipos

Os dois citótipos padrão e as formas cariotípicas variantes foram identificados de acordo com Pazza *et al.* (2005a), ou seja: **citótipo A** (2n = 48 cromossomos - 8M, 22SM, 12ST, 6A - NF=90); **citótipo B** (2n = 46 cromossomos - 12M, 20SM, 10ST, 4A - NF=88); **variante 1** (2n = 46 cromossomos, diferindo do citótipo padrão B por apresentar dois cromossomos metacêntricos sem homologia, com tamanhos claramente distintos); **variante 2** (2n = 45 cromossomos, semelhante ao variante 1, mas apresentando também a ausência de um dos homólogos do primeiro par de cromossomos acrocêntricos); **variante 3** (2n = 47 cromossomos, diferindo do padrão B pela ausência de um dos homólogos do primeiro par de cromossomos submetacêntricos e pela presença de três pares de cromossomos acrocêntricos); **variante 4** (2n = 47 cromossomos, diferindo do padrão B pela presença de um cromossomo submetacêntrico pequeno extra); **variante 5** (2n = 47 cromossomos, diferindo do padrão B por um cromossomo acrocêntrico extra, de tamanho médio).

RESULTADOS

Em ambos os citótipos padrão, foram observadas regiões heterocromáticas centroméricas bem discretas, com blocos mais conspícuos localizados na região telomérica do

braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, e na região telomérica do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 3.5-c, d). Esta última região mostrou-se também positiva à cromomicina A₃, sendo portanto rica em pares de bases GC (Figura 3.5-a, b), correspondendo à localização de uma região organizadora de nucléolo (Pazza *et al.*, 2005a). Os sítios de DNA satélite As-51 foram detectados preferencialmente na região terminal do braço longo de vários cromossomos, distribuídos em 3 pares submetacêntricos, em 4 pares subtelocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo padrão A (Figura 3.6-a), e em 4 pares submetacêntricos, em 3 pares subtelocêntricos e em um par acrocêntrico no citótipo B (Figura 3.6-b). Os cariótipos variantes apresentaram outros cromossomos também portadores de DNA satélite pAs51, destacando-se um sítio terminal no braço longo de um cromossomo metacêntrico grande nos variantes 1 e 2 (Figura 3.7-a e b) e um sítio intersticial extra em um par de cromossomos subtelocêntricos no variante 5 (Figura 3.7-e).

DISCUSSÃO

O papel dos rearranjos cromossômicos no processo de especiação tem sido motivo de controvérsias, sendo discutido por diversos autores (White, 1978; Bickham e Baker, 1979; Sites Jr e Moritz, 1987; King, 1993; Rieseberg, 2001; Rockman e Rowell, 2002; Navarro e Barton, 2003). Paralelamente, alguns trabalhos têm procurado correlacionar a evolução cariotípica com filogenia de seqüências de DNA (Ortí *et al.*, 1996; Wang e Lan, 2000; García *et al.*, 2001; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004). Estas correlações são possíveis graças à observação de que o acúmulo de incompatibilidades, favorecido pelas diferenças cromossômicas, fornece barreiras genéticas que podem levar a um completo isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, à especiação (Navarro e Barton, 2003), favorecendo especialmente processos de especiação parapátrica e simpátrica (Rieseberg, 2001).

Entre os peixes neotropicais vários exemplos de variações cromossômicas em populações naturais já foram relatados, onde fissões e fusões cêntricas, inversões e presença de cromossomos supranumerários parecem ser os eventos mais frequentes, seguidos por alguns casos de poliploidia. Tais variações têm sido particularmente destacadas em prováveis complexos de espécies, como em *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000; Pazza e Julio Jr, 2003) e *Astyanax scabripinnis* (Moreira Filho e Bertollo, 1991; Maistro *et al.*, 1998; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a), bem como em *Apareiodon affinis* (Jorge e Moreira-Filho, 2000), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz e Bertollo, 2003), *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2000 e 2002a) e *Erythrinus erythrinus* (Bertollo *et al.*, 2004).

Análises citogenéticas prévias em *Astyanax fasciatus* permitiram identificar pelo menos dois tipos de citótipos principais ou padrão, com $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos (Jim e Toledo, 1975; Morelli *et al.*, 1983; Paganelli, 1990; Justi, 1993; Daniel-Silva, 1996; Heras, 1998, Pazza *et al.*, 2005a), sendo que na região de Cachoeira de Emas (rio Mogi-Guaçu), algumas formas cariotípicas variantes foram encontradas em sintopia com os citótipos padrão (Paganelli, 1990, Daniel-Silva, 1996; Heras, 1998; Pazza *et al.*, 2005a). A análise da frequência dos citótipos ao longo do rio Mogi-Guaçu permitiu inferir que um dos citótipos parece representar a forma cariotípica nativa ($2n=48$) enquanto o outro representaria uma forma invasora ($2n=46$), sendo as formas variantes decorrentes de prováveis hibridizações entre os dois citótipos padrão e/ou seus descendentes (Pazza *et al.*, 2005a). De fato, marcadores moleculares (RAPD e ISSR) indicam a possibilidade de fluxo gênico entre os citótipos padrão e as formas variantes (análises em andamento). A manutenção de características comuns entre os dois citótipos, como a localização dos genes ribossômicos 18S e 5S, bem como vários traços macrocariotípicos sugerem uma divergência recente entre esses

dois grupos, representativos de populações divergentes de *A. fasciatus* ou mesmo espécies distintas (Pazza *et al.*, 2005a).

O padrão similar de distribuição da heterocromatina constitutiva nos dois citótipos padrão (Figura 3.5-c, d) reforça a proximidade entre eles. Em *A. fasciatus* é possível identificar dois tipos principais de distribuição da heterocromatina, um deles semelhante ao observado no presente estudo, mostrando blocos heterocromáticos preferencialmente na região distal do braço longo de cromossomos submetá-, subtelo- e acrocêntricos (Justi, 1993; Heras, 1998; Centofante *et al.*, 2003; presente trabalho), e o outro mostrando porções heterocromáticas pericentroméricas na maior parte dos cromossomos (Justi, 1993). Assim sendo, é possível que a distribuição da heterocromatina nesse grupo possa representar uma característica importante para estudos de inter-relações entre diferentes populações. Sobretudo no complexo *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), a heterocromatina constitutiva tem se mostrado eficaz na identificação de polimorfismos, caracterizando a variabilidade presente em algumas espécies (Mantovani *et al.*, 2000).

A coloração por cromomicina A₃ (CMA₃) mostrou que apenas a heterocromatina relacionada à RON é rica em pares de bases GC (Figura 3.5). Embora nos vertebrados inferiores as regiões CMA₃ positivas tem geralmente uma boa correlação com as RONS (Amemiya e Gold, 1986; Schmid, 1980), são conhecidos sítios heterocromáticos CMA₃ positivos que não mostram nenhuma associação com as RONS nesses organismos (Souza *et al.*, 1996; Artoni *et al.*, 1999; Margarido e Galetti Jr, 2000, Kavalco *et al.*, 2004b). Particularmente no gênero *Astyanax* já foram também identificadas regiões heterocromáticas associadas às RONS que se apresentam GC-ricas, ou com uma quantidade balanceada de bases AT/ GC (Kavalco *et al.*, 2005), ou mesmo com uma predominância (59%) de bases AT (Mestriner *et al.*, 2000).

O DNA satélite As-51 consiste em uma seqüência de 51pb, similar a porções do retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* e, em menor extensão, com o gene da transposase do transposon TN4430 do *Bacillus thuringiensis* (Mestriner *et al.*, 2000). A localização desta seqüência nos cromossomos de uma população de *Astyanax scabripinnis* possibilitou mostrar que um macrocromossomo B metacêntrico, presente nessa população, corresponde a um isocromossomo (Mestriner *et al.*, 2000). Entre populações de *A. scabripinnis* ocorre uma variação no número de cromossomos com sítios As-51 evidenciados por FISH, desde muitos cromossomos marcados, como em populações de Londrina e Maringá – bacia do rio Paraná - até nenhum sítio evidente, como em uma população de Curral das Éguas – bacia do rio São Francisco (Abel, 2001). *Astyanax parahybae* (anteriormente citada como *A. fasciatus parahybae*) também apresenta poucos cromossomos com o satélite As-51, enquanto *A. giton* e *A. intermedius* - todos da bacia do rio Paraíba do Sul - não mostram esse tipo de DNA nos cromossomos (Kavalco *et al.*, 2005), reforçando a hipótese de que o gênero *Astyanax* não seja um grupo monofilético (Weitzman e Malabarba, 1998).

Nos dois citótipos padrão de *A. fasciatus*, vários pares de cromossomos são portadores de seqüência similar do DNA satélite As-51 (Figura 3.6), sendo o número de sítios bastante superior àquele observado na população de *A. scabripinnis* da qual esse tipo de DNA foi isolado. Assim sendo, e considerando igualmente os demais resultados já obtidos em *Astyanax*, não se pode também descartar a hipótese de que poucas cópias de As-51 representem uma condição ancestral, a qual se modificou ao longo de um processo evolutivo pelo aumento de número de cópias por dispersão. Embora a maior parte dos sítios desse DNA pareça estar localizada em cromossomos homeólogos, é possível observar algumas diferenciações mais marcantes, como a presença de um sítio no primeiro par de cromossomos subteloicêntricos, específico para o citótipo $2n=48$, bem como de um sítio localizado no primeiro par de cromossomos acrocêntricos, específico para o citótipo $2n=46$. Tais diferenças,

somadas àquelas relativas ao número diplóide e fórmulas cariotípicas, destacam a divergência entre os citótipos padrão, onde rearranjos Robertsonianos e não-Robertsonianos estariam implicados na evolução cromossômica dessas duas formas de *A. fasciatus*.

No que se refere às formas variantes, a localização geral dos sítios do DNA satélite As-51 corresponde, *a priori*, àquela que foi observada nos citótipos padrão, ou seja, na região terminal do braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Contudo, além de alguns variantes apresentarem um maior número de sítios As-51, a exemplo dos **variantes 1 e 5** (Figura 3.7-a, e), observam-se alguns cromossomos portadores de DNA satélite As-51 que não foram constatados nos citótipos padrão. Assim, nos **variantes 1 e 2** destaca-se um cromossomo metacêntrico grande, com um sítio As-51 na região distal do braço longo (Figura 3.7-a, b). É possível que tal cromossomo seja resultante de um rearranjo intercromossômico, envolvendo um cromossomo acrocêntrico portador de um sítio As-51 terminal no braço longo. Esta hipótese é reforçada pela ausência de um desses cromossomos no **variante 2**: $2n=45$ (Figura 3.7-b). Por sua vez, no **variante 5** destaca-se um par de cromossomos subtelocêntricos com um sítio intersticial extra no braço longo (Figura 3.7-e), sugerindo uma provável inversão paracêntrica. Inversões paracêntricas são raramente detectadas em peixes, muito possivelmente pela ausência de marcadores adequados, embora sítios Ag-RONs tenham evidenciado inversões paracêntricas em Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1984; Jesus e Moreira-Filho, 2000), assim como sítios de rDNA 5S em *Upsilonodus* sp. (Kavalco *et al.*, 2004a).

Embora os cariótipos variantes apresentem uma estrutura cariotípica mais similar ao citótipo $2n=46$, há indícios de que cromossomos característicos do citótipo $2n=48$ tenham sido neles incorporados, sugerindo que tais variantes sejam decorrentes de intercruzamentos viáveis entre os dois citótipos padrão e/ou seus descendentes que ainda compartilham uma série de homologias quanto a alguns marcadores cromossômicos (Pazza *et*

al., 2005a; presente trabalho). A presença de um maior número de sítios As-51 em alguns variantes pode reforçar, de certa forma, uma origem por intercruzamentos. Assim sendo, os sítios As-51, que se mostraram específicos de algumas formas variantes, seriam decorrentes de rearranjos cromossômicos complementares propiciando novas localizações desse DNA satélite nos cariótipos.

AGRADECIMENTOS

Estudo financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 01/02777-5).



