

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

ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DO SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW EM
TRIPORTHEUS (CHARACIFORMES, CHARACIDAE). CITOGENÉTICA,
MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSOMAIS E MICRODISSECÇÃO
CROMOSSÔMICA.

Débora Diniz Bezerra

SÃO CARLOS-SP
2007

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

ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DO SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW EM
TRIPORTHEUS (CHARACIFORMES, CHARACIDAE). CITOGENÉTICA,
MAPEAMENTO DOS GENES RIBOSSOMAIS E MICRODISSECÇÃO
CROMOSSÔMICA.

Débora Diniz Bezerra

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B574od

Bezerra, Débora Diniz.

Origem e diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Triportheus* (Characiformes, Characidae) : citogenética, mapeamento dos genes ribossomais e microdissecção cromossômica / Débora Diniz Bezerra. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

105 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Citogenética. 2. Peixe. 3. Cromossomos sexuais. 4. *Triportheus*. 5. DNAs ribossomais. 6. Microdissecção cromossômica. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

Assinalar se houver mudança de título sim() não (X)

Encerrou-se a reunião às 18:00, nada mais havendo a tratar, eu, Greissi Gomes de Oliveira, secretariei a referida reunião, redigi e assino a presente Ata que, após lida e aprovada, será assinada pelo presidente e pelos demais membros da Banca Examinadora.

São Carlos, 27 de abril de 2007.

Greissi Gomes Oliveira
Greissi Gomes Oliveira
Assistente em Administração



Luiz Antonio Carlos Bertollo
.....
Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo
Presidente

Orlando Moreira Filho
.....
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Roberto Ferreira Artoni
.....
Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Paulo Cesar Venere
.....
Prof. Dr. Paulo Cesar Venere

Fausto Foresti
.....
Prof. Dr. Fausto Foresti

Reunião da CPG do PPG-GEV em na
.....

Greissi Gomes Oliveira
Assistente em Administração

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio. Ao Pablo, pela presença constante em todos os momentos. Para os meus amigos Iderval e Rosângela que tiveram participação fundamental no cumprimento desta etapa da minha vida.

“Jogamos fora as boas oportunidades porque elas geralmente vêm vestidas de macacão de operário” (Thomas Edison). Afinal, fazer mudanças dá muito trabalho!!! Portanto, é necessário encarar todas as dificuldades de frente, assumi-las de vez, planejar ações para ultrapassá-las, autocomprometer-se e agir com determinação. (Vida Simples, jan. 2007)

Agradecimentos

Ao Laboratório de Citogenética de peixes do Departamento de Genética e Evolução, ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES, pela oportunidade, recursos financeiros e toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Luiz A. C. Bertollo, a pessoa mais espiritualizada que já conheci, afinal, foram 7 anos de penitência e isso não é pra qualquer um!!! Além de todos ensinamentos, a inesgotável paciência e principalmente pelo exemplo como pessoa e profissional dedicado. Agradeço pela oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa, pelo meu crescimento intelectual e a qualidade da minha orientação.

Ao prof. Dr Pedro Manoel Galetti Jr., pela amizade, pelo auxílio durante minha tese, e pela dedicação dos amigos do laboratório de biologia molecular sempre dispostos a ajudar.

Ao prof. Dr. Orlando Moreira Filho do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, pelos ensinamentos, boas idéias e discussões.

Ao prof. Dr. Marco Del Lama, profissional exemplar, que sempre me deu muito incentivo, atenção e oportunidade de compartilhar de todo seu conhecimento.

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar por todos seus ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições neste trabalho.

Ao prof. Dr Liano Centofante da UFMT, pelo fornecimento dos primeiros dados citogenéticos de *T. nematurus*.

A Dra. Terumi Hatanaka pela atenção e apoio nos trabalhos na área de molecular e pela amizade.

Aos (as) secretários (as) Cláudio, Tatiane, Rosemeire, Regiane, Greicy, pela paciência, eficiência e por todos auxílios prestados.

Ao Piau e Gallo, técnicos do nosso laboratório, por toda ajuda durante as coletas.

Aos amigos dos laboratórios (Citogenética e Biodiversidade Molecular) pelo apoio e companheirismo.

Ao Maurício pelas aulas de espanhol, às inúmeras traduções e pela amizade.

A todos meus amigos de São Carlos que me acolheram, me deram força e amparo durante toda minha jornada.

Ao Meu amigo Argentino, Alejandro Laudicina pela agradável convivência, pela amizade e pela dedicação durante meu estágio em Buenos Aires.

Ao Laboratório de citogenética molecular (Centro de Nacional de Energia Atômica -Buenos Aires), dirigido pela Dr^a M^a Mullman, pelo proveitoso estágio.

Pela convivência com a família Sanches e a Lelê pelo direcionamento nos meus caminhos.

A família Xavier, que me acolheu com todo carinho e atenção.

Aos meus “doguinhos”, Digão e Dori, companheiros de todas as horas.

Ao Pablo, por fazer parte da minha vida e por proporcionar um equilíbrio pessoal que a tanto tempo eu procurava. Te amo.

Ao Paulinho, que possibilitou a realização desse doutorado, sem ele eu não teria começado.

Ao meu irmão Iderval, que não mediu esforços em momento algum para me ajudar. Não sei como agradecer tanta dedicação, carinho e amizade.

A Rosângela e a Celeste, que sempre estiveram presentes nos momentos de tristeza e alegria. Obrigada pela amizade e agradável convivência. Minha amiga Evelise não pode ser esquecida. Evelise você é ótima.

Aos meus pais, por todo apoio e confiança dedicados a mim.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações gerais sobre o gênero <i>Triportheus</i>	01
1.2. Cromossomos sexuais em peixes neotropicais.....	02
1.3. O Sistema ZZ/ZW.....	04
1.4. O sistema ZZ/ZW e as regiões organizadoras de nucléolos no gênero <i>Triportheus</i>	06
1.5. Citogenética clássica e molecular	09
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material e Locais de Coleta	14
3.2. Preparação de cromossomos mitóticos.....	18
3.3 Detecção da heterocromatina constitutiva	19
3.4. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS).....	19
3.5. Dupla coloração com os fluorocromos Cromomicina A ₃ e DAPI, com cromossomos desnaturados	20
3.6. Localização cromossômica de seqüências de DNA por hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	20
3.7. Obtenção de sonda cromossômica por microdissecção	23

3.8. Análises cariotípicas.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

CAPÍTULO I - Cariótipo, mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S e caracterização do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae)

Resumo.....	32
Introdução	34
Material e Métodos.....	36
Resultados	38
Discussão.....	39
Referências Bibliográficas.....	46

CAPÍTULO II - Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em espécies de *Triportheus* (Characiformes, Characidae)

Resumo.....	52
Introdução	54
Material e Métodos.....	55
Resultados	56
Discussão.....	58
Referências Bibliográficas	63

CAPÍTULO III - Microdissecção cromossômica e pintura cromossômica total (WCP) em cromossomos sexuais de *Triportheus* (Characiformes, Characidae).....

67

Resumo	68
Introdução	70
Material e Métodos	71
Resultados	73
Discussão	74
Referências Bibliográficas	73
4. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Lista de figuras

Introdução

Figura 1. Hidrografia da América do Sul, mostrando a distribuição de espécies de *Triportheus* já estudadas. **(A)** bacia do São Francisco; **(B)** bacia do Paraná-Paraguai; **(C)** bacia Amazônica; **(1)** *T. guentheri* (rio São Francisco); **(2)** *T. nematurus* (rio Cuiabá); **(3)** *T. nematurus* (rio Paraguai); **(4)** *T. nematurus* (rio Paraná); **(5)** *T. cf. signatus* (Estação de Aqüicultura de Promissão-SP); **(6)** *T. cf. auritus* (rio Araguaia); **(7)** *T. auritus*; *T. angulatus*, *T. culter* e *T. albus* (rios Negro e Solimões) (de ARTONI *et al.*, 2001)..... 26

Figura 2. Idiograma mostrando o cromossomo Z e as distintas formas de cromossomo W de *Triportheus*, e sua diferenciação a partir de um provável par homomórfico ancestral. As áreas escuras correspondem à localização da heterocromatina constitutiva nos cromossomos. **WA:** *T. elongatus (auritus)*; **WB:** *T. cf. elongatus (auritus)*; **WC:** *T. paranensis (nematurus)* do rio Paraguai; **WD:** *T. paranensis (nematurus)* do rio Cuiabá; **WE:** *T. paranensis (nematurus)* do rio Paraná; **WF:** *T. signatus*; **WG:** *T. guentheri*; **WH:** *T. flavus (angulatus)*, **WI:** *T. albus*. (ARTONI *et al.*, 2001) 27

Material e métodos

Figura 3. Exemplos de espécies de *Triportheus* estudadas no presente trabalho: a) *T. guentheri* (rio São Francisco-MG); b) *T. angulatus (trifurcatus)* (rio Araguaia-MT); c) *T. nematurus* (rio Piracicaba-SP) d) *T. elongatus (auritus)*; *T. flavus (angulatus)* e *T. albus* (rio Negro-AM)..... 33

Figura 4. Mapas do Brasil e da Argentina indicando os locais de coleta dos espécimes estudados. As regiões mais claras indicam as distintas bacias hidrográficas: (1) Amazonas; (2) Tocantins-Araguaia; (3) alto Paraná (4) São Francisco; (5) bacias do Nordeste; (6) baixo Paraná. Nos quadros menores estão indicados os rios (em vermelho) nos quais os exemplares foram coletados, em

cada bacia: (1) rio Negro - AM; (2) rio Araguaia – MT; (3) rio Piracicaba (SP); (4) rio São Francisco (MG); (5) açude Itans (RN); (6) baixo rio Paraná (AR) 35