Figura 3.6 - Citótipos padrão de *Astyanax fasciatus* (a) 2n=48 e (b) 2n=46, evidenciando os cromossomos portadores de DNA satélite As-51, após hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

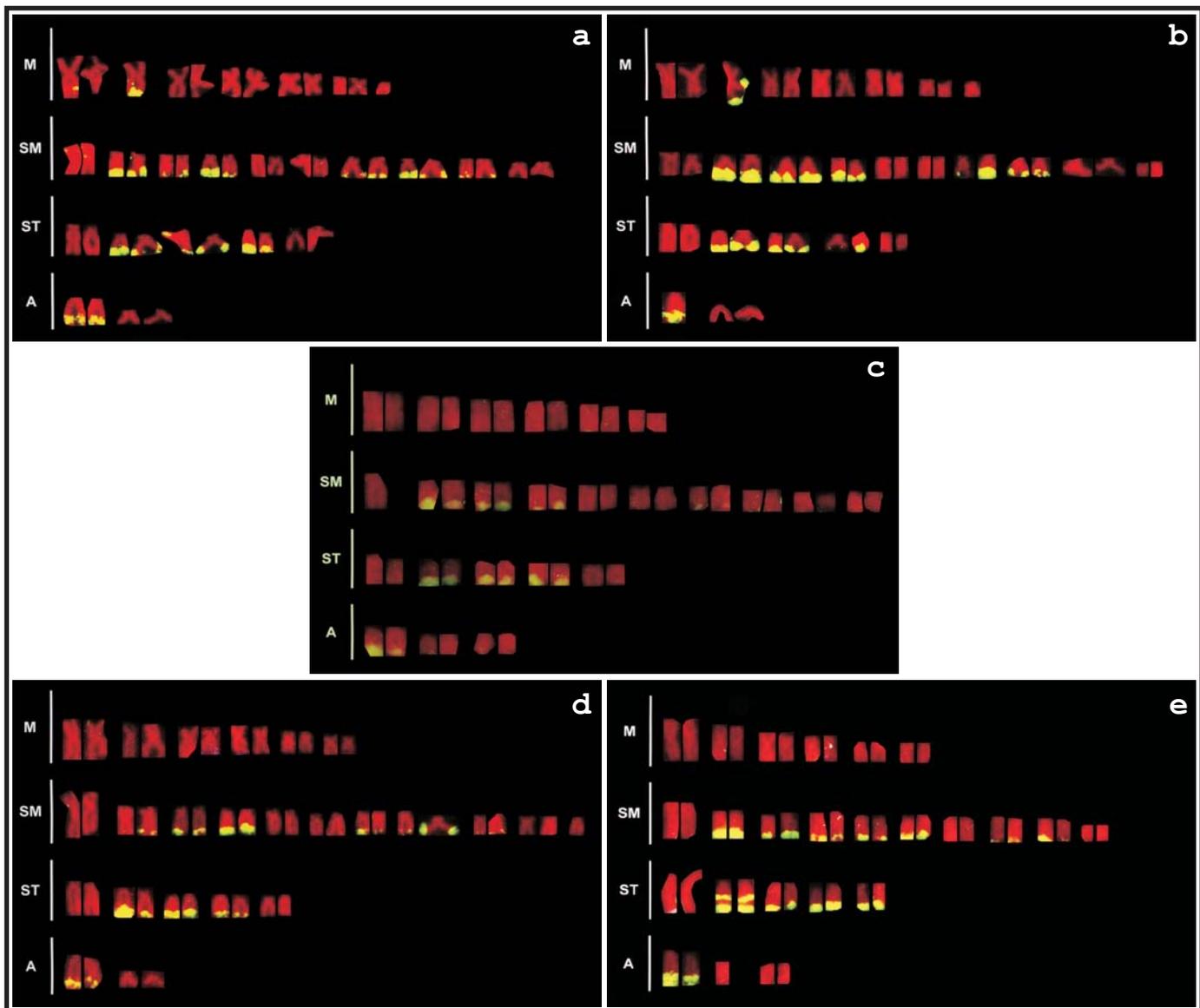


Figura 3.7 - Cariótipos variantes de *Astyanax fasciatus* evidenciando os cromossomos portadores de DNA satélite As-51, após hibridação fluorescente *in situ* (FISH). (a) **variante 1**: $2n=46$; (b) **variante 2**: $2n=45$; (c) **variante 3**: $2n=47$; (d) **variante 4**: $2n=47$; (e) **variante 5**: $2n=47$.

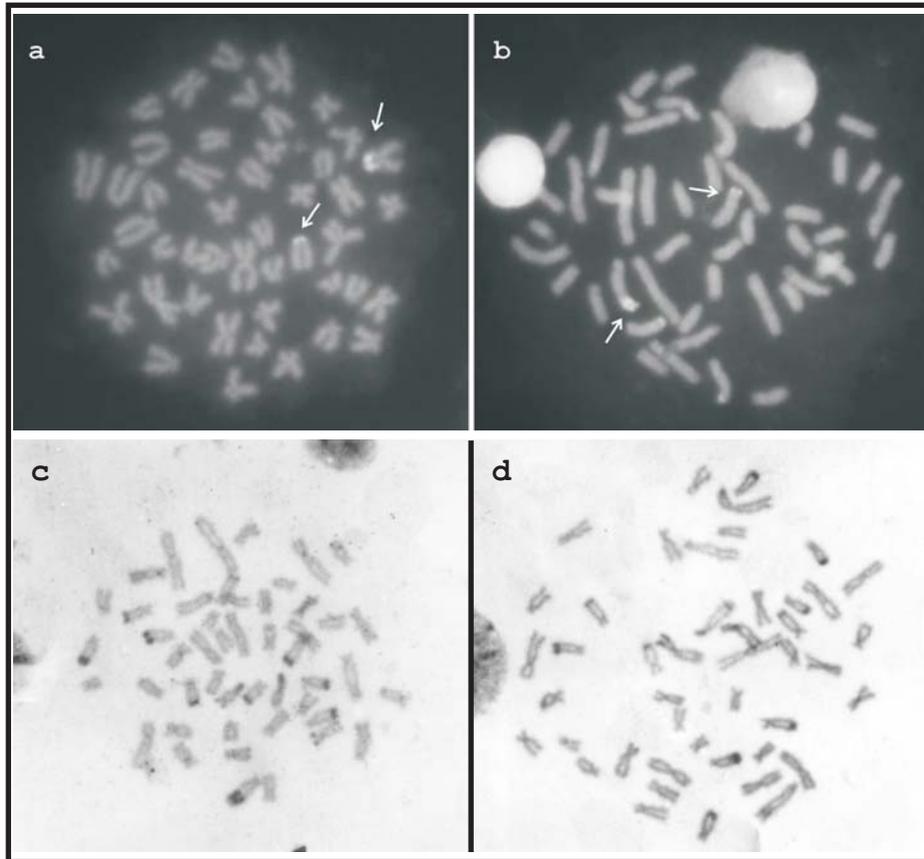
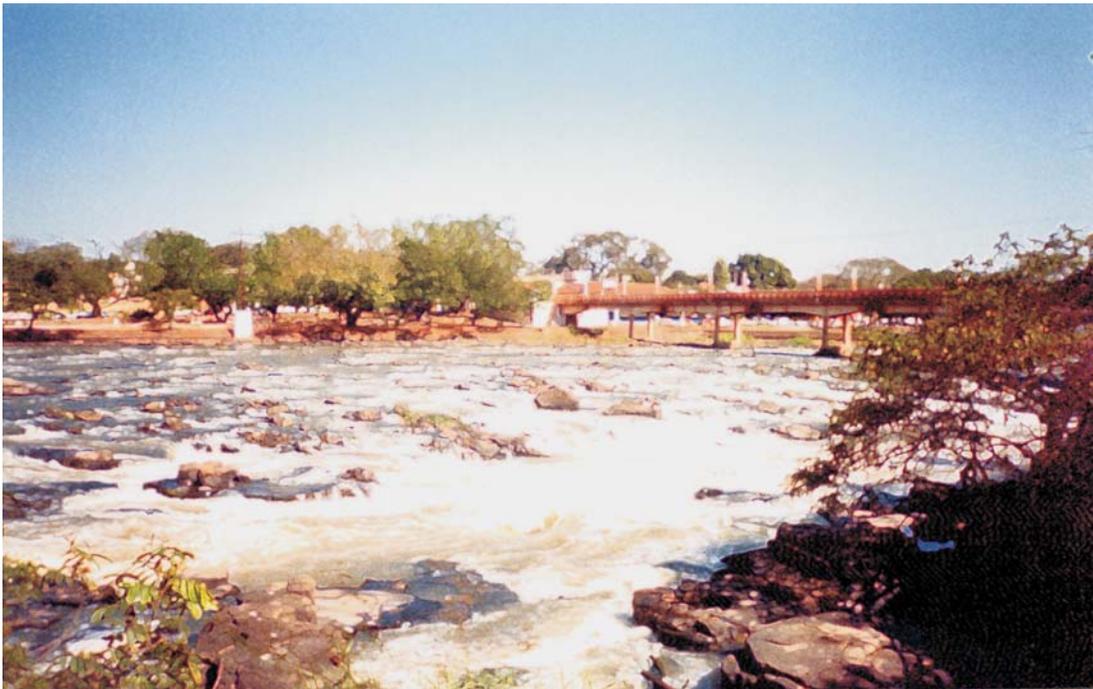


Figura 3.5 - Metáfases dos citótipos padrão de *Astyanax fasciatus*. (a) citótipo $2n=46$ e (b) citótipo $2n=48$ após tratamento com cromomicina A_3 , destacando as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC. (c) citótipo $2n=48$ e (d) citótipo $2n=46$, evidenciando blocos heterocromáticos conspícuos na região telomérica de vários cromossomos.

“O problema com as boas idéias é que elas acabam dando muito trabalho”.
Peter F. Drucker



Capítulo III

POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 3 – Análises de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Bertollo, L.A.C.

RESUMO

Marcadores moleculares de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e “inter-simple sequence repeats” (ISSR) foram utilizados para complementar o estudo do polimorfismo cromossômico em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do rio Mogi-Guaçu (Sudeste do Brasil), analisado em três pontos de coletas ao longo do rio (Ouro Fino, MG; Cachoeira de Emas, SP e Barrinha, SP). Dois citótipos, ou tipos cariotípicos foram previamente caracterizados, um com $2n=46$ cromossomos e outro com $2n=48$ cromossomos, denominados citótipos padrão, onde todos os cromossomos do complemento formam pares de homólogos. Adicionalmente, formas cariotípicas variantes, com $2n=45$, 46 e 47 cromossomos, foram também detectadas, embora com uma frequência mais reduzida em relação aos citótipos padrão. O RAPD mostrou-se pouco informativo na análise da situação observada, indicando altos valores de migrantes por geração entre os citótipos. O ISSR, por outro lado, mostrou uma pequena estruturação, principalmente entre os citótipos padrão provenientes da região de Barrinha (SP), onde o N_m foi de 0,4301, com identidade genética de 0,6862 e distância genética de 0,3765. Entretanto, os resultados gerais obtidos não descartam a possibilidade de intercruzamentos entre os dois citótipos padrão e/ou seus descendentes como fonte da variação cromossômica. A associação entre os marcadores citogenéticos e moleculares permitiu considerar um provável panorama explicativo para a origem e evolução das formas constatadas em *A. fasciatus*.

INTRODUÇÃO

Astyanax fasciatus caracteriza-se como uma “espécie” diversificada do ponto de vista citogenético, apresentando distintos citótipos, cada um deles com seus variantes específicos. A ocorrência simpátrica e sintópica de diferentes citótipos levanta a hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma denominação comum. Assim, ao longo do rio Mogi-Guaçu, na região Sudeste do Brasil, dois citótipos padrão podem ser observados ($2n=46$ e 48 cromossomos), com diferentes frequências de distribuição entre sítios distintos de coleta, além de formas cariotípicas variantes, com $2n = 45, 46$ e 47 cromossomos, principalmente na região de Cachoeira de Emas (Pazza *et al.*, 2005a, b; Figura 3.8).

O RAPD é um marcador molecular amplamente empregado para análises de variabilidade genética por sua simplicidade e rapidez, não requerendo informações genéticas prévias das amostras em estudo (Beebe e Rowe, 2004), embora não apresente informações específicas por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Basicamente, é uma variação da técnica de amplificação via PCR, utilizando um primer único de seqüência arbitrária que irá amplificar uma região aleatória do genoma analisado. Embora a reprodutibilidade deste marcador tenha sido questionada anteriormente (Penner *et al.*, 1993), ajustes na técnica têm possibilitado a obtenção de resultados reprodutíveis (Bielawski *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1998) permitindo a utilização deste marcador em diversos tipos de análise genética.

Os marcadores ISSR são gerados de reações de PCR com primer único, desenhado a partir de repetições de dois ou três nucleotídeos ancorados em uma seqüência de um a três nucleotídeos, que visam eliminar artefatos decorrentes de *slippage* (Zietkiewicz *et al.*, 1994). As regiões amplificadas representam a seqüência entre dois sítios de microssatélites e a ausência de bandas é interpretada como divergência do primer ou perda de um locus pela deleção do sítio SSR ou rearranjo cromossômico (Wolfe e Liston, 1998).

Algumas vantagens deste marcador são as pequenas quantidades de DNA necessárias para as reações, o pequeno número de reações de PCR, a hiper-variabilidade dos padrões de banda e a facilidade na detecção das mesmas, além das altas temperaturas de anelamento nas reações de PCR que reduzem a quantidade de artefatos e erros na reação (Wolfe *et al.*, 1998a).

Marcadores moleculares de DNA têm sido empregados como ferramenta em diversos estudos, como análise da variabilidade genética e do fluxo gênico, identificação de espécies, e até mesmo em diferenças sexuais nos níveis de comportamento individual e estruturas de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Wolfe *et al.*, 1998a e b; Fernandes-Matioli *et al.*, 2000; Liu e Wendel, 2001; Prioli *et al.*, 2002; Vasconcellos *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2003; Arcade *et al.*, 2000; Haig *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2003; Hatanaka e Galetti Jr., 2003; Leuzzi *et al.*, 2004; entre outros). Dando continuidade aos estudos sobre a variabilidade cromossômica em *Astyanax fasciatus*, relacionamos as diferentes formas cariotípicas encontradas com marcadores moleculares de DNA (RAPD e ISSR), a fim de testar a possibilidade de fluxo gênico e estimar a variabilidade genética entre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e Extração do DNA

Vinte e três indivíduos foram utilizados para as análises com os marcadores moleculares, sendo amostrados diferentes citótipos de *Astyanax fasciatus* (citótipos padrão com $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos, e formas variantes com $2n=45$, $2n=46$ e $2n=47$ cromossomos). Os espécimes foram coletados ao longo do rio Mogi-Guaçu, em três pontos de coletas: (a) Ouro Fino – MG, região nas proximidades da cabeceira do rio; (b) Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP, região localizada num trecho mediano do rio e caracterizada pela

ocorrência de uma barragem e (c) Barrinha-SP, região nas proximidades de sua foz com o rio Pardo o qual, por sua vez, desemboca no rio Grande (Figura 3.8). Amostras de fígado foram mantidas em etanol 98%, a -20°C , até o momento do uso. Os exemplares foram fixados em formaldeído 10% durante 48 horas e posteriormente transferidos para etanol 70%.

O DNA foi extraído do fígado de acordo com Aljanabi e Martinez (1997), com algumas modificações. Cerca de 1 mm^3 de tecido hepático foi homogeneizado em $400\ \mu\text{L}$ de tampão salino estéril (NaCl 0,4 M; Tris-HCl pH 8,0, 10 mM; EDTA pH 8,0, 2 mM), usando um pistilo homogeneizador, por 10-15 segundos. Foram adicionados $40\ \mu\text{L}$ de tampão SDS 20% (concentração final de 2%) e $8\ \mu\text{L}$ de proteinase K 20 mg/mL (concentração final de $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$). As amostras foram então incubadas em banho-maria a $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$, com duração mínima de 5 horas. Após a incubação, foram adicionados $300\ \mu\text{L}$ de NaCl 6 M, seguindo-se agitação em vortex por 1 minuto, em velocidade máxima e centrifugação a $10.000\ \text{g}$, por 30 minutos.. O sobrenadante foi então transferido para tubos estéreis, adicionando-se um volume igual de isopropanol a cada amostra. Depois de bem misturadas, as amostras foram incubadas a -20°C , por 1 hora, e centrifugadas a $10.000\ \text{g}$, por 20 minutos. O pellet foi lavado em etanol 70%, seco e finalmente ressuspendido em $50\ \mu\text{L}$ de água MilliQ. Após a quantificação, as amostras foram incubadas durante 1 hora, com $2\ \mu\text{L}$ RNase 10 mg/mL, a 37°C , por 1 hora, para eliminação de impurezas, como RNA. Para otimização das reações de ISSR e RAPD, o material foi lavado em fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. O DNA foi então precipitado em etanol 100% e NaCl 5 M, armazenado a -20°C e quantificado. Utilizou-se para comparação visual alíquotas de DNA de fago λ . As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e coradas com brometo de etídeo ($20\ \mu\text{g}/100\ \text{mL}$).

Reações de amplificação de RAPD

Nos testes iniciais das reações de PCR foram utilizados 19 primers, sendo 10 do kit X (2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15 e 16) e 9 do kit W (3, 4, 9, 13, 14, 15, 16, 17 e 19) da Operon Technologies (Alameda, CA, USA) e DNA de *Astyanax fasciatus*. Os primers que produziram número significativo de fragmentos e bandas visíveis foram escolhidos para as análises de RAPD. As reações de PCR continham tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 mM, dNTP 0,2 mM, *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen) 1 U/reação, DNA 10 ng e água deionizada até completar um volume final de 13 µL. As reações foram aquecidas a 94°C por 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos de 1 minuto a 94°C; de 1 minuto a 36°C e de 2 minutos a 72°C. Imediatamente após o último ciclo, as reações foram mantidas a 72°C por 10 minutos, a 20°C por mais 10 minutos e então resfriadas a 4°C. O DNA amplificado pela reação de PCR foi submetido à eletroforese (3 V.cm⁻¹ por 5-6 horas) em gel de agarose a 1,4% e corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). Em cada reação foi incluído um controle negativo, contendo o mix de reação sem o DNA. Os géis foram visualizados sob radiação UV e as imagens foram capturadas com o sistema EDAS-290 da Kodak. O tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando-se um padrão (Ready-Load 100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

Reações de amplificação de ISSR

Nos testes iniciais das reações de PCR foram utilizados 8 primers (GGAC)₃A, (GGAC)₃C, (GGAC)₃T, (TGTC)₄, (GGAC)₄, (GGAT)₄, (TAGG)₄, (GACA)₄ e DNA de *Astyanax fasciatus*. Os primers que produziram número razoável de fragmentos e bandas visíveis foram escolhidos para as análises de ISSR. As reações de PCR continham tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 mM, dNTP 0,2 mM, *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen) 1 U/reação, DNA 10ng, e água

deionizada até completar um volume final de 13 μ L. As reações foram submetidas a 5 ciclos de 45 segundos a 94°C; de 1 minuto a 51°C e de 1 minuto a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C; de 1 minuto a 48°C, de 1 minuto a 72°C e então resfriadas a 4°C. O DNA amplificado pela reação de PCR foi submetido à eletroforese, seguindo a mesma metodologia empregada para as análises de RAPD.

Análise dos dados

A distância genética, baseada nos marcadores RAPD e ISSR, bem como a identidade genética, foram estimadas de acordo com Nei (1978) e o número de migrantes por geração (Nm) foi calculado a partir da estimativa do G_{ST} (Slatkin e Barton, 1989), utilizando-se o software Popgen 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Os dendrogramas, baseados nos índices de similaridade de Nei e Li (1979), bem como os dendrogramas de parcimônia, foram construídos com o software MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

RESULTADOS

Dez primers de RAPD e 4 primers de ISSR foram escolhidos por apresentarem melhor repetibilidade, resolução e padrão de amplificação. As amplificações resultaram em 59 loci para RAPD, com tamanhos variáveis entre 0,2 e 1,4 kb, com 88,14% de loci polimórficos. As amplificações de ISSR resultaram em 35 loci, com tamanhos variáveis entre 0,4 e 1,4 kb, com 91,43% de loci polimórficos. As bandas mais evidentes foram combinadas em uma matriz de dados binários de presença e ausência. Várias simulações foram feitas agrupando-se os diferentes citótipos e formas variantes para os cálculos de Nm, distância genética e identidade genética de Nei (1978) (Tabela 3.3). O dendrograma de Neighbor-Joining construído a partir da matriz de similaridade genética de Nei e Li (1979) baseado nos dados de RAPD não evidenciaram agrupamentos consistentes, tendo baixos valores de

bootstrap (Figura 3.9-a). É possível perceber que não há agrupamento de populações ou citótipos específicos. O mesmo foi observado no dendrograma de máxima parcimônia (Figura 3.9-b). Por sua vez, o dendrograma de Neighbor-Joining construído a partir da matriz de similaridade genética de Nei e Li (1979) dos dados de ISSR permitiram identificar um clado formado pelo agrupamento do citótipo $2n=48$, embora com baixo bootstrap (3%), em especial dos indivíduos provenientes de Barrinha-SP, cujo ramo obteve bootstrap de 56% (Figura 3.10-a). De modo semelhante, o dendrograma de máxima parcimônia construído a partir da matriz de dados de ISSR separou os indivíduos de Barrinha e mais um indivíduo $2n=48$ cromossomos de Cachoeira de Emas com bootstrap de 62% (Figura 3.10-b).

DISCUSSÃO

Os peixes neotropicais representam um excelente material de estudo de evolução cariotípica. São conhecidos diversos casos de variações cromossômicas em populações naturais, onde fissões e fusões cêntricas, inversões, cromossomos supranumerários e poliploidia representam os eventos mais freqüentes. Tais variações têm sido particularmente destacadas em prováveis complexos de espécies, como *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000; Pazza e Julio Jr, 2003), *Astyanax scabripinnis* (Moreira Filho e Bertollo, 1991; Maistro, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a), *Apareiodon affinis* (Jorge e Moreira-Filho, 2000), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz e Bertollo, 2003), *Erythrinus erythrinus* (Bertollo *et al.*, 2004) e *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2000, 2002a). Entretanto, a correlação entre a diversidade cariotípica e marcadores moleculares é ainda incipiente, embora alguns estudos tenham apresentado resultados promissores. Pazza e Júlio Jr. (2003), encontraram três citótipos simpátricos de *H. malabaricus* na região de Porto Rico (PR), na planície de inundação do alto rio Paraná, sem evidência de híbridos entre eles. Prioli *et al.* (2004), analisando os mesmos

espécimes utilizados nos estudos citogenéticos, detectaram padrões eletroforéticos de ISSR distintos para cada citótipo, evidenciando uma forte estruturação genética entre os citótipos de *H. malabaricus* do alto rio Paraná. Fernandes-Matioli *et al.* (2000), utilizaram esses mesmos marcadores em espécies do gênero *Gymnotus* (Gymnotiformes), obtendo padrões intraespecíficos conservados, além de um polimorfismo para *G. sylvius*, onde diferentes populações apresentaram de um a três padrões de bandas eletroforéticas.

Astyanax fasciatus distribuiu-se amplamente na região neotropical sendo reconhecidas várias subespécies, algumas delas elevadas ao status de espécie, como *A. mexicanus* e *A. parahybae*. Estudos citogenéticos têm mostrado que *A. fasciatus* apresenta uma variabilidade cariotípica, tanto inter- como intrapopulacional (Justi, 1993; Heras, 1998). No rio Mogi-Guaçu (SP), dois citótipos padrão, com $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos, alternaram em frequência dependendo do ponto de coleta, havendo ainda formas cariotípicas variantes com $2n=45$, $2n=46$ (distinto do citótipo padrão) e $2n=47$ cromossomos (Pazza *et al.*, 2005a e b). Dados de marcadores moleculares de RFLP (Moysés e Almeida-Toledo, 2002), associados aos marcadores citogenéticos, possibilitaram considerar o citótipo padrão $2n=48$ como a provável forma residente do rio Mogi-Guaçu, enquanto o citótipo $2n=46$ corresponderia a uma forma invasora, as quais manteriam a capacidade de intercruzamento originando formas cariotípicas variantes (Pazza *et al.*, 2005a, b).