Figura 5. Detalhes da técnica de microdissecção cromossômica 44

Capítulo I

Figura 1. Cariótipo de *Triportheus nematurus* macho (A) e fêmea (B), após coloração convencional com Giemsa, mostrando o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. O par cromossômico nº 2 apresenta uma conspícua constrição secundária no braço curto 62

Figura 2. Cariótipo de *Triportheus nematurus* macho (A) e fêmea (B), após bandamento C, mostrando a distribuição da heterocromatina nos cromossomos. O cromossomo W é quase totalmente heterocromático. O braço curto do par nº 2 apresenta regiões heterocromáticas acima e abaixo da constrição secundária 63

Figura 3. Par cromossômico nº 2 (a, c, e, g) e cromossomo W (b, d, f, h) de *Triportheus nematurus*, apresentando (a, b) Ag-RONs; (c, d) sítios CMA₃⁺; (e) sítios DAPI⁻ e (f) sítios DAPI⁺, no braço curto do cromossomo 2 e no braço longo do cromossomo W, respectivamente; (g, h) sítios de rDNA 18S (em verde) e (g) sítios de rDNA 5S (em magenta). Observe a localização sintênica dos sítios 18S e 5S no braço curto do par nº 2..... 64

Capítulo II

Figura 1. Mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S (setas) em cromossomos metafásicos de a) *T. angulatus (trifurcatus)*; b) *T. guentheri*; c) *T. cf. signatus*; d) *T. albus*; e) *T. elongatus (auritus)*; f) *T. flavus (angulatus)*, contra-corados com iodeto de Propídio. As setas mais grossas indicam a localização gênica no cromossomo W..... 75

Figura 2. Mapeamento físico dos sítios de rDNA 5S (setas) nos cromossomos metafásicos de a) *T. angulatus (trifurcatus)*; b) *T. guentheri*; c) *T. cf. signatus*; d)

T. albus; e) *T. elongatus auritus*; f) *T. flavus (angulatus)*, contra-corados com DAPI..... 76

Figura 3. Mapeamento físico dos sítios sintênicos de rDNA 5S e rDNAr 18S (setas), em *T. nematurus*. Em (a) e (b) estão sendo evidenciados os sítios 18S e 5S respectivamente, em análise seqüencial. Em (c) estão sendo evidenciados os sítios 18S (verde) e 5S (vermelho) em “double” FISH. O terceiro sítio de rDNA 18S, mostrado em (a) e (c), corresponde ao cromossomo W. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de Propídio (a) e DAPI (b, c)..... 77

Capítulo III

Figura 1. Pintura cromossômica total (WCP) dos cromossomos Z de machos de *T. nematurus* do rio Piracicaba – SP (a, e); *T. angulatus* (b, f); *T. guentheri* (c, g) e *T. trifurcatus* (d, h), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus* 88

Figura 2. Pintura cromossômica total (WCP) dos cromossomos Z (cromossomos maiores) e W (cromossomos menores) de fêmeas de *T. nematurus* do rio Piracicaba – SP (a, e); *T. albus* (b, f); *T. cf. signatus* (c, g) e *T. nematurus* da Argentina. (d, h), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*..... 89

Figura 3. Pintura cromossômica total (WCP), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*, em espécies de diferentes gêneros de Characidae. Controle positivo em macho de *T. nematurus*, em vermelho (a). Cromossomos metafásicos de *Chalceus* sp. (b); *Brycon* sp. (c); *Astyanax scabripinnis* (d); *Astyanax fasciatus* (e); *Salminus hilarii* (f) evidenciando ausência de sinais de hibridação. Em alguns casos, os sinais verdes evidenciam sítios de rDNA 5S, como controle da eficácia da técnica de FISH..... 90

Figura 4. Esquema comparativo entre o cromossomo Z e o cromossomo W de distintas espécies de *Triportheus*, evidenciando a distribuição da eucromatina (blocos brancos) e da heterocromatina (blocos escuros) nos cromossomos WA=*T. auritus* (rios Negro e Solimões); WB=*T. cf. signatus* (rio Piranha-açu); WC=*T. cf.*

auritus (rio Araguaia); WD=*T. nematurus* (rio Paraguai); WE=*T. nematurus* (rio Piracicaba); WF=*T. nematurus* (rio Cuiabá);WG=*T. nematurus* (rio Paraná, Argentina); WH=*T. signatus* (piscicultura de Promissão, SP); WI=*T. guentheri* (rio São Francisco); WJ=*T. angulatus* (rios Negro e Solimões); WL=*T. albus* (rios Negro e Solimões). Atualizado de Artoni *et al.* (2001)..... 91

Figura 5. Relações filogenéticas apresentadas por *Triportheus* com alguns outros gênero da família Characidae, conforme Lucena (1993) e Orti & Meyer (1997) 92

Resumo

No presente estudo foram analisados os cromossomos de distintas espécies de *Triportheus* (Characiformes, Characidae), de diferentes bacias hidrográficas do Brasil, assim como da Argentina. *Triportheus nematurus*, proveniente do rio Piracicaba - SP, foi analisada pela primeira vez, utilizando técnicas de estudo convencionais, fluorocromos base-específicos e o mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S e de rDNA 5S. O número diplóide encontrado foi de $2n=52$ cromossomos, tanto em machos como em fêmeas. As fêmeas apresentaram um par de cromossomos heteromórficos bem diferenciados, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. O cromossomo Z é o maior do complemento, com a ocorrência de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentromérica e teloméricas. O cromossomo W é em grande parte heterocromático, evidenciando heterocromatina heterogênea, composta por regiões GC- e AT-ricas. As Ag-RONs, em concordância com os sítios de rDNA 18S, detectados pela hibridação fluorescente *in situ*. O rDNA 5S, mostra uma localização sintênica e adjacente ao rDNA 18S, caracterizando uma situação pouco freqüente entre os peixes. Os resultados obtidos em *T. nematurus* concordam com estudos prévios nesse grupo, reforçando a condição basal do sistema ZZ/ZW na filogenia do gênero, provavelmente pré-datando os eventos de especiação. Além de *T. nematurus*, mais sete espécies/populações de *Triportheus* foram analisadas por FISH com sondas de rDNA 18S e 5S. Os resultados confirmaram a presença de sítios 18S no cromossomo W em todas as espécies de *Triportheus* aqui analisadas, mesmo nos casos onde as Ag-RONs mostraram-se inativas. Os sítios de rDNA 5S, que ainda não tinham sido descritos

para o grupo, encontram-se sempre localizados no braço curto de um só par de cromossomos, adjacentes ao centrômero. A única exceção ocorreu em *T. auritus*, que apresentou 10 sítios de rRNA 5S. Duas populações distintas de *T. nematurus* (rio Piracicaba – SP e rio Paraná – Argentina) apresentaram sintonia dos genes ribossomais no braço curto de um par cromossômico correspondente ao portador de Ag-RONs. Uma sonda para pintura cromossômica total (WCP - Whole Chromosome Painting), específica do cromossomo Z de *T. nematurus* (rio Piracicaba), foi obtida por intermédio de microdissecção, seguida por amplificação inespecífica por DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR). Hibridações fluorescentes *in situ*, utilizando-se esta sonda, foram realizadas em espécies/populações de *Triportheus*, assim como em espécies de outros gêneros da família Characidae filogeneticamente próximos de *Triportheus*. Nos espécimes machos de *Triportheus*, os dois cromossomos Z (1º par metacêntrico grande) apresentaram uma forte marcação em toda sua extensão. Nas fêmeas, o cromossomo Z (1º metacêntrico grande) mostra o mesmo padrão observado nos machos e o cromossomo W se apresenta apenas com sutil marcação no braço curto ou no braço longo, em uma região adjacente ao centrômero, conforme a espécie. Assim sendo, a região do cromossomo W que mantém homologia com o cromossomo Z é relativamente pequena, demonstrando a grande diferenciação desse cromossomo ao longo da evolução do sistema ZZ/ZW no grupo. Todas as demais espécies de Characidae testadas não apresentaram sinais positivos de hibridação com a sonda do cromossomo Z de *Triportheus*, mesmo sendo relativamente próximas desse gênero. Assim sendo, esses resultados reforçam, de modo mais positivo, que o sistema ZZ/ZW deve de fato corresponder à uma

sinapomorfia entre as espécies de *Triportheus*, aparentemente exclusiva desse grupo de Characidae.