Os dados de RAPD não permitiram identificar uma estrutura de população para os citótipos padrão de *Astyanax fasciatus*, obtendo-se um alto número de migrantes por geração (5,7826) e uma pequena distância genética (0,039), mesmo levando em consideração o baixo número de indivíduos amostrados. Não há evidências de que um aumento no número de indivíduos alteraria os resultados obtidos nessa análise. O dendrograma de Neighbor-Joining construído a partir de matrizes de complementos (1-Similaridade) dos coeficientes de similaridade de Nei e Li (1979), obtidas com marcadores RAPD, também não evidenciaram

nenhum tipo de estrutura de população, apresentando valores de bootstrap muito baixos entre os ramos pouco definidos (Figura 3.9a). Adicionalmente, o dendrograma de parcimônia, construído a partir dos dados de RAPD, reforçou a ausência de estruturação, além de seus ramos não terem bom suporte por seu baixo bootstrap (Figura 3.9-b).

Os resultados de ISSR, por sua vez, não identificaram nenhum padrão de bandas eletroforéticas específico para os diferentes tipos de cariótipos detectados, como observado em *Gymnotus* (Fernandes-Matioli *et al.*, 2000) e em *Hoplias malabaricus* (Prioli *et al.*, 2004). No entanto, foi possível observar uma pequena estruturação entre os citótipos padrão, através dos dendrogramas de similaridade. Vale destacar os dados para diferentes populações de $2n=48$ cromossomos, que apresentam valores relativamente baixos de N_m (0,3774), assim como de identidade genética entre as populações de Ouro Fino e Barrinha (0,7248). Também merecem destaque os resultados com os citótipos padrão provenientes de Barrinha, que apresentaram um valor de N_m (0,4301) e índices de identidade genética (0,6862) e distância genética (0,3765) condizentes com espécies distintas. Os valores de bootstrap para os ramos do dendrograma de similaridade, obtidos com marcadores ISSR, também foram bastante baixos (Figura 3.10-a), exceto no ramo que separa 4 indivíduos de $2n=48$ cromossomos (58%), entre eles os três indivíduos de Barrinha (56%), o que sugere um princípio de estruturação. O dendrograma de máxima parcimônia construído a partir da matriz de dados de ISSR também separou os mesmos 4 indivíduos, com bootstrap de 62% (Figura 3.10-b). Os valores de distância genética (0,3219) e de identidade genética (0,7248) entre os citótipos $2n=48$ de Barrinha e Ouro Fino evidenciam uma certa diferenciação entre os mesmos, possibilitando sugerir que os espécimes de Barrinha possam corresponder a migrantes procedentes do rio Grande (Figura 3.8), onde o citótipo $2n=48$ é também encontrado (Swerts *et al.*, 1998). Assim sendo, o fluxo gênico entre populações $2n=48$ situadas à jusante e à montante da barragem de Cachoeira de Emas poderia ser dificultado,

como é o caso das populações de Barrinha e de Ouro Fino, respectivamente. A barragem de Cachoeira de Emas é, na realidade, um obstáculo que dificulta o livre acesso das populações de peixes ao longo do rio Mogi-Guaçu, o que poderia também explicar os baixos índices de distância genética entre os espécimes de Cachoeira de Emas, coletados abaixo da barragem e de Barrinha (Tabela 3.3). Dessa forma, os animais provenientes de regiões à jusante da referida barragem teriam certa dificuldade em transpô-la durante os ciclos de migração, na época da reprodução, embora não sejam impedidos de retornar ao lugar de origem.

Ao que tudo indica, os dois citótipos padrão, $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos devem representar formas divergentes de *A. fasciatus* que ainda mantém uma boa identidade genética. Dados de hibridação fluorescente *in situ* com rDNA 18S e 5S (Pazza *et al.*, 2005a), e de distribuição de DNA satélite (Pazza *et al.*, 2005b), puderam evidenciar diversos cromossomos aparentemente homeólogos entre os dois citótipos. O valor de Nm (5,7826 para RAPD e 1,5868 para ISSR) encontrado entre as formas padrão (Tabela 3.3), suporta os dados citogenéticos de que as formas cariotípicas variantes podem decorrer de intercruzamentos. Embora os cariótipos variantes apresentem uma estrutura mais similar ao citótipo $2n=46$, há evidências de que cromossomos característicos do citótipo $2n=48$ tenham sido neles incorporados, sugerindo que tais variantes sejam decorrentes de intercruzamentos viáveis entre os dois citótipos padrão e/ou seus descendentes (Pazza *et al.*, 2005b). Assim, os marcadores moleculares ISSR corroboram os dados citogenéticos, embora um tempo provavelmente recente de divergência possa estar contribuindo para os baixos valores de bootstrap ou, até mesmo, com os intercruzamentos considerados. De qualquer forma, a diversidade cariotípica constatada nos espécimes de *A. fasciatus* do rio Mogi-Guaçu não se reflete em nível morfológico, uma vez que, embora pareçam diferentes dos demais *A. fasciatus* da bacia do rio Paraná, não é possível distinguir entre os dois citótipos padrão (Filipe G. A. Melo, Museu Nacional do Rio de Janeiro, informação pessoal).

A. fasciatus constitui um modelo muito interessante para estudos evolutivos. A associação entre os marcadores moleculares e os marcadores citogenéticos permitiu elaborar uma proposta explicativa para a origem e evolução das formas constatadas no rio Mogi-Guaçu, a qual poderá ser posteriormente testada por um estudo de filogeografia baseado em seqüências mitocondriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Paulo A. Buckup, PhD e Filipe G. A. Melo, MSc, do Museu Nacional do Rio de Janeiro, pela identificação dos espécimes estudados e ao NUPÉLIA (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura), da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio experimental em parte deste trabalho. Estudo financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 01/02777-5).

Tabela 3.3 – Número de migrantes por geração (Nm), identidade genética (Ident) e distância genética (Dist) entre as amostras simuladas nas análises da matriz de dados binários, obtidos pelos marcadores moleculares RAPD e ISSR.

Amostras Simuladas	RAPD			ISSR		
	Nm	Ident	Dist	Nm	Ident	Dist
Indivíduos padrão						
2n=46 / 2n=48	5,7826	0,9617	0,0390	1,5868	0,8635	0,1468
Ouro Fino / Cachoeira de Emas		0,8696	0,1397		0,8362	0,1789
Ouro Fino / Barrinha	1,2688	0,8646	0,1455	1,0076	0,8182	0,2007
Cachoeira de Emas / Barrinha		0,9407	0,612		0,9682	0,0323
2n=46 Padrão						
Barrinha / Cachoeira de Emas	1,9106	0,9060	0,0987	2,8922	0,9576	0,0433
2n=48 Padrão						
Ouro Fino / Cachoeira de Emas		0,8090	0,2119		0,9250	0,0780
Ouro Fino / Barrinha	0,5958	0,8236	0,1941	0,3774	0,7248	0,3219
Cachoeira de Emas / Barrinha		0,8645	0,1456		0,8588	0,1522
Por local de coleta						
Ouro Fino / Cachoeira de Emas		0,8862	0,1209		0,8840	0,1233
Ouro Fino / Barrinha	1,5428	0,8695	0,1399	1,6163	0,8790	0,1290
Cachoeira de Emas / Barrinha		0,9384	0,0636		0,9710	0,0294
Barrinha – 2n=46 / 2n=48	1,4631	0,9046	0,1003	0,4301	0,6862	0,3765
Cachoeira de Emas – 2n=46 / 2n=48		0,8662	0,1436		0,8525	0,1596
Cachoeira de Emas – 2n=46 / variantes	1,4333	0,9297	0,0729	1,2402	0,9645	0,0361
Cachoeira de Emas – 2n=48 / variantes		0,8920	0,1143		0,8995	0,1059

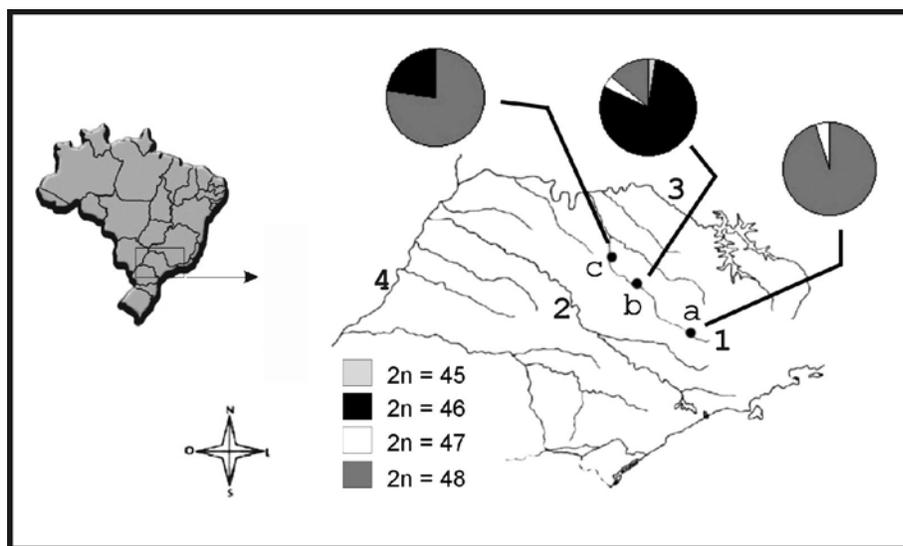


Figura 3.8 - Mapa hidrográfico parcial da região Sudeste do Brasil, evidenciando a frequência dos números cromossômicos nos respectivos pontos de coleta. A) Ouro Fino - MG; b) Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP; c) Barrinha - SP. 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Tietê; 3) rio Grande; 4) rio Paraná.

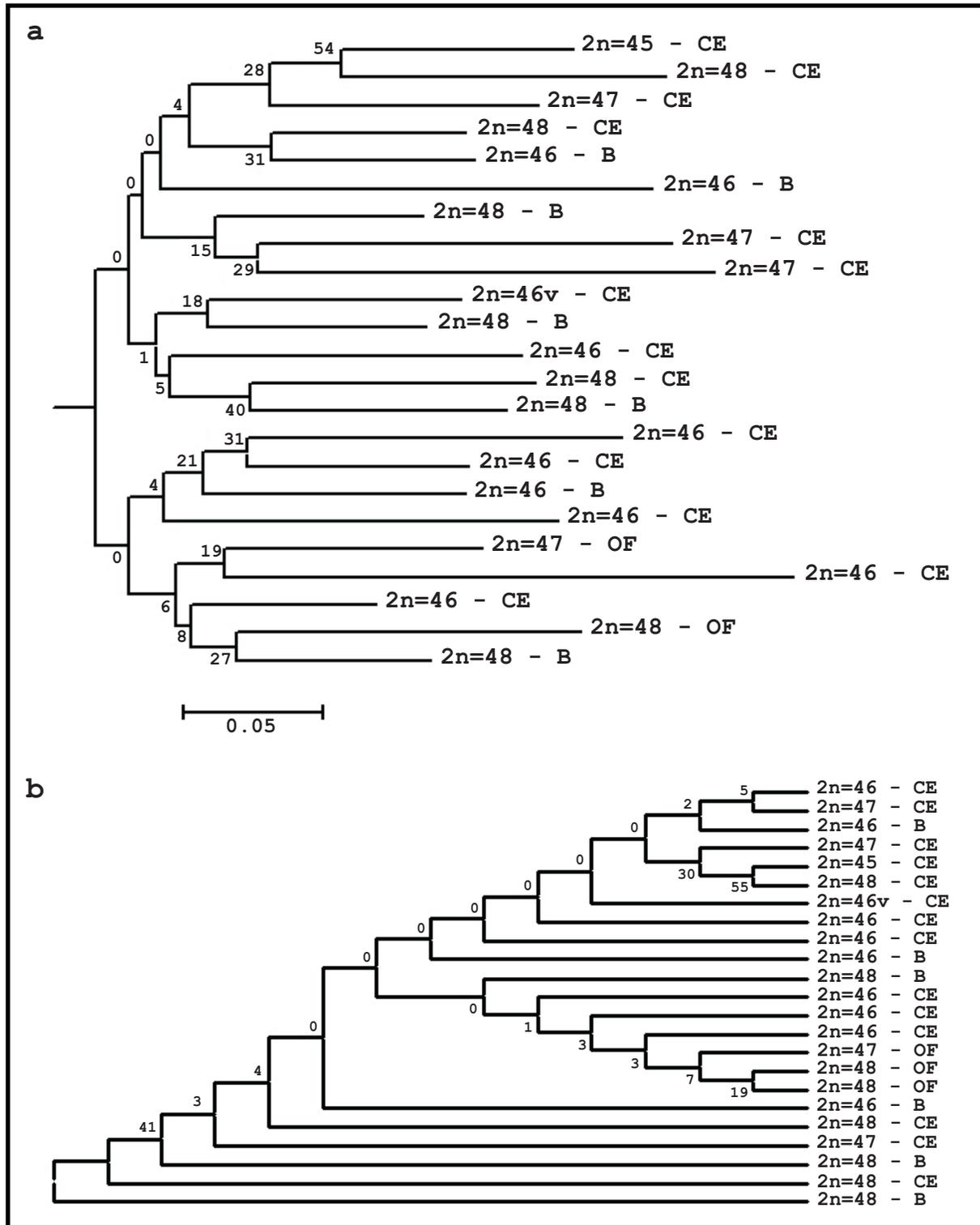


Figura 3.9 - a) Dendrograma neighbor-joining, construído a partir da matriz de complementos (1-S) do coeficiente de similaridade de Nei e Li, obtida com marcadores RAPD. b) Dendrograma de máxima parcimônia, construído a partir da matriz de dados RAPD. Valores de bootstrap com 1.000 reamostragens. B = Barrinha; CE = Cachoeira de Emas; OF = Ouro Fino; 2n=46 e 2n=48: citótipos padrão; 2n=45, 2n=46v, 2n=47: formas cariotípicas variantes