Abstract

Chromosomes of distinct species of *Triportheus* (Characiformes, Characidae) from different hydrographic basins in Brazil, as well as in Argentina, were analyzed in the present work. *Triportheus nematurus*, from Piracicaba River (São Paulo State, Brazil), was analyzed for the first time, using conventional cytogenetic techniques, base-specific fluorochromes and physical mapping of 18S rDNA and 5S rDNA. The diploid number found in all species was $2n= 52$ chromosomes, in both males and females. Females presented a pair of quite differentiated heteromorphic chromosomes, characterizing a ZZ/ZW sex chromosome system. The Z chromosome is the largest in the karyotype, bearing constitutive heterochromatin at pericentromeric and telomeric regions. The W chromosome is mostly heterochromatic, showing a heterogeneous heterochromatin, composed of GC- and AT-rich regions. The Ag-NORs were equivalent to 18S rDNA sites detected through fluorescent *in situ* hybridization. The 5S rDNA is syntenic and adjacent to 18S rDNA site, characterizing an uncommon situation amongst fishes. The results obtained in *T. nematurus* agree with previous studies in this group, reinforcing the basal condition of the system ZZ/ZW in the phylogeny of this genus, prior to speciation events. Besides *T. nematurus*, other seven species/populations of *Triportheus* were analyzed by FISH with 18S and 5S rDNA probes. The results confirmed the presence of 18S sites on the W chromosome in all *Triportheus* species herein studied, even when Ag-NORs showed to be inactive. The 5S rDNA sites, not reported in this group so far, were always located on short arms of a single chromosomal pair, close to centromeres. The only exception was *T. auritus*, which presented ten 5S rDNA sites. Two distinct *T. nematurus* populations (Piracicaba River – SP and Paraná River – Argentina) presented synteny between

18S and 5S ribosomal genes, located on short arm of a NOR-bearing chromosomal pair. A probe for whole chromosome painting (WCP), specific to the Z chromosome of *T. nematurus* (Piracicaba River), was obtained by microdissection, followed by unspecific amplification via DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR). Fluorescent *in situ* hybridization with such probe was performed in *Triportheus* species, as well as in other Characidae species belonging to genus closed to *Triportheus*. In male specimens of *Triportheus*, both Z chromosomes (1st large metacentric pair) presented conspicuous marks over their whole extension. In females, the Z chromosome showed the same pattern observed in males while the W chromosome bears only a subtle signal on the short arm, or on the long arm close to centromere, according to species. Therefore, the region of the W chromosome with homology to Z chromosome is relatively small. All the other Characidae species analyzed presented no positive signals after hybridization using Z chromosome of *Triportheus nematurus* as a probe, even in those apparently closely related to this genus. Thus, these results stress out, positively, that the ZZ/ZW system should actually correspond to a synapomorphy shared by *Triportheus* species, likely to be unique to this Characidae group.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre o gênero *Triportheus* na ictiofauna neotropical

Os peixes neotropicais compõem a ictiofauna de água doce mais rica e diversificada do mundo, com mais de 2400 espécies descritas (Lowe-McConnell, 1999), representadas principalmente pelas ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (Lundberg *et al.*, 2000).

Os Characiformes constituem um grupo composto por cerca de 10 famílias, apresentando uma grande amplitude de variações morfológicas. Representantes desse grupo ocorrem em praticamente todos os ambientes de água doce, sendo coletados com relativa facilidade na maioria dos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes (Britsky *et al.*, 1988).

A família Characidae é uma das maiores e mais complexas entre os peixes Neotropicais (Britsky, 1992; Nelson, 1994), compreendendo cerca de 170 gêneros e 885 espécies (Nelson, 1994). Além disso, existem diversos gêneros ainda não bem caracterizados quanto às suas relações filogenéticas. Lima *et al.* (2003) consideram vários gêneros “*incertae sedis*” em Characidae, dentre os quais se encontra o gênero *Triportheus* Cope, 1872, representados por peixes com porte entre 10-14 cm de comprimento, em média.

Os *Triportheus* são popularmente conhecidos como sardinha de água doce, sardela, sardinha facão, entre outros. Algumas espécies deste gênero podem atingir um tamanho relativamente maior do que a média, entre 20-24 cm, sendo importantes para o comércio e a subsistência de populações ribeirinhas,

principalmente na Amazônia, onde estão entre os peixes mais consumidos pela população.

Este gênero tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, indo da bacia do rio Magdalena, na Colômbia, até o sistema do rio de La Plata, no Uruguai (Ribeiro, 1941). Em recente revisão, Malabarba (2004), considerou um total de dezesseis espécies válidas para este gênero, presentes nas bacias hidrográficas da América do Sul. Nesta revisão, algumas espécies foram colocadas em sinonímia enquanto que outras foram descritas. Assim sendo, algumas espécies anteriormente já estudadas sofreram modificações na sua nomenclatura, ou seja, em Falcão (1988) *T. elongatus* = *T. auritus*; *T. flavus* = *T. angulatus*, em Sanches & Jorge (1999) *T. paranensis* = *T. nematurus*; em Artoni *et al.*, (2001) e Artoni & Bertollo (2002) *T. cf. elongatus* = *T. cf. auritus*; *T. paranensis* = *T. nematurus*; No presente estudo, passaremos então a adotar a nova nomenclatura utilizada para essas espécies.

1.2. Cromossomos sexuais em peixes neotropicais

Dentre os peixes neotropicais, diferentes sistemas de cromossomos sexuais já foram descritos. Embora a maioria das espécies não apresente cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos já foram identificados em diferentes grupos de peixes (Devlin & Nagahama, 2002), correspondendo aos tipos ZZ/ZO, XX/XO, ZZ/ZW, XX/XY, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , ZZ/ZW_1W_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$, muitos deles encontrados entre os peixes Neotropicais (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Almeida-Toledo, 1998; Centofante *et al.*, 2002; Alves *et al.* 2006; Oliveira, 2006).

A heterogametia feminina, principalmente em relação ao sistema ZZ/ZW, tem sido mais freqüente, correspondendo a mais de 50% das ocorrências de cromossomos sexuais. Neste caso, enquadram-se algumas espécies dos gêneros *Leporinus*, *Parodon*, *Characidium*, *Thorococarax*, *Potamorhina*, *Semaprochilodus*, *Cheirodon*, *Odontostilbe*, *Hypostomus*, *Microlepdogaster*, *Loricariichthys*, *Opsodoras*, *Eigenmannia*, *Gambusia*, (Centofante *et al.* 2002), de *Apareiodon* (Vicari, *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006), além de todas as espécies estudadas de *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002).

Contudo, a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos não é regra geral entre os peixes. De fato, apenas cerca de 5-6% das espécies cariotipadas apresentam essa característica (Moreira-Filho *et al.*, 1993), correspondendo ao redor de 55 casos. Entre os sistemas simples, principalmente no sistema ZZ/ZW, a heterocromatina está associada à diferenciação morfológica desses cromossomos, principalmente do cromossomo W (Galetti Jr. & Foresti, 1986; Feldberg *et al.*, 1987; Bertollo & Cavallaro, 1992; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Andreatta *et al.*, 1993; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002; Centofante *et al.*, 2002). Entretanto, entre os sistemas múltiplos, os rearranjos estruturais estão associados com a diferenciação desses sistemas, principalmente as translocações e fusões (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Almeida-Toledo *et al.*, 1988; Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo & Mestriner, 1998).

Pelo menos em alguns casos, onde um estudo do comportamento meiótico dos cromossomos sexuais foi realizado, pôde-se constatar uma meiose regular, com a segregação dos cromossomos sexuais conforme o esperado para um sistema fixado e equilibrado nas populações, levando à uma produção de gametas balanceados (Bertollo & Mestriner., 1998).

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

1.3. O sistema ZZ/ZW

O sistema ZZ/ZW já foi constatado em várias espécies de peixes pertencentes aos gêneros *Leporinus* (Galetti & Foresti, 1986; Galetti Jr. *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1998; Venere, 1998), *Microlepidogaster* (Andreatta *et al.*, 1993; 1999), *Parodon* (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Vicente *et al.*, 2003; Centofante *et al.*, 2002), *Triportheus* (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992, Artoni *et al.*, 2001 e Artoni & Bertollo, 2002), *Characidium* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.* 2001; 2003), *Semaprochilodus taeniurus* (Feldberg *et al.*, 1987), *Eigenmannia virescens* (Foresti, 1987), *Loricariichthys platymetopon* (Scavone & Júlio Jr., 1995), *Opsodoras* sp. (Venere, 1998), *Hypostomus* sp. (Artoni *et al.*, 1998), *Apareiodon* (Vicari *et al.*, Rosa *et al.*, 2006). Uma descrição mais detalhada pode ser encontrada em Centofante *et al.* (2002).

Em vários casos, como em *Leporinus*, *Parodon*, *Semaprochilodus* e *Microlepidogaster*, o acúmulo de heterocromatina constitutiva propiciou um aumento diferencial do cromossomo W ao longo do processo evolutivo, levando à sua diferenciação morfológica em relação ao cromossomo Z. De fato, nessas espécies, o cromossomo W é o maior do complemento cariotípico, sendo facilmente identificado, com o braço longo quase totalmente heterocromático.

Em *Leporinus*, segmentos distintos de heterocromatina, caracterizados por fluorocromos base específicos, podem ser observados nos cromossomos sexuais (Molina *et al.*, 1998). Os dados obtidos, a partir de diferentes metodologias de análise, corroboram a proposição de que houve uma origem comum para o sistema de cromossomos sexuais entre diferentes espécies do gênero (Galetti Jr. & Foresti, 1986; Galetti Jr., Lima & Venere, 1995).

1.4. O sistema ZZ/ZW e as regiões organizadoras de nucléolos em *Triportheus*

O gênero *Triportheus* começou a ser citogeneticamente estudado por Falcão (1988), com a análise das espécies *T. albus*, *T. culter*, *T. auritus*, *T. angulatus* e *T. cf. signatus*, seguindo-se os estudos com *T. guentheri*, *T. cf. auritus* e distintas populações de *T. nematurus* (Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002) e *T. venezuelensis* (Nirchio *et al.*, 2007). A Figura 1 mostra a distribuição das espécies de *Triportheus* já estudadas.

Esses estudos demonstraram algumas características inerentes ao gênero *Triportheus*. Assim, todas essas espécies compartilham o mesmo número diplóide, sendo mantido o valor $2n=52$ cromossomos. O cariótipo se mantém conservado, com uma macroestrutura cariotípica bastante similar entre as diferentes espécies, além de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW que é mais uma característica do grupo como um todo.

O cromossomo Z também é conservado em todas as espécies, correspondendo ao cromossomo metacêntrico de maior tamanho do cariótipo (par 1), evidenciando segmentos heterocromáticos presentes em ambas regiões

teloméricas, assim como na região centromérica. Por outro lado, o cromossomo W apresenta diferenças marcantes entre as espécies de *Triportheus*, tanto na morfologia como no tamanho, mas é sempre menor que o cromossomo Z. Apresenta-se quase totalmente heterocromático, com distintos padrões de distribuição da heterocromatina. É evidente que a heterocromatina encontra-se claramente envolvida na diferenciação do sistema ZW de *Triportheus*, particularmente na sua localização e distribuição no cromossomo W, o qual sofreu uma redução diferenciada de tamanho conforme as diferentes espécies.

Ao que tudo indica, o sistema ZZ/ZW de *Triportheus* deve ser uma característica basal na sua filogenia, correspondendo à uma sinapomorfia para o grupo (Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo 2002). Essa condição também parece ser única entre os peixes, uma vez que em outros grupos apenas algumas espécies são portadoras de um sistema cromossômico diferenciado entre os sexos, podendo ser encontradas ao lado de espécies congênicas com cariótipos homomórficos.

A ocorrência de duas regiões organizadoras de nucléolos (RONs) corresponde à condição mais comumente encontrada entre as espécies de *Triportheus*. As Ag-RONs geralmente estão localizadas no braço curto de um único par de cromossomos, tanto em machos quanto em fêmeas (Falcão, 1988, Sánchez & Jorge, 1999). Em *T. nematurus*, *T. cf. auritus* e *T. guentheri* a presença de um sítio de Ag-RONs na extremidade distal do braço longo do cromossomo W foi também evidenciada (Artoni & Bertollo, 2002).

Os resultados obtidos com sonda de rDNA 18S confirmaram a presença destes sítios no cromossomo W de *T. nematurus*, *T. cf. auritus* e *T. guentheri*, mesmo nos casos onde os sítios Ag-RONs mostraram-se inativos, sugerindo que

esses sítios podem estar também presentes nas demais espécies do gênero (Artoni & Bertollo, 2002).



Figura 1. Hidrografia da América do Sul, mostrando a distribuição de espécies de *Triportheus* já estudadas. **(A)** bacia do São Francisco; **(B)** bacia do Paraná-Paraguai; **(C)** bacia Amazônica; **(1)** *T. guentheri* (rio São Francisco); **(2)** *T. nematurus* (rio Cuiabá); **(3)** *T. nematurus* (rio Paraguai); **(4)** *T. nematurus* (rio Paraná); **(5)** *T. cf. signatus* (Estação de Aqüicultura de Promissão-SP); **(6)** *T. cf. auritus* (rio Araguaia); **(7)** *T. auritus*; *T. angulatus*, *T. culter* e *T. albus* (rios Negro e Solimões) (de ARTONI *et al.*, 2001).

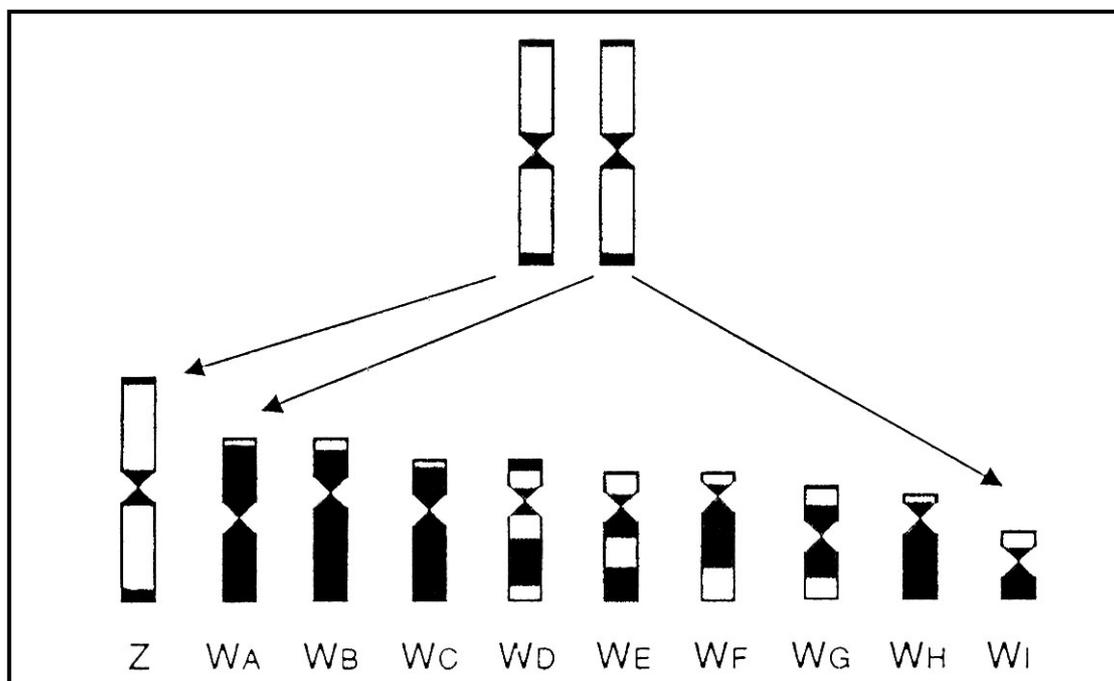


Figura 2. Idiograma mostrando o cromossomo Z e as distintas formas de cromossomo W de *Triportheus*, e sua diferenciação a partir de um provável par homomórfico ancestral. As áreas escuras correspondem à localização da heterocromatina constitutiva nos cromossomos. **WA:** *T. auritus*; **WB:** *T. cf. auritu*; **WC:** *T. nematurus* - rio Paraguai; **WD:** *T. nematurus* - rio Cuiabá; **WE:** *T. nematurus* - rio Paraná; **WF:** *T. cf. signatus*; **WG:** *T. guentheri*; **WH:** *T. angulatus*, **WI:** *T. albus*. (ARTONI *et al.*, 2001).

1.5. Citogenética clássica e molecular

Até a década de setenta os estudos citogenéticos em peixes eram mais limitados quanto às informações mais precisas do genoma desse grupo. A citogenética clássica era a mais difundida, empregando a coloração convencional com Giemsa, o bandamento C e a localização das RONS pelo nitrato de Prata (Ag-RONS). Na década seguinte, com o advento da citogenética molecular, começaram a surgir informações mais detalhadas, principalmente com o advento da técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH). Assim, a utilização das sondas de rRNA 45S, rDNA 5S, bem como de DNAs repetitivos distintos, se tornou uma importante ferramenta para o estudo da composição do material genético e a estrutura dos cromossomos dos peixes.

A associação da citogenética clássica e molecular possibilitou um grande desenvolvimento da citogenética de peixes nos últimos 20 anos, principalmente no Brasil, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura e evolução do cariótipo, cromossomos sexuais, cromossomos B, polimorfismos cromossômicos, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos.

A citogenética molecular é baseada principalmente na técnica de FISH, onde uma sonda de DNA marcada é hibridada sobre alvos citológicos (cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina estendidas, etc). Mais recentemente, novas metodologias de FISH possibilitam utilizar diversas sondas marcadas com diferentes fluorocromos, muitas delas já empregadas em diferentes grupos biológicos, como a M-FISH (multiplex-FISH) (Pietzarca, 2005), SKY (Spectral Karyotyping) e COBRA (Combined Binary Ratio Labelling) (Speicher & Carter, 2005). Em todos estes casos, as diferentes sondas

podem ser hibridadas simultaneamente no genoma do organismo em estudo, caracterizando com uma maior precisão eventos de alteração ou evolução do cariótipo. Especificamente no caso dos peixes, essas técnicas não têm sido ainda utilizadas.

Outro passo importante no estudo dos cromossomos foi obtido a partir do processo de microdissecção. A obtenção de sondas cromossômicas por microdissecção, seja de regiões específicas ou de um cromossomo inteiro (WCP: Whole Chromosome Painting), foi possível graças ao desenvolvimento de primers universais que permitem a amplificação de grandes regiões de DNA através de DOP-PCR (DNA Degenerate Oligonucleotide-Primed). Na síntese de sondas para WCP é feita, em um primeiro passo, uma amplificação inespecífica utilizando-se primers degenerados. Em um segundo passo tem-se uma amplificação específica e, finalmente, o DNA é marcado para funcionar como uma sonda de FISH.

Assim, a utilização desta metodologia na citogenética de peixes é bastante promissora, pois possibilita um conhecimento mais refinado da estrutura molecular dos cromossomos, podendo ser também aplicada em estudos citogenéticos evolutivos e no melhor entendimento das relações existentes entre espécies e populações.

1.6. Justificativa e objetivos

Conforme destacado nos itens anteriores, as espécies do gênero *Triportheus* apresentam cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, o sistema cromossômico de diferenciação sexual mais comum entre os peixes Neotropicais. Porém, diferentemente do que se verifica com esse sistema na maioria dos outros grupos de peixes, o cromossomo W, embora heterocromático, apresenta um

tamanho reduzido em relação ao cromossomo Z, além de estar presente em todas as espécies de *Triportheus* já estudadas, provavelmente constituindo uma sinapomorfia para o grupo. Essa característica tem despertado o interesse sobre a origem e evolução desse sistema pouco usual, bem como sobre as possíveis inferências filogenéticas relacionadas ao processo de diferenciação sexual no gênero em comparação a outros Characidae. Porém, os resultados até então disponíveis ainda são insuficientes para a elaboração de dados mais conclusivos, necessitando da utilização de um maior número de ferramentas citogenéticas e moleculares, a fim de se obter um melhor conhecimento da estrutura organizacional desses cromossomos. Além disso, o gênero também apresenta espécies ainda não avaliadas citogeneticamente. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos:

- a) Caracterizar o cariótipo de novas espécies/populações de *Triportheus*, com ênfase no sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, pela análise da heterocromatina constitutiva, Ag-RONs, coloração por fluorocromos base específicos e FISH com sondas de rDNA 18S e 5S. Pretendeu-se ampliar os dados cromossômicos disponíveis para *Triportheus*, subsidiando a proposta sobre a universalidade do sistema ZW no grupo e a diferenciação estrutural do cromossomo W entre as espécies.
- b) Localizar os sítios de rDNA 18S e rDNA 5S nos cromossomos de diferentes espécies/populações de *Triportheus*. Pretendeu-se complementar os estudos anteriores, com a obtenção de novos dados sobre a distribuição dos genes ribossomais nesse grupo, assim como sua presença nos cromossomos sexuais Z e W.