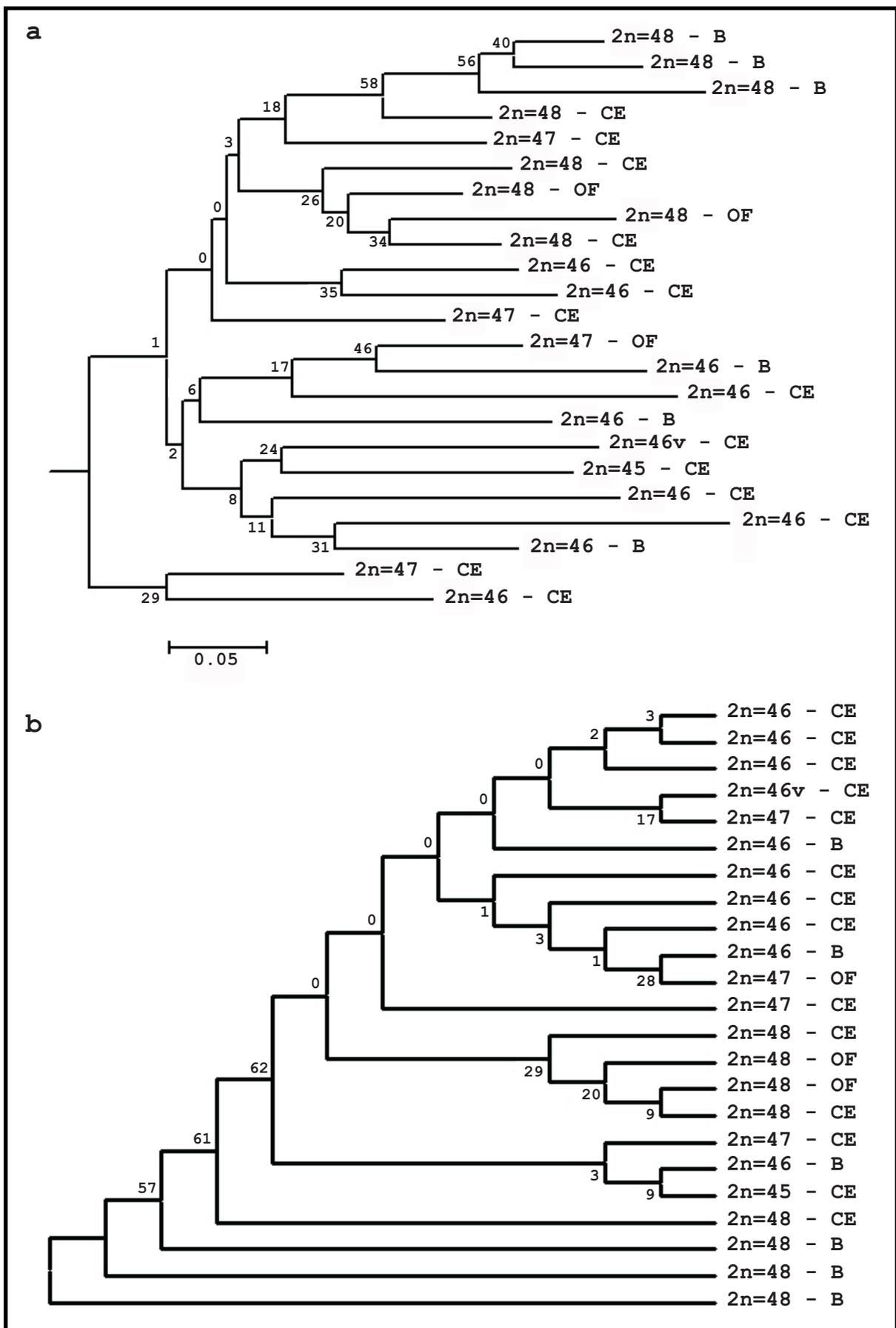
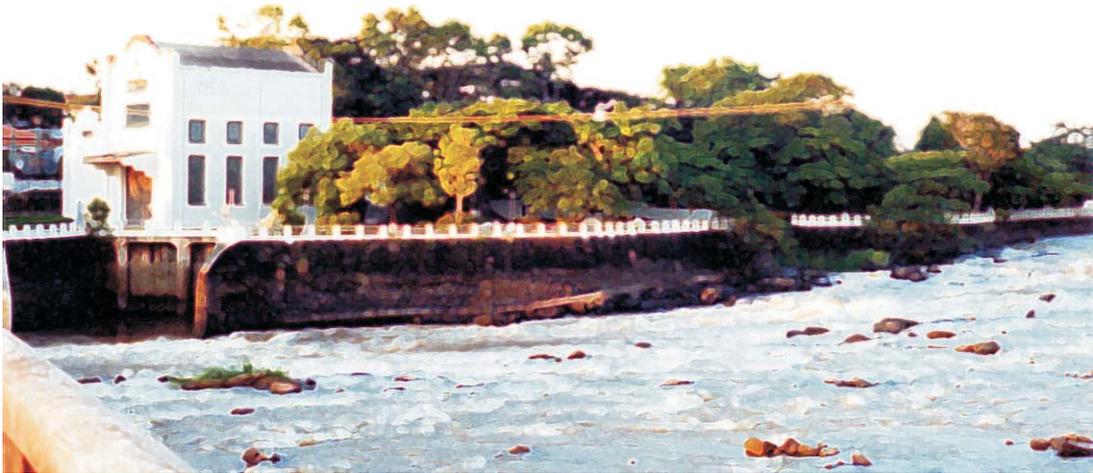


Figura 3.10 - a) Dendrograma neighbor-joining, construído a partir da matriz de complementos (1-S) do coeficiente de similaridade de Nei e Li, obtida com marcadores ISSR. b) Dendrograma de máxima parcimônia, construído a partir da matriz de dados ISSR. Valores de bootstrap com 1.000 reamostragens. B = Barrinha; CE = Cachoeira de Emas; OF = Ouro Fino; 2n=46 e 2n=48: citótipos padrão; 2n=45, 2n=46v, 2n=47: formas cariotípicas variantes

“Quando você elimina o impossível, o que sobra, por mais incrível que pareça, só pode ser a verdade”.
Arthur Conan Doyle



Discussão Geral e Conclusões

5 - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Astyanax fasciatus é uma “espécie” diversificada do ponto de vista citogenético, apresentando distintos citótipos, cada um deles com seus variantes específicos. A ocorrência simpátrica e sintópica de diferentes citótipos reforça a hipótese de que *A. fasciatus* possa representar um grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma denominação comum. O trabalho ora realizado permitiu levantar algumas hipóteses a respeito da história natural desse grupo na bacia do rio Paraná, com ênfase especial no rio Mogi-Guaçu:

5.1 – Distribuição dos citótipos de *A. fasciatus* na bacia do alto rio Paraná

O panorama da distribuição dos citótipos padrão na bacia do alto rio Paraná encontra-se ilustrado na Figura 3.8. Na região central da bacia, cuja drenagem principal é realizada pelo rio Tietê, predomina a ocorrência do citótipo $2n=46$ (Justi, 1993; Heras, 1998). Algumas variações na fórmula cariotípica podem ser encontradas nas descrições destes cariótipos, que podem ser decorrentes de eventuais rearranjos cromossômicos e eventos de deriva, característicos de pequenas populações isoladas ou com um fluxo gênico reduzido, ou mesmo de possíveis diferenças metodológicas. Por sua vez, na região do rio Grande e no rio Paraná, foram identificados exemplares com $2n=48$ cromossomos (Swertz *et al.*, 1998; Heras, 1998; Centofante *et al.*, 2003). Os dados referentes à área sul da bacia do alto rio Paraná, região do Paranapanema, não são consistentes.

É interessante destacar que *A. parahybae*, até recentemente considerada uma subespécie de *A. fasciatus*, endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul (bacia dos rios costeiros), possui $2n=48$ cromossomos e cariótipo semelhante ao das populações de $2n=48$ da bacia do alto Paraná (Kavalco e Moreiro-Filho, 2003; Centofante *et al.*, 2004). Adicionalmente, Moreli

et al. (1983), caracterizaram uma população constituída por indivíduos de $2n=48$ cromossomos provenientes do rio Juquiá (bacia dos rios costeiros), no sudeste do Estado de São Paulo. Desta forma, a bacia do rio Tietê parece formar uma ilha de populações com $2n=46$ cromossomos, rodeada por populações com $2n=48$ cromossomos.

Dados geológicos indicam que o rio Tietê inicialmente nascia no interior e drenava rumo ao Oceano Atlântico. Com o levantamento da Serra do Mar (no período Terciário – de 65 a 1,75 milhões de anos), houve uma mudança no seu curso, passando a drenar em direção ao interior, desaguando no rio Paraná (Langeani Neto, 1989). Isso sugere um isolamento bastante antigo em relação ao restante do alto Paraná, propiciando um tempo suficiente para o surgimento e/ou dispersão da forma $2n=46$ ao longo de sua bacia. Outra hipótese bastante provável é que no Quaternário (menos de 1,75 milhões de anos), durante o levantamento da Serra da Mantiqueira, o rio Paraíba do Sul tenha capturado as nascentes do rio Tietê, isolando as nascentes destes rios (King, 1956) e misturando elementos da ictiofauna. De fato, levantamentos ictiofaunísticos apontam diversas espécies comuns a essas duas bacias hidrográficas (Langeani Neto, 1989; Lima, 1997). É possível que a atual ictiofauna do rio Paraíba do Sul seja uma mistura de fauna do rio Tietê, com remanescentes da fauna da lagoa de Tremembé, que se encontrava isolada pelo alinhamento de Itatiaia-Bocaina, como aponta King (1956). Uma hipótese interessante é que *A. parahybae* tenha uma divergência anterior e seja remanescente da ictiofauna da lagoa de Tremembé. Ainda há a possibilidade desta forma ter sua origem em outro sistema hídrico situado a norte da atual Serra da Mantiqueira, e tenha se dispersado ao longo da bacia do Paraíba do Sul. O fato de não se encontrar *A. fasciatus* com $2n=46$ cromossomos nesta bacia pode ser decorrente de uma competição entre as espécies por um mesmo nicho, vencida por *A. parahybae* quando da captura da cabeceira do Tietê.

Frente a esse panorama, o citótipo $2n=46$ poderia ser derivado de formas com $2n=48$ cromossomos, o qual teria evoluído alopaticamente, e se dispersado ao longo do leito do rio Tietê, mantendo-se praticamente isolado das formas presentes em outros grandes rios desta bacia, na sua maioria com $2n=48$ cromossomos. Os contatos ocasionais podem, portanto, não representar grande introgressão em relação à metapopulação do sistema Tietê.