- c) Realizar a microdissecção do cromossomo Z de *Triportheus* e a amplificação do seu material genético por DOP-PCR, com a obtenção de sonda específica para pintura de cromossomos inteiros (WCP) no genoma de diferentes espécies desse gênero. Pretendeu-se verificar o grau de homologia entre o cromossomo Z, assim como entre o cromossomo Z e o cromossomo W das diferentes espécies de *Triportheus*, obtendo subsídeos sobre a ancestralidade do sistema ZZ/ZW no grupo.
- d) Investigar a possível homologia do cromossomo Z de *Triportheus* com cromossomos de espécies de outros gêneros de Characidae relativamente próximas do ponto de vista filogenético. Pretendeu-se, assim, buscar novas inferências sobre a diferenciação do sistema ZZ/ZW no grupo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material e locais de Coleta

Neste trabalho foram analisadas oito espécies/populações de peixes do gênero *Triportheus* (Fig. 3), provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil e da Argentina (Fig. 4):

- a) *T. guentheri* (rio São Francisco - MG)
- b) *T. trifurcatus* (rio Araguaia - MT)
- c) *T. nematurus* (rio Piracicaba - SP)
- d) *T. auritus* (rio Negro - AM)
- e) *T. angulatus* (rio Negro - AM)
- f) *T. albus* (rio Negro - AM)
- e) *T. cf. signatus* (rio Piranha-Açu, açude Itans - RN)
- g) *T. nematurus* (baixo rio Paraná, Corrientes - AR)

Com exceção de *T. nematurus*, do rio Piracicaba (SP) e *T. trifurcatus*, do rio Araguaia (MT), as demais espécies já haviam sido submetidas a estudos citogenéticos anteriores (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002). Os exemplares de *T. nematurus*, por serem provenientes de uma localidade ainda não registrada para essa espécie, foram submetidos à identificação taxonômica pela Dra. Maria Claudia Malabarba, do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS - Porto Alegre, RS) - onde foram depositados sob os números MCP 40735 e MCP 40765.

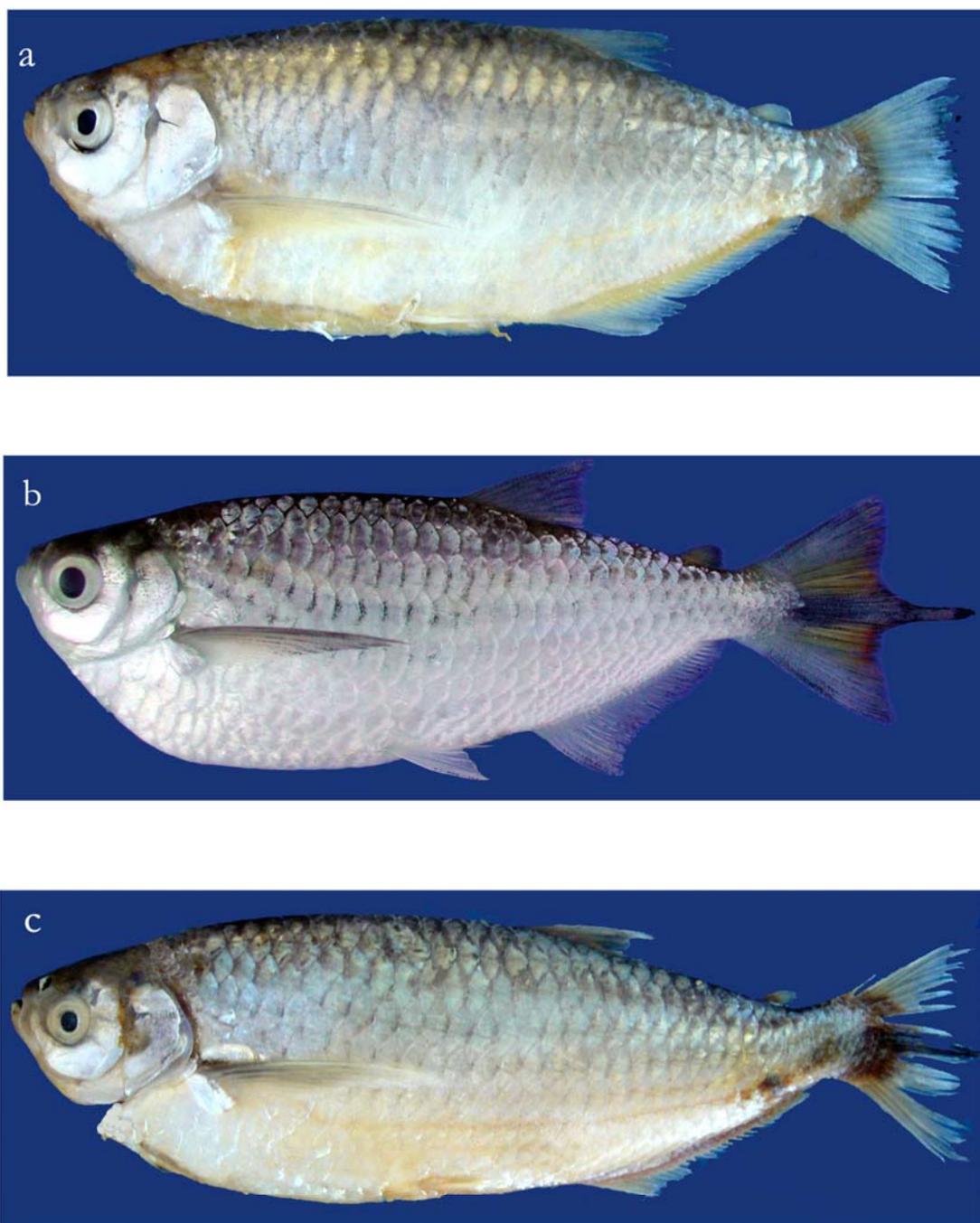


Figura 3: Exemplos de espécies de *Triportheus* estudadas no presente trabalho: a) *T. guentheri* (rio São Francisco); b) *T. trifurcatus* (rio Araguaia - MT); c) *T. nematurus* (rio Piracicaba - SP); d) *T. auritus*, e) *T. angulatus*, f) *T. albus* (rio Negro-AM) e *T. cf. signatus* (rio Piranha-Açú, acude Itans-RN).

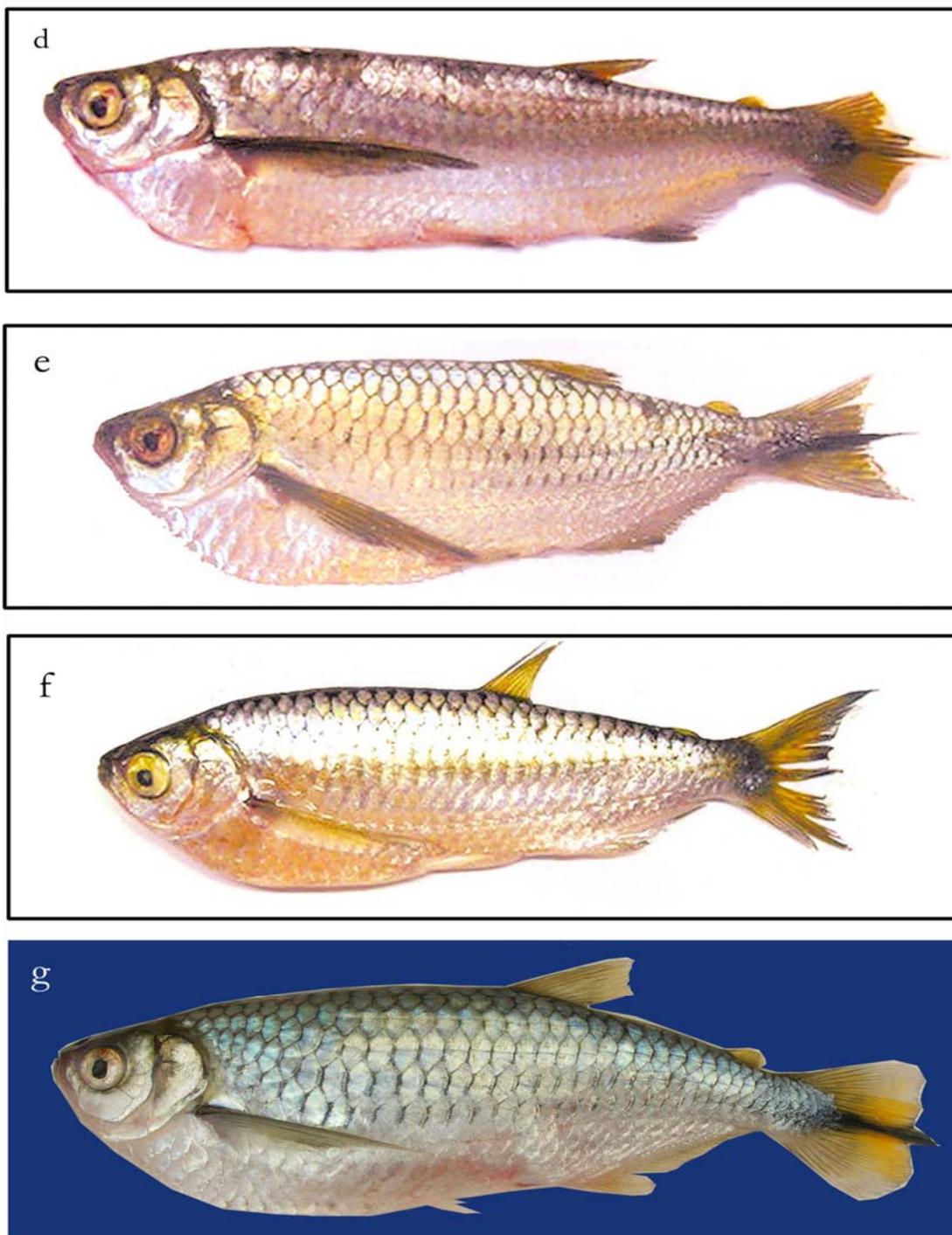


Figura 3. Continuação

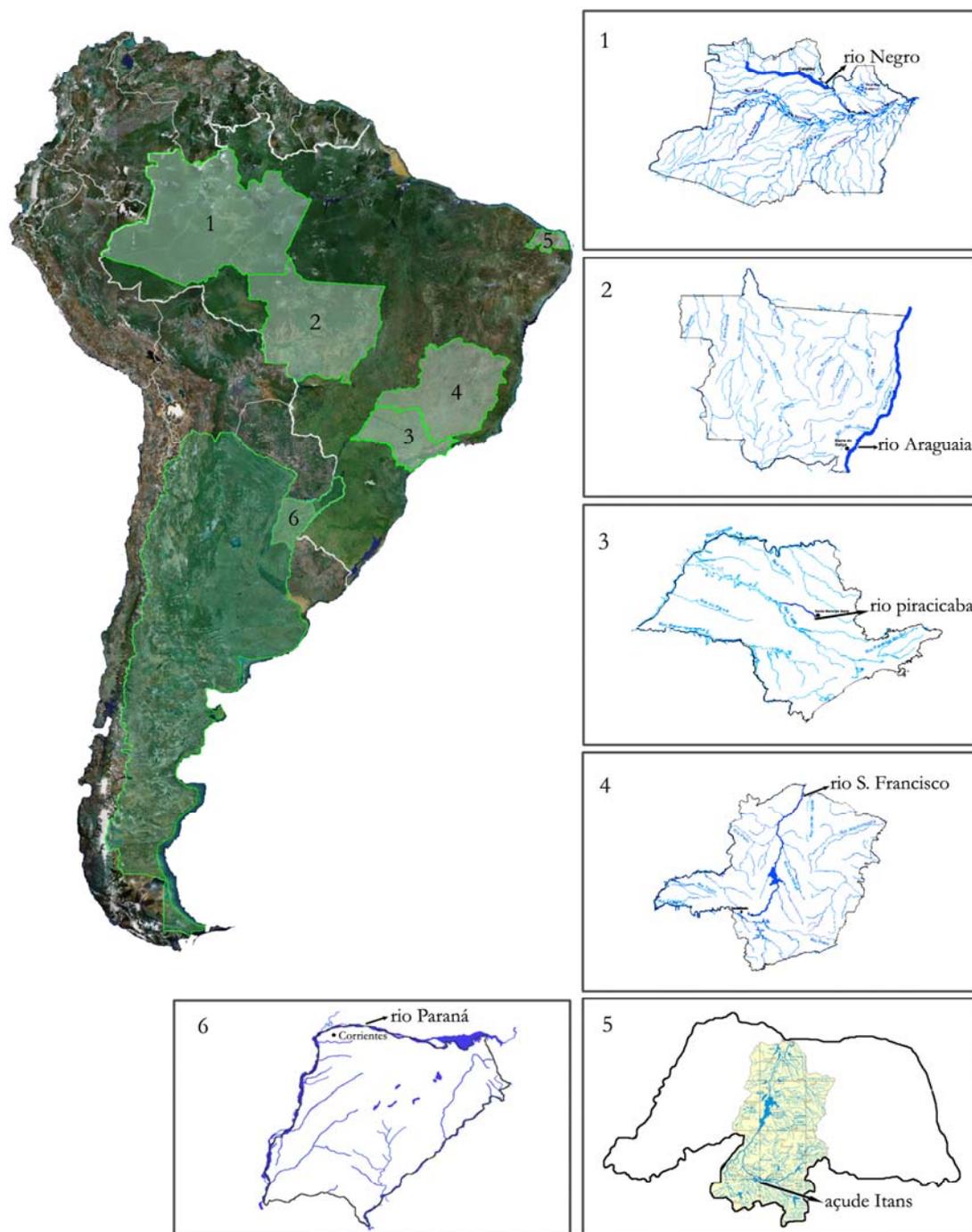


Figura 4: Mapas do Brasil e da Argentina indicando os locais de coleta dos espécimes estudados. As regiões mais claras indicam as distintas bacias hidrográficas: (1) Amazonas; (2) Tocantins-Araguaia; (3) alto Paraná; (4) São Francisco; (5) bacias do Nordeste; (6) baixo Paraná. Nos quadros menores os rios (pontas das setas) nos quais os exemplares foram coletados, em cada bacia: (1) rio Negro-AM; (2) rio Araguaia - MT; (3) rio Piracicaba -SP; (4) rio São Francisco - MG; (5) açude Itans - RN; (6) baixo rio Paraná -AR.

3.2. Preparação de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de cromossomos mitóticos, foi empregada a técnica de tratamento “in vitro”, descrita por Foresti *et al.*, (1993) para o estudo de peixes, com algumas modificações. Fragmentos do rim anterior foram colocados em 10 ml de meio de cultura RPMI e dissociados com pinças de ponta fina e uma seringa, desprovida de agulha. A suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrífuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur, adicionando-se 1-2 gotas de solução de colchicina 0,025%, misturando-as bem com o material. Seguiu-se uma incubação à temperatura ambiente por 30 minutos e uma centrifugação do material durante 10 minutos, a 900 rpm, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 10ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), re-suspendendo bem o material transferido-o para estufa a 37°C, por mais 28 minutos. Após essa hipotonização, as células passaram pelo processo de fixação, que consiste em três centrifugações de 10 minutos, sempre eliminando o sobrenadante, utilizando-se uma solução de metanol e ácido acético, na proporção de 3:1. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionou-se cerca de 1ml de fixador no sedimento celular e homogenizou-se o mesmo. O material foi então acondicionado em um frasco tipo “Ependorff” e estocado em freezer. Em Algumas gotas deste material foram posteriormente pingadas sobre uma lâmina bem limpa, previamente aquecida em água a 55°C. Os cromossomos foram corados com Giemsa 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 8-10 minutos, com lavagem posterior em água corrente. Após a secagem, a lâmina foi analisada em microscópio óptico.

3.3 Detecção da heterocromatina constitutiva

A heterocromatina constitutiva foi evidenciada pelo bandamento C (Sumner, 1972), com algumas adaptações. As lâminas foram tratadas com uma solução de HCl 0,2 N, à temperatura ambiente, durante 13 minutos e, a seguir, submergidas numa solução de hidróxido de bário 5%, à temperatura ambiente, por 1 minuto e 10 segundos. Logo após, as lâminas foram lavadas em solução de HCl 0,2 N e incubadas numa solução salina 2xSSC, aquecida a 60° C, por 30 minutos. Os cromossomos foram corados com uma solução do corante Giemsa 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 8 minutos. Após cada um dos passos acima, as lâminas foram lavadas com água destilada e secadas ao ar.

3.4. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)

Para a detecção das RONs utilizou-se o procedimento descrito por Howell & Black (1980), empregando o nitrato de prata (Ag-RONs). As lâminas foram tratadas com uma mistura contendo 2 partes de uma solução aquosa de gelatina 2% (acrescida de ácido fórmico 1% na proporção de 1ml para cada 100ml de solução) e 4 partes de uma solução de nitrato de prata 50%. O material foi recoberto com uma lamínula e incubado em estufa a 60°C, por aproximadamente 5 minutos. A lamínula foi então retirada com um jato de água destilada e os cromossomos rapidamente corados com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8), por 30 segundos, seguindo-se uma lavagem em água corrente.

3.5. Dupla coloração com os fluorocromos Cromomicina A₃ e DAPI, com cromossomos desnaturados

Utilizou-se a metodologia descrita por Christian *et al.* (1998). O material cromossômico foi pingado nas lâminas e estas colocadas em formamida 70%, em 2xSSC a 70°C, por 2 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por dois banhos de 2xSSC, à temperatura ambiente, por 2 minutos em cada banho. As lâminas foram então transferidas para uma bateria de álcool 70%, 85% e 100%, 2 minutos em cada banho. Após secagem, adicionou-se 80 µL de Cromomicina em cada lâmina, permanecendo 30 minutos em câmara escura na geladeira. Após este período, as lâminas foram banhadas três vezes em PBS 1X, dois minutos em cada banho e imediatamente (antes de secar) montadas com 80 µL de solução de DAPI/Antifading (0,2 µg/ml), retirando o excesso com papel de filtro. Após alguns minutos, o material já pode ser analisado.