A distribuição de citótipos $2n=48$ de *A. fasciatus*, na área sul da bacia do alto Paraná, ainda precisa ser confirmada, principalmente nas regiões limítrofes com as bacias costeiras. Entretanto, é possível que a área de drenagem do rio Mogi-Guaçu represente um limite de distribuição entre as duas formas cariotípicas.

5.2 – Exceções na distribuição dos citótipos padrão de *A. fasciatus* na bacia do alto rio Paraná

Uma alta frequência de indivíduos com $2n=46$ cromossomos no rio Mogi-Guaçu, em Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP (Pazza *et al.*, 2005a), aparentemente contradiz a hipótese de que o citótipo $2n=46$ seja característico do rio Tietê. Uma hipótese plausível é que o citótipo $2n=48$ cromossomos seja a forma residente do rio Mogi-Guaçu e que o citótipo $2n=46$ cromossomos seja uma forma invasora, proveniente de afluentes do rio Tietê. O mesmo raciocínio pode ser utilizado nas observações de Heras (1998), que encontrou exemplares de $2n=46$ cromossomos no rio Barra Funda, afluente do rio Grande.

Esta hipótese pode ser fortalecida pela frequência dos citótipos nos pontos de coleta ao longo do rio Mogi-Guaçu. Em Cachoeira de Emas, onde se encontra uma barreira aparentemente eficiente contra a subida destes peixes (Pazza *et al.*, 2005c), a grande maioria dos indivíduos analisados apresentou 46 cromossomos, além de espécimes com $2n=48$ cromossomos e algumas formas cariotípicas variantes. Entretanto, à montante (Ouro Fino – MG) e à jusante (Barrinha – SP) de Cachoeira de Emas, a situação se inverte. Em Barrinha, há

uma grande predominância de indivíduos com $2n=48$ cromossomos enquanto que, em Ouro Fino, não foi verificada a ocorrência do citótipo $2n=46$ cromossomos (Pazza *et al.*, 2005a). É provável que em uma região entre Cachoeira de Emas e Barrinha esteja o ponto de invasão de espécimes provenientes do rio Tietê. Isto pode ter acontecido casualmente, por inundações que temporariamente poderiam comunicar águas de afluentes de ambos os rios, ou mesmo por ação antrópica.

É interessante observar que entre as populações com $2n=48$ cromossomos, os marcadores moleculares de ISSR identificaram um baixo N_m (0,3774), com pouca identidade genética (0,7248) entre as populações de Ouro Fino e Barrinha. Além disso, os dendrogramas de Neighbor-Joining, baseados nos índices de similaridade de Nei e Li (1979), e de máxima parcimônia, obtidos com os marcadores moleculares de ISSR, agrupam os espécimes de Barrinha em ramo separado, embora com baixos valores de “bootstrap” (Figuras 3.10-a e b). Tal diferenciação entre populações de um mesmo citótipo pode estar sendo influenciada pela barragem de Cachoeira de Emas, dificultando o livre fluxo dos peixes ao longo do rio.

A ocorrência de haplótipos de RFLP, compartilhados entre a população de *A. fasciatus* de Pirassununga (Cachoeira de Emas) e uma população proveniente do rio Tietê (Moysés e Almeida-Toledo, 2002), bem como o número de migrantes por geração (N_m), obtidos por RAPD (5,7826) e ISSR (1,5868), indicam a ocorrência de fluxo gênico entre os citótipos padrão, $2n=46$ e $2n=48$ (Pazza *et al.*, 2005c), o que possibilitaria a formação de híbridos ocasionais. É provável que a divergência entre os dois citótipos nessas bacias seja mais recente do que a separação com as populações do restante do Paraná.

5.3 – Traços cariotípicos conservados entre formas padrão

A conservação da localização de sítios dos genes ribossômicos entre os citótipos padrão pode ser um indício de divergência recente entre os dois citótipos, ou que há

pressões seletivas que impedem que determinados rearranjos se fixem nas populações. Alguns destes traços parecem ser também conservados em outras espécies do gênero *Astyanax*, como o sítio ribossômico 5S proximal ao centrômero em um par de cromossomos metacêntricos (Almeida-Toledo *et al.*, 2002b; Kavalco *et al.*, 2004a). Outras características costumam ser menos conservadas entre os *Astyanax*, como a localização dos sítios ribossômicos 18S e a distribuição de blocos heterocromáticos.

Uma importante característica conservada entre algumas espécies de *Astyanax* é a presença do DNA satélite As-51 (Mestriner *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2004; Kavalco *et al.*, 2005; Pazza *et al.*, 2005b). Embora o número de cromossomos portadores deste satélite varie entre as espécies, sua presença pode representar uma característica que está sendo conservada em um grupo com ancestralidade comum. Kavalco *et al.* (2005), sugeriram que a presença/ausência deste DNA satélite entre as espécies de *Astyanax*, bem de blocos heterocromáticos GC-ricos e o número e localização de sítios ribossômicos 5S fortalecem a hipótese de que esse gênero é polifilético (Weitzman e Malabarba, 1998). Por se tratar de uma seqüência com muita similaridade com um transposon (Mestriner *et al.*, 2000), é plausível que grupos apresentando uma maior dispersão deste DNA satélite sejam mais derivados em relação a grupos com poucos cromossomos portadores. De qualquer forma, a grande semelhança na distribuição deste DNA satélite entre os dois citótipos padrão reforça o compartilhamento de uma condição derivada.

5.4 – Considerações finais

O presente trabalho teve por objetivos contribuir para a análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus*, particularmente no que se refere à bacia rio Mogi-Guaçu (SP). Embora os resultados obtidos tenham propiciado várias inferências possíveis a respeito da problemática estudada, é recomendável que as hipóteses levantadas sejam

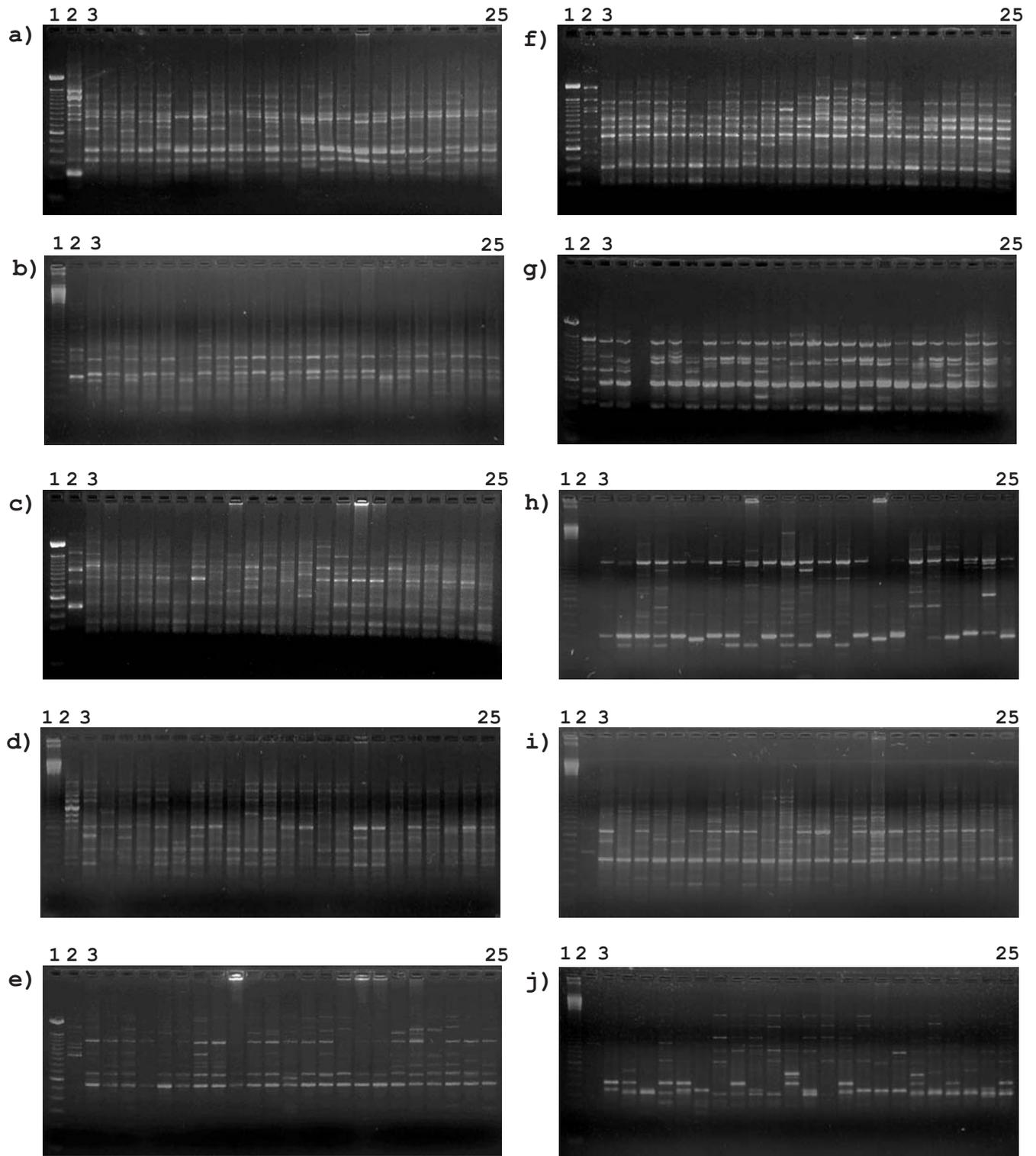
posteriormente testadas, para que o panorama proposto sobre a evolução desta espécie seja ampliado e confirmado. Uma melhor caracterização cariotípica de populações da bacia do rio Paranapanema e do rio Grande forneceriam, de início, várias respostas. Além disso, populações de bacias hidrográficas vizinhas também requerem uma melhor caracterização com novos marcadores citogenéticos. Adicionalmente, estudos de filogeografia, baseados em seqüências mitocondriais, amostrando diversas populações da bacia do alto rio Paraná e também vizinhas do rio Mogi-Guaçu, seriam de excelente valia.

“A verdade não tem que ser aceita com fé. Os cientistas não seguram suas mãos todo domingo, cantando: ‘Sim, a gravidade é real! Eu vou ter fé! Eu devo ser forte! Amém!’.”
Dan Barker



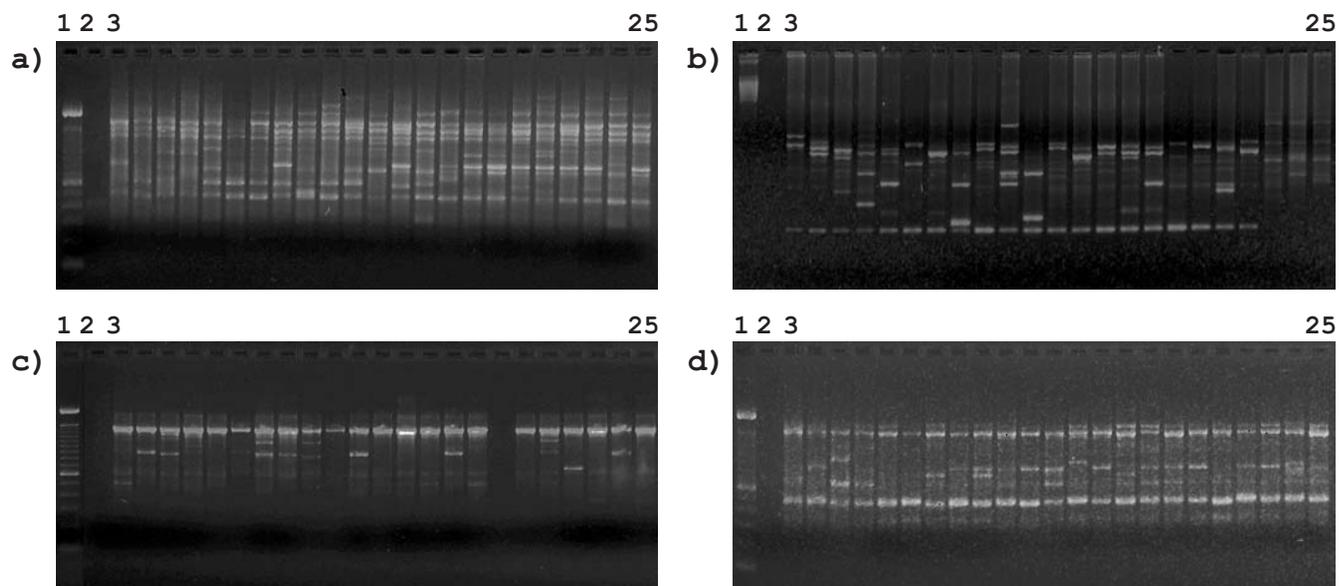
Anexos

ANEXO 1 - Padrões eletroforéticos de RAPD de *Astyanax fasciatus*.