3.6. Localização cromossômica de seqüências de DNA por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986), com ligeiras modificações. Para a realização desta técnica, foram utilizadas 3 tipos de sondas:

- a) sonda de rDNA 18S, obtida do peixe *Prochilodus argenteus* por PCR (Hatanaka & Galetti Jr., 2004), com a utilização dos primers NS₁ (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS₈ (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'), conforme White *et al.* (1990).
- b) sonda do plasmídeo recombinante p-BS//KS, contendo o gene para o rRNA 5S obtido de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999, Martins & Galetti Jr., 2000).

c) sonda obtida por microdissecção do cromossomo sexual Z da espécie *Triportheus nematurus* (rio Piracicaba, SP), conforme metodologia detalhada no item 3.7.

Foram utilizados dois métodos principais para a marcação das sondas: a direta e a indireta, ambas por “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. No caso da marcação indireta, empregou-se a adenina biotilada (14 dATP–biotin - Invitrogen), com posterior detecção pela avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada - Sigma). Na marcação direta, utilizou-se ChromaTide Alexa Flúor 546 – 14 dUTP - Molecular Probes. A solução de hibridação consistiu de 200 µl Formamida (50% de Formamida), 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%), 40 µl de 20xSSC (concentração final 2xSSC), 80 µl de H₂O q.s.p., perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 1,5 µg de sonda (DNA marcado com biotina), no caso da hibridação simples, ou 1 µg de sonda 1 (DNA marcado com biotina) + 1 µg de sonda 2 (DNA marcado com ChromaTide Alexa Flúor 546), quando utilizada a hibridação simultânea com duas sondas (Double FISH). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico. A lâmina, contendo as preparações cromossômicas, foi lavada com tampão PBS 1x (NaCl 0,137 M, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 1,46 mM) por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação e posteriormente desidratada em série alcoólica (70%, 85% e 100%). Em seguida, foi tratada com solução de RNase, 100µ/ml por 1 hora e 30 minutos, em câmara úmida a 37⁰C e lavada duas

vezes em solução de 2XSSC por 10 minutos e com tampão PBS 1X, durante 5 minutos, sob agitação. Seguiu-se um tratamento com solução de pepsina 0,05% em HCl 10 mM a 37⁰C, por 10 minutos, lavagem em PBS 1X, por 5 minutos, sob agitação e posterior fixação em formaldeído 1% com MgCl₂ 50 mM, por 10 minutos. O material foi novamente lavado em PBS 1X, por 5 minutos, sob agitação e, em seguida, desidratado em uma série alcoólica (70%, 85% e 100%), 5 minutos em cada banho, e tratado com formamida 70%/2xSSC, a 70⁰C, por 5 minutos, para desnaturação dos cromossomos. Seguiu-se uma nova desidratação em série alcoólica (70%, 85% e 100%), 5 minutos em cada banho, a 20⁰C. Foram aplicados sobre a lâmina, 50µl da solução de hibridação contendo a sonda desnaturada, permanecendo “overnight” a 37⁰C, em câmara úmida. Em seguida, a lâmina foi lavada com solução de formamida 50%/2xSSC a 42⁰C, por 10 minutos, três vezes com 0,1xSSC a 60⁰C, 5 minutos em cada lavagem e com solução “Tween” 20 (0,05%/2xSSC), sob agitação, por 5 minutos. Seguiu-se um tratamento com 90µl de NFDM 5% (“nom fat dry milk) em 4xSSC, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Para detecção da sonda, foram colocados sobre cada lâmina, 70µl de FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/µl, por 30 minutos., em câmara úmida, com três lavagens sucessivas com “Tween” 20, durante 5 minutos em cada lavagem. O sinal de hibridação foi amplificado com cerca de 70 µl de anti-avidina biotina-conjugada, por 30 minutos, com três lavagens adicionais com “Tween” 20, durante 5 minutos em cada lavagem. Este ciclo e o tratamento com FITC foi repetido mais uma vez. Finalmente, a lâmina foi desidratada em série alcoólica (70%, 85% e 100%), durante 5 minutos em cada banho. Os sinais de hibridação foram detectados com avidina-FITC ou ChromaTide Alexa Flúor 546 – 14 dUTP e os cromossomos contra-corados com

iodeto de propídio (50 µg/ ml) ou DAPI (0,2 µg/ml), respectivamente, em antifading (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid - Fluka 78460) sendo as lâminas montadas com 25 µl desta solução.

3.7. Obtenção de sonda cromossômica por microdissecção

a) Preparação das agulhas. Foram utilizados capilares de borosilicato com aproximadamente 1 milímetro de diâmetro. Os capilares foram colocados em “pulley” (Narishige PC-10) e aquecidos, formando a ponta da agulha a ser utilizada. Após a preparação, as agulhas foram colocadas em um local protegido para evitar contaminação.

b) Preparação do material (Mühlmann *et al*, 1995). As preparações cromossômicas devem ser boa qualidade, com pouco contato com ácido acético, sendo preferencialmente mantidas em metanol a -80°C. A suspensão celular deve ser pingada em uma lamínula bem limpa e as metáfases devem ficar bem espalhadas para evitar a microdissecção de fragmentos de outros cromossomos diferentes daquele desejado. O material pode ser corado com Giemsa 5%, por 8 minutos, para se identificar o cromossomo de interesse. Neste caso, o cromossomo utilizado para microdissecção foi o cromossomo Z de *Triportheus nematurus* (rio Piracicaba) de fácil identificação, por ser um cromossomo metacêntrico grande, o de maior tamanho do complemento cariotípico. Após a microdissecção, foram feitos 3 PCRs (Polimerase Chain Reaction). Na primeira PCR, foi feita uma amplificação inespecífica do cromossomo inteiro, através de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR), utilizando-se o primers DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'), segundo Telenius *et al.* (1992). Seguiu-se uma PCR convencional, para obtenção de um estoque da

primeira PCR. Na terceira PCR, também convencional, ocorreu a marcação dos produtos obtidos por microdissecção.

Para a primeira PCR, preparou-se um tubo de 0,5 ml com uma reação de DOP-PCR, que consiste de 15,5 μ l de água destilada esterilizada, 2 μ l. de 10X Termosequenase reaction buffer, 4 μ l de dNTP (2,5 mM cada) e 2 μ l de 2 μ M primer DOP. Aproximadamente 15-20 cromossomos foram microdissectados, a ponta das agulhas foram quebradas dentro do tubo contendo o mix da PCR. O tubo com a reação foi aquecido a 90°C por 10 min. Essa solução foi centrifugada brevemente e em seguida, adicionou-se 2,5 μ l de 4U/ μ l Termosequenase (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit - USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient, da Eppendorf. Os produtos da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, verificando o tamanho dos fragmentos amplificados, que devem apresentar um tamanho entre 300 e 600 pb, após cada PCR. Foram seguidas as seguintes condições:

12 ciclos {

- 94°C.....3'
- 94°C.....1'30"
- 37°C.....2'
- 37°C.....1" subindo 0,2°C/s até 72°C
- 72°C.....1'30"

30 ciclos {

- 94°C.....1'30"
- 62°C.....1'
- 72°C.....1'30"

 Hold 4°C

Na segunda PCR, a reação constituiu-se de 33,5 µl de água destilada esterilizada, 5 µl de 10X PCR reaction buffer, 4µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de DOP primer (100 µM) e 0,5 de Taq polymerase. Adicionou-se 2 µl do produto da primeira PCR, tendo como um volume final 50µl.

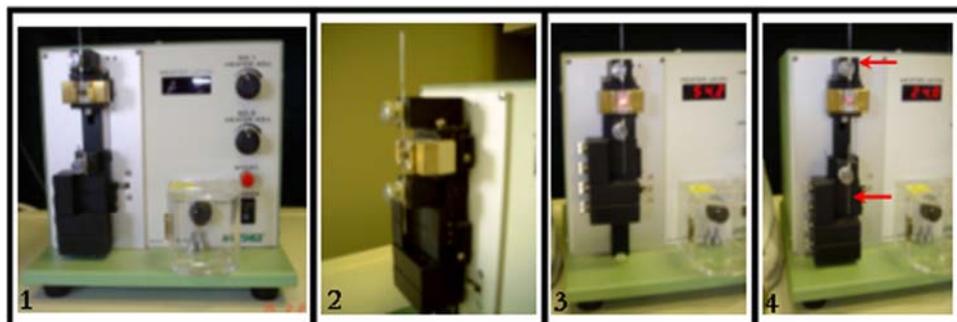
Na terceira PCR utilizou-se 32,5 µl de água destilada esterilizada, 5 µl de 10X PCR reaction buffer, 4µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 1µl de dNTP marcado, 3 µl de DOP primer (100 µM) e 0,5 µl de 5U/µl Taq polymerase. Adicionou-se 2µl do produto da 2ª PCR, totalizando um volume final de 50µl. A segunda e a terceira PCRs seguiram as seguintes condições:

30 ciclos {

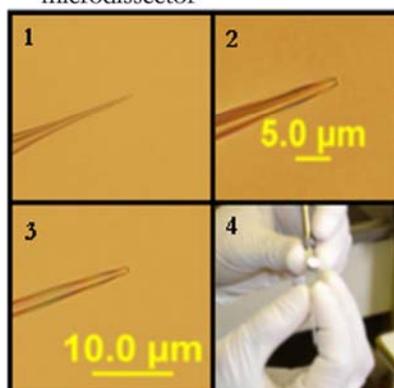
- 90°C.....3'
- 90°C.....1'30"
- 56°C..... 1'30"
- 72°C.....1'30"