Padrões eletroforéticos em gel de agarose de fragmentos de DNA polimórficos amplificados ao acaso (RAPD) por PCR. Primers: a) OPW4; b) OPW13; c) OPW16; d) OPX2; e) OPX4; f) OPX6; g) OPX7; h) OPX10; i) OPX15; j) OPX16. Colunas: 1 - marcador de peso molecular de 100 pb; 2 - controle negativo; 3-25 - exemplares de *Astyanax fasciatus*.

ANEXO 2 - Padrões eletroforéticos de ISSR de *Astyanax fasciatus*.



Padrões eletroforéticos em gel de agarose da amplificação por PCR de inter-sequências simples repetidas (ISSR) . Primers: a) (GGAC)₄; b) (GGAC)₃A; c) (GGAC)₃C; d) (GGAC)₃T. Colunas: 1 - marcador de peso molecular de 100pb; 2 - controle negativo; 3-25 - exemplares de *Astyanax fasciatus*.

“De nada valem todos os cérebros do mundo contra um pouco de estupidez que esteja momentaneamente em moda”.

Theodor Fontane



Referências Bibliográficas

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, L. D. S. (2001). A variabilidade do complexo de espécies scabripinnis (Pisces, Characidae) como estratégia adaptativa. Estudo da diversidade cariotípica do grupo com ênfase em populações da bacia do rio São Francisco. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.

Adams, R. P.; Flournoy, L. E. e Pandey, R. N. (1998). Obtaining reproducible patterns from random polymorphic DNA amplification (RAPDs). **Taxon** **42**: 553-571.

Aljanabi, S. M. e Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research** **25**: 4692-4693.

de Almeida, F. S; Sodré, L. M. K. e Contel, E. P. B. (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema River (Brazil). **Genetics and Molecular Biology** **26**(3): 301-305.

Almeida-Toledo, L. F. (1978). Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). São Paulo – SP: **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1993). A citogenética de peixes no Brasil. In: **X Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Universidade de São Paulo, pp347-376.

Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. e Toledo-Filho, S.A. (2000). Karyotypic evolution in neotropical freshwater fish. **Chromosomes Today** **13**: 169-182.

Almeida-Toledo, L.F.; Daniel-Silva, M.F.Z.; Moysés, C.B.; Fonteles, S.B.A.; Lopes, C.E.; Akama, A. e Foresti, F. (2002a) Sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae). **Cytogenetic and Genome Research** **99**: 164-169.

Almeida-Toledo, L. F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonilo, C.; Porto-Foresti, F. e Daniel-Silva, M. F. Z. (2002b). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research** **97**: 229-233.

Amemiya, C. T. e Gold, J. R. (1986). Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia** **1986**: 226-231.

Arcade, A.; Anselin, F.; Faivre Rampant, P.; Lesage, M. C.; Pâques, L. E. e Prat, D. (2000). Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics** **100**: 299-307.

Artoni, R. F.; Venere, P. C. e Bertollo, L. A. C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica** **106**: 209-214.

Beebe, T. e Rowe, G. (2004). **An introduction to molecular ecology**. Oxford University Press, 346p.

- Bertollo, L. A. C.; Takahashi, C. S. e Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética** 1(2): 103-120.
- Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. e Galetti Jr, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology** 28: 153-159.
- Bertollo, L. A. C.; Born, G. G.; Dergam, J. A.; Fenocchio, A. S. e Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research** 8: 603-613.
- Bickham, J. W. e Baker, R. J. (1979). Canalization model of chromosomal evolution. In: Schwartz, J. H. e Rollins, H. G. (Eds.). **Models and methodologies in evolutionary theory**. Bulletin of Carnegie Museum of Natural History 13. pp. 70-84.
- Bielawski, J. P.; Noack, K. e Pumo, D. E. (1995). Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. **BioTechniques** 18: 856-859.
- Bertollo, L. A. C.; Oliveira, C.; Molina, W. F.; Margarido, V. P.; Fontes, M. S.; Pastori, M. C.; Falcão, J. N. e Fenocchio, A. S. (2004). Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characidae). **Heredity** 93: 228-233.
- Borin, L. A. e Martins-Santos, I. C. (2000). Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçú river basin in Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 23(3): 605-607.
- Britski, H. A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, p79-108.
- Britski, H. A.; Sato, Y. e Rosa, A. B. S. (1988). **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3a. ed.. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 115p.
- Brown, T. A. (2001). **Gene cloning and DNA analysis – an introduction**. 4th Edition. Blackwell Science, 363p.
- Brunner, H.; Lugon, M. N.; Balloux, F.; Fumagalli, L. e Hausser, J. (2002). A taxonomical re-evaluation of the Valais chromosome race of the common shrew *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae). **Acta Theriologica** 47(3): 245-275.
- Centofante, L.; Bertollo, L. A. C.; Justi, A. J. e Moreira-Filho, O. (2003). Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). **Ichthyological Exploration Freshwaters** 14(4): 361-368.
- Daniel-Silva, M. F. Z. (1996). Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). São Paulo – SP: **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Daniel-Silva, M. F. Z. (2001). Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes). São Paulo – SP: **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Dias, A. L.; Oliveira, C. e Moreira-Filho, O. (1992). Ocorrência de triploidia natural em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). In: **IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. Rio de Janeiro. p25.

Diniz, D. (2003). Estudos citogenéticos populacionais em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). Análise da Biodiversidade. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.

Diniz, D. e Bertollo, L. A. C. (2003). Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** **56**(3): 303 - 311.

Dieffenbach, C. W. e Dveksler, G. S. (eds.) (1995). **PCR primer. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 714p.

Eigenmann, C. H. (1921). The American Characidae. Harvard College, **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology** **43**(3): 227-310.

Fagundes, V.; Christoff, A. U. e Yonenaga-Yassuda, Y. (1998). Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ($2n = 16, 15$ and 14). **Hereditas** **129**(3): 263-274.

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

Feldberg, E.; Porto, J. I. R. e Bertollo, L. A. C. (1992). Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Brazilian Journal of Genetics** **15**(2): 369-383.

Feldberg, E.; Porto, J. I. R.; Nakayama, C. M. e Bertollo, L. A. C. (1993). Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome** **36**: 372-376.

Fernandes-Matioli, F. M. C.; Matioli, S. R. e Almeida-Toledo, L. F. (2000). Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. **Genetics and Molecular Biology** **23**(4): 803-808.

Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, 220p.

Ferro, D. A. M.; Neo, D. M.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L. A. C. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** **110**: 55-62.

- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L. F. e Toledo Filho, S. A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizers regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetic** **31**: 137-144.
- Galetti Jr., P. M.; Foresti, F.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (1981). Karyotype similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus* and *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Brazilian Journal of Genetics** **4**: 11-15.
- Galetti Jr., P. M.; Foresti, F.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (1984). Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing regions. **Caryologia** **37**: 401-406.
- Galetti Jr P. M.; Mestriner, C. A.; Venere, P. C. e Foresti, F. (1991). Heterochromatin and karyotypic reorganization in fish of family Anostomidae (Characiformes). **Cytogenetics and Cell Genetics** **56**: 116-121.
- Galetti Jr., P. M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology** **65**(Suppl.): 53-56.
- García, G.; Lalanne, A. I.; Aguirre, G. e Cappetta, M. (2001). Chromosome evolution in the annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogentic analysis. **Chromosome Research** **9**: 437-448.
- Garutti, V. (1988). Morfologia, reprodução e aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água do rio Paraná. São Paulo – SP: **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Garutti, V. e Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências** **13**: 65-88.
- Gava, A. e Freitas, T. R. O. (2002). Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy** **83**(3): 843-851.
- Ge, X. –J.; Yu, Y.; Zhao, N. –X.; Chen, H. –S. e Qi, W. –Q. (2003). Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mogolica* Maxim. (Zygophyllaceae). **Biological Conservation** **111**: 427-434.
- Géry, J. (1977). **Characoids of the World**. T. F. H. Publications, 672p.
- Giuliano-Caetano, L. e Bertollo, L. A. C. (1988). Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). **Brazilian Journal of Genetics** **11**(2): 299-306.
- Giuliano-Caetano, L. e Bertollo, L. A. C. (1990). Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of natural triploidy. **Brazilian Journal of Genetics** **13**(2): 231-237.

- Giuliano-Caetano, L.; Jorge, L. C.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L. A. C. (2001). Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces: Erythrinidae). **Cytologia** **66**: 39-43.
- Gold, J. R.; Li, C.; Shipley, N. S. e Powers, P. K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology** **37**: 563-575.
- Guerra, M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro – RJ, 142p.
- Guimarães, I. N.; Almeida-Toledo, L. F.; Oliveira, C.; Foresti, F. e Toledo Filho, S. A. (1995). Cytogenetic studies of three species of Glandulocaudinae (Pisces, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics** **18**(2): 185-189.
- Haig, S. M.; Mace, T. R. e Mullins, T. D. (2003). Parentage and Relatedness in Polyandrous Comb-Crested Jacanas Using ISSRs. **Journal of Heredity** **94**(4): 302-309.
- Hamkalo, B. A. e Elgin, S. C. R. (1991). Functional organization of the nucleolus: a laboratory guide. In: **Methods in Cell Biology** **35**: 650p.
- Hartley S. E. e Horne, M. T. (1982). Chromosome polymorphism in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Chromosoma** **87**: 461-468.
- Hatanaka, T. e Galetti Jr, P. M. (2003). RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology** **26**(1): 19-26.
- Hatanaka, T. e Galetti Jr, P. M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** **122**: 239-244.
- Hedrick, P. W. (1981). The establishment of chromosomal variants. **Evolution** **35**(2): 322-332.
- Heras, M. P. (1998). Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de rios do Brasil. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.
- Heslop-Harrison, J. S. e Schwarzacher, T. (2002). *In situ* hybridization to plant chromosomes and DNA fibres. In: Gilmartin, P. M. e Bowler, C. **Molecular Plant Biology: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Jesus, C. M. e Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia** **65**: 397-402.
- Jesus, C. M.; Galetti Jr, P. M.; Valentini, S. R. e Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** **118**: 25-32.

- Jin, S. N. e Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência e Cultura** **27**(10): 1122-1124.
- Jorge, L. C. e Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genetica** **109**: 267-273.
- Justi, A. J. (1993). Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.
- Kavalco, K. F. e Margarido, V. P. (2000). Descrição cariotípica de *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) coletados no rio Paraná, na região de Guaíra – PR, com ocorrência de triploidia natural. **Genetics and Molecular Biology** **23**(3) supplement: 58.
- Kavalco, K. F. e Moreira-Filho, O. (2003). Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia** **56**(4): 453-461.
- Kavalco, K. F. e Pazza, R. (2004). A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. **Genetics and Molecular Biology** **27**(2): 196 – 198.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2004a). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul River Basin, Brazil. **Cytogenetic and Genome Research** **106**: 107-110.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2004b). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas** **141**: In press.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2005). Cytogenetic evidences of the polyphyletism of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetica**: submetido.
- King, L. C. (1956). A geomorfologia do Brasil oriental. **Revista Brasileira de Geografia** **XVIII**(2): 147-265.
- King, M. (1993). **Species evolution. The role of chromosome change**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B. e Nei, M. (2001). **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**. Bioinformatics. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Langeani Neto, F. (1989). Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): taxonomia. São Paulo – SP: **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Lee, C.E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. **Trends in Ecology and Evolution** **17**(8): 386-391.

- Lee, M. R. e Elder, F. F. B (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetics and Cell Genetic** **26**: 36-40.
- Leuzzi, M. S. P.; de Almeida, F. S.; Orsi, M. L. e Sodré, L. M. K. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology** **27**(3): 355-362.
- Levan, A.; Fredga, K. e Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** **52**: 201-220.
- Lima, R. S. (1997). Ictiofauna do alto curso do rio Paraíba do Sul. São Paulo – SP: **Disserta o de Mestrado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Liu, B. e Wendel, J. F. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes** **1**: 205-208.
- Lucena, C. A. S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osthariophysi, Characiformes) São Paulo-SP: **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 158p.
- Luque, C.; Legal, L.; Staudter, H.; Gers, C. e Wink, M. (2002). ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidopter). **Hereditas** **136**: 251-253.
- Maia, V. e Hulak, A. (1981). Robertsonian polymorphism in chromosomes of *Oryzomys subflavus* (Rodentia, Cricetidae). **Cytogenetics and Cell Genetic** **31**: 33-39.
- Maistro, E. L.; Foresti, F.; Oliveira, C. e Almeida-Toledo, L. F. (1992). Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica** **87**: 101-106.
- Maistro, E. L.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1994a). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics** **17**(2): 153-156.
- Maistro, E. L.; Dias, A. L.; Foresti, F.; Oliveira, C. e Moreira-Filho, O. (1994b). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia** **47**(3-4): 233-239.
- Maistro, E. L.; Oliveira, C. e Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology** **21**(2): 201-206.
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A e Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** **109**: 161-168.
- Margarido, V. P. e Galetti Jr, P. M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** **22**(3): 357-361.

- Margarido, V. P. e Galetti Jr, P. M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology** **23** (3): 569-573.
- Martins, C. e Galetti Jr., P. M. (1998). Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay river basin. **Genetics and Molecular Biology** **21**(3): 355-360.
- Martins, C. e Galetti Jr, P. M. (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research** **7**: 363-367.
- Martins, C. e Galetti Jr, P. M. (2000) Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research** **8**: 353-355.
- Martins, C. e Galetti Jr, P. M. (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome** **44**: 903-910.
- Melo, F. A. G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arquivos do Museu Nacional** **59**: 1-46.
- Mestriner, C. A.; Galetti Jr., P. M.; Valentini, S. R.; Ruiz, I. R. G.; Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. e Camacho, J. P. M. (2000). Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** **85**: 1-9.
- Mizoguchi, S. M. H. N. e Martins-Santos, I. C. (1997). Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas** **127**: 249-253.
- Mizoguchi, S. M. H. N. e Martins-Santos, I. C. (1998a). Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology** **21**: 55-61.
- Mizoguchi, S. M. H. N. e Martins-Santos, I. C. (1998b). Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia** **63**: 259-265.
- Molina, W.; Schmid, M. e Galetti Jr, P. M. (1998). Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios** **94**: 141-149.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C.; Foresti, F. e Galetti Jr., P. M. (1978). Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Ciência e Cultura** **30**: 548-549.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. e Galetti Jr., P. M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizing regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** **26**(5): 564-568.
- Moreira-Filho, O. e Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics** **14**: 331-357.

- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A. S.; Pastori, M. C. e Bertollo, L. A. C. (2001). Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia** **66**: 59-64.
- Morelli, S.; Bertollo, L. A. C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O. e Toledo Filho, S. A. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia** **36**: 235-244.
- Motokawa, M.; Harada, M.; Wu, Y.; Lin, L.K. e Suzuki, H. (2001). Chromosomal polymorphism in the gray shrew *Crocidura attenuata* (Mammalia: Insectivora). **Zoological Science** **18**(8): 1153-1160.
- Moysés, C. B. e Almeida-Toledo, L. F. (2002) Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** **25**(4): 401-407.
- Navarro, A. e Barton, N. H. (2003). Chromosomal speciation and molecular divergence – accelerated evolution in rearranged chromosomes. **Science** **300**: 321-324.
- Navarrete, M. C. e Júlio Jr., H. F. (1997). Cytogenetic analysis of four Curimatids from the Paraguay basins, Brazil (Pisces: Characiformes: Curimatidae). **Cytologia** **62**: 241-247.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** **89**: 583-590.
- Nei, M. e Li, W. –H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of National Academy of Sciences USA** **76**: 5269-5273.
- Nelson, J. S. (1994) **Fishes of the world**. 3rd edition, John Wiley e Sons. New York – USA, 600p.
- Néo, D. M.; Moreira-Filho, O. e Camacho, J. P. M. (2000a). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity** **85**: 136-141.
- Néo, D. M.; Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2000b). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** **108**(3): 211-215.
- Oliveira, C.; Toledo, L. F. A. e Toledo, S. A. (1988). Estudos citogenéticos na família Callichthyidae (Pisces, Siluriformes): os gêneros *Aspidoras*, *Callichthys* e *Hoplosternum*. IN: **Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, II**, Maringá, PR. p07.
- Ortí, G.; Petry, P.; Porto, J. I. R.; Jégu, M. e Meyer, A. (1996). Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA gene and the phylogeny of piranhas. **Journal of Molecular Evolution** **42**: 169-182.

Paganelli, H. H. (1990). Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus* (Linneaus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.

Pazza, R. e Julio Jr. H. F. (2003). Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in Upper Paraná River floodplain (Brazil). **Cytologia** **68**(2): 159-163.

Pazza, R.; Kavalco, K. F. e Bertollo, L. A. C. (2005a). Polimorfismo cromossômico em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 – Análises cariotípicas, Ag-RONs e mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S em citótipos simpátricos e suas possíveis formas híbridas. **Capítulo I**, neste volume.

Pazza, R.; Kavalco, K. F. e Bertollo, L. A. C. (2005b). Polimorfismo cromossômico em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 – Distribuição da heterocromatina constitutiva e DNA satélite. **Capítulo II**, neste volume.

Pazza, R.; Kavalco, K. F.; Prioli, S. M. A. P.; Prioli, A. J. e Bertollo, L. A. C. (2005c). Polimorfismo cromossômico em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 3 – Análises de marcadores moleculares RAPD e ISSR. **Capítulo III**, neste volume.

Penner, G. A.; Bush, A.; Wise, R.; Kim, W.; Domier, L.; Kasha, K.; Laroche, A.; Scoles, G.; Molnar, S. e Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications** : 341-345.

Pinkel, D., Straume, T. e Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of National Academy of Science USA** **83**: 2934-2938.

Portela, A. L. B. S.; Galetti Jr., P. M. e Bertollo, L. A. C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics** **11**(2): 307-316.

Porto, J. I. R. e Feldberg, E. (1993). Is *Callichthys* Linné (Ostariophisy, Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? **Acta Amazonica** **23**(2-3): 311-314.

Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E. L. e Foresti, F. (1997). Estimated frequency of B chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics** **20**: 377-380.

Prioli, S. M. A. P.; Prioli, A. J.; Júlio Jr., H. F.; Pavanelli, C. S.; Oliveira, A. V.; Carrer, H.; Carraro, D. M. e Prioli, L. M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** **25**(4):421-430.

Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Maniglia, T. C.; Lucio, L. C.; Júlio Jr, H. F.; Pazza, R.; Carrer, H. e Prioli, L. M. (2004). Molecular Markers and Genetic Variability of *Hoplias* aff. *malabaricus* - Populations from the Upper Paraná River Floodplain. In: Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Prioli, L. M. e Júlio Jr., H. F. (Org.). **The Upper Paraná River Floodplain: Structure and Process**. EDUEM, Maringá - PR, pp. 122-126.

- Reis, R. O; Kullander, S. O e Ferraris Jr., C. J. (2003). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742p.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology e Evolution** **16**(7): 351-358.
- Rockman, M. V. e Rowell, D. M. (2002). Episodic chromosomal evolution in *Planipapillus* (Onychophora: Peripatopsidae): a phylogenetic approach to evolutionary dynamics and speciation. **Evolution** **56**(1): 58-69
- Rocon-Stange, E. A. e Almeida-Toledo, L. F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics** **16**(3): 601-615.
- Salvador, L. B. e Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity** **69**: 50-56.
- Sanchez, S. e Fenocchio, A. S. (1996). Karyotypic studies and cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluroidei) from Argentina. **Cytologia** **61**: 247-252.
- Scheel, J. J. (1973). Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Denmark's Akvarium**, Charlottenlund, Denmark, 22p.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome region in Anura. **Chromosoma** **77**: 83-103.
- Shimabukuro-Dias, C. K.; Oliveira, C.; Reis, R. E. e Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **32**: 152-163.
- da Silva, G. F.; dos Santos, J. B. e Ramalho, M. A. P. (2003). Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology** **26**(4): 459-463.
- Sites Jr, J. W. e Moritz, C. (1987). Chromosomal evolution and speciation revisited. **Systematic Zoology** **36**: 153-174.
- Slatkin, M. e Barton, N. H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution** **43**: 1349-1368.
- Souza, I. L. e Moreira-Filho, O. (1995). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae) I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia** **60**: 1-11.
- Souza, I. L.; Moreira-Filho, O. e Galetti Jr., P. M. (1996). Heterochromatin differentiations in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics** **19** (3): 405-410.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** **75**: 304-306.

- Swerts, C. P.; Castro, G. C.; Maistro, E. L.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1998). Análises citogenéticas preliminares na espécie *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) proveniente do rio Sapucaí, represa de Furnas, MG. **Genetics and Molecular Biology** **21**(3) supplement: 66.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research** **17**: 6463-6471.
- Thode, G.; Martínez, G. Ruiz, J. L. e Lopéz, J. R. (1988). A complex chromosomal polymorphism in *Gobius fallax* (Gobiidae, Perciformes). **Genetica** **76**: 65-71.
- Torres, R. A.; Foresti, F. e Oliveira, C. (2002). Occurrence of karyotypical mosaicism in *Trichomycterus paolence* (Teleostei, Trichomycteridae). **Caryologia** **55**(4): 283-287.
- Vanzolini, P. E.; Rebouças, R. e Britski, H. A. (1964) Caracteres morfológicos de reconhecimento específico em três espécies simpátricas de lambaris do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia** **16**(27): 267-298.
- Vasconcellos, L. P. M. K.; Tambasco-Talhari, D.; Pereira, A. P.; Coutinho, L. L. e Regitano, L. C. A. (2003). Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology** **26**(2): 133-138.
- Venere, P. C. e Galetti Jr., P. M. (1986). Considerações gerais sobre os cariótipos de *Callichthys callichthys* e *Hoplosternum* sp. dos rios Corumbataí e Passa Cinco, respectivamente (bacia do Tietê, SP.) IN: **Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, I**, São Carlos, SP. p60.
- Venere, P. C. e Galetti Jr, P. M. (1989). Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical characiformes of the family Curimatidae. **Brazilian Journal of Genetics** **12**(1): 17-25.
- Vicente, V. E.; Moreira-Filho, O. e Camacho, J. P. M. (1996). Sex-ratio distortion associated to the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetic**. **74**: 70-75.
- Vicente, V. E.; Bertollo, L. A. C.; Valentini, S. R. e Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. **Genetica** **119**(2): 115-120.
- Vos, P.,; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. e Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** **23**: 4407-4414.
- Wang, W. e Lan, H. (2000). Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. **Molecular Biology and Evolution** **17**(9): 1326-1333.
- Wasko, A. P.; Martins, C.; Wright, J. M. e Galetti Jr, P. M. (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome** **44**: 893-902.
- Weitzman, S. H. e Malabarba, L. R. (1998). Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.;

Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S. e Lucena, C. A. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre-RS, 603p.

White, M. J. D. (1954). **Animal Cytology and Evolution**. 2nd edition. Cambridge University Press.

White, M. J. D. (1977). **Os Cromossomos**. Companhia Editora Nacional, São Paulo – SP. 196p.

White, M. J. D. (1978). **Modes of Speciation**. W. H. Freeman, San Francisco.

Wolfe, A. D. e Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. e Doyle, J. J. (Eds.). **Plant Molecular Systematics II**. Kluwer, Boston, pp. 43-86.

Wolfe, A. D.; Xiang, Q. -Y. e Kephart, S. R. (1998a). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology** 7: 1107-1125.

Wolfe, A. D.; Xiang, Q. -Y. e Kephart, S. R. (1998b). Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). **Proceedings of National Academy of Science USA** 95: 5112-5115.

Yeh, F. C.; Yang, R. e Boyle, T. (1999). **POPGENE version 1.31**: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center of International Forestry Research.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. e Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.

Zurita, F.; Jiménez, R.; Burgos, M. e de la Guardia, R. D. (1998). Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. **Journal of Cell Science** 111: 1433-1439.