 Hold 4°C

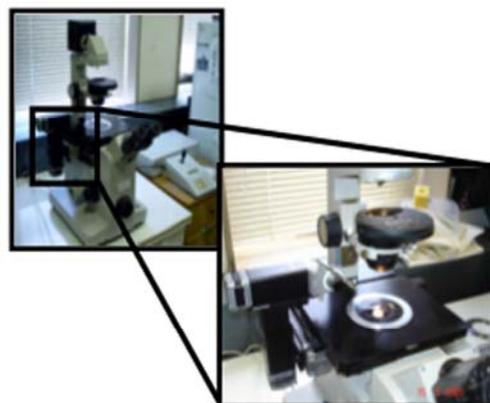
a) Preparação de duas agulhas (setas) com o “pulley” utilizado.



b) Agulhas e aluste no suporte do microdissector



c) Microscópio e microdissector



d) Preparação das laminulas, microdissecção cromossômica e preparação do DOP-PCR

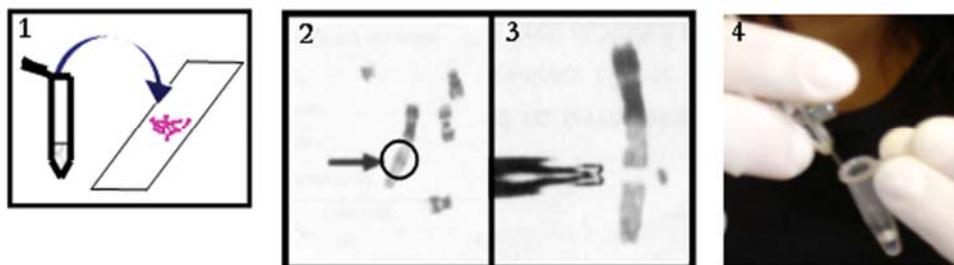
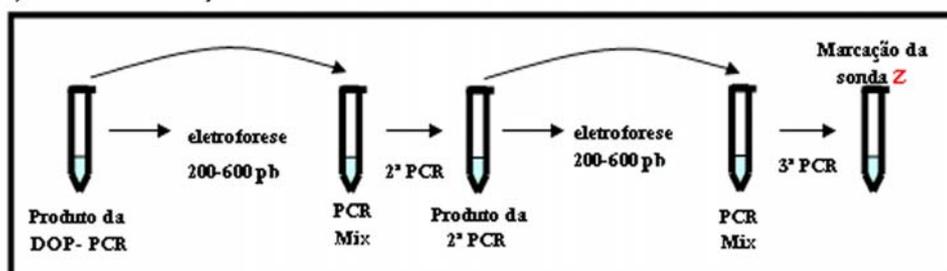


Figura 5: Detalhes da técnica de microdissecção cromossômica.

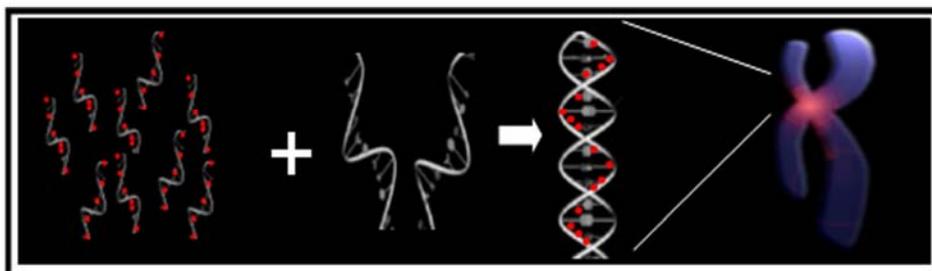
e) Primeira PCR e obtenção dos fragmentos amplificados.



f) Demais PCRs e marcação da sonda Z.



g) Desnaturação da sonda marcada e cromossomo alvo; renaturação do cromossomos alvo com a sonda marcada; marcação obtida no cromossomo alvo



h) WCP em cromossomos metafásicos de macho de *T. serratorum* mostrando dois cromossomos Z completamente marcados após FISH (setas).

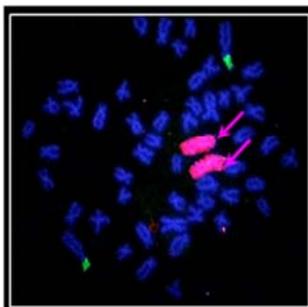


Figura 5: Continuação.

3.8. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais, com bandamento C e Ag-RONs foram analisadas em microscópio óptico Olympus CBA. As preparações de FISH e de fluorocromos base específicos foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX50. Em ambos os casos, as imagens foram capturadas utilizando-se o software CoolSNAP-Pro, Image Pro Plus, 4,1 (Media Cybernetics). A revelação digital das imagens foi feita em papel de qualidade fotográfica.

Os cromossomos foram classificados morfologicamente de acordo com Levan et al. (1964) e organizados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho, conforme critério anteriormente adotado para outras espécies do gênero *Triportheus*. Para um melhor ajuste no pareamento dos cromossomos foi utilizado o programa Easy Idio (Diniz e Xavier, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dos dados obtidos nesta tese encontram-se organizados em três capítulos, referentes a trabalhos científicos. O primeiro capítulo já foi submetido para publicação na revista *Genetica* (Holanda) e os demais serão submetidos posteriormente à defesa desta tese. As referências bibliográficas de cada capítulo encontram-se incluídas no final da tese, para otimizar a apresentação da mesma.

Capítulo I. Cariótipo, mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S e caracterização do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae)

Karyotype, physical mapping of 18S and 5S ribosomal genes and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica** (submitted)

Diniz, D¹., Moreira-Filho, O¹. & Bertollo, L. A. C¹.

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil (Phone: +55-16-33518431; Fax: +55-16-33518377; e-mail: bertollo@power.ufscar.br)

RESUMO. Foram estudados os cromossomos de *Triportheus nematurus*, uma espécie de peixe da família Characidae, analisando-se o cariótipo convencional, a localização da heterocromatina constitutiva, das Ag-RONs e dos sítios CG- e AT-ricos nos cromossomos, assim como o mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S e de rDNA 5S. O número diplóide encontrado foi de $2n=52$ cromossomos, tanto em machos como em fêmeas. Entretanto, as fêmeas apresentaram um par de cromossomos heteromórficos bem diferenciados, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. O cromossomo Z é o maior do complemento, com a ocorrência de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentromérica e teloméricas. O cromossomo W é em grande parte heterocromático, evidenciando heterocromatina heterogênea, composta por regiões GC-ricas e AT-ricas. As Ag-RONs, também ricas em CG, são delimitadas por regiões heterocromáticas, encontrando-se localizadas na constrição secundária presente no braço curto do segundo par de cromossomos do cariótipo, em concordância com os sítios de rDNA 18S, detectados pela hibridação fluorescente *in situ*. O rDNA 5S mostra uma localização sintênica e adjacente ao rDNA 18S, caracterizando uma situação pouco freqüente entre os peixes. Os resultados obtidos em *T. nematurus* reforçam a condição basal do sistema ZZ/ZW na filogenia do gênero *Triportheus*, provavelmente pré-datando a especiação do grupo.

Palavras chave: *Triportheus*, cariótipo, cromossomos sexuais, heterocromatina, sintenia de genes ribossomais.

INTRODUÇÃO

A família Characidae é uma das maiores e mais complexas entre os peixes Neotropicais da ordem Characiformes (Nelson, 1994), incluindo diversos gêneros ainda não bem caracterizados quanto às suas relações filogenéticas. Lima et al. (2003) consideram vários gêneros *incertae sedis* em Characidae, dentre os quais se encontra o gênero *Triportheus*. Considera-se um total de dezesseis espécies válidas para este gênero, a maioria delas presente nas bacias hidrográficas da América do Sul (Malabarba, 2004).

O gênero *Triportheus* começou a ser citogeneticamente analisado por Falcão (1988), com as espécies *T. albus*, *T. culter*, *T. auritus*, *T. angulatus* e *T. cf. signatus*, seguindo-se os estudos com *T. guentheri*, *T. cf. auritus*, distintas populações de *T. nematurus* (Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al., 2001; Artoni & Bertollo, 2002) e *T. venezuelensis* (Nirchio et al., 2007). Todas essas espécies caracterizam-se por compartilhar o mesmo número diplóide, $2n=52$ cromossomos, assim como um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, o que levou à proposta de que este sistema deve corresponder à uma sinapomorfia nesse gênero, representando uma característica particular desse grupo de Characidae (Artoni & Bertollo, 2002). Apesar da macroestrutura cariotípica bastante similar, o cromossomo W apresenta diferenças marcantes entre as espécies de *Triportheus*, tanto na morfologia como no tamanho, mas é sempre menor que o cromossomo Z (Artoni et al., 2001).

Embora a maioria das espécies não apresente cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos já foram identificados em diferentes grupos de peixes (Devlin & Nagahama, 2002), correspondendo aos tipos ZZ/Z0, XX/X0, ZZ/ZW, XX/XY,

$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , ZZ/ZW_1W_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$, muitos deles encontrados entre os peixes Neotropicais (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Almeida-Toledo, 1998; Centofante *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2006; Oliveira, 2006). A heterogametia feminina, principalmente em relação ao sistema ZZ/ZW, tem sido mais freqüente, correspondendo a mais de 50% das ocorrências de cromossomos sexuais. Neste caso, enquadram-se algumas espécies dos gêneros *Leporinus*, *Parodon*, *Characidium*, *Thorococarax*, *Potamorhina*, *Semaprochilodus*, *Cheirodon*, *Odontostilbe*, *Hypostomus*, *Microlepdogaster*, *Loricariichthys*, *Opsodoras*, *Eigenmannia*, *Gambusia*, (Centofante *et al.*, 2002), de *Apareiodon* (Vicari *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006), além de todas as espécies estudadas de *Triportheus*.

No presente estudo os cromossomos de uma população de *T. nematurus*, até então não estudada, foram analisados utilizando-se metodologias convencionais e de citogenética molecular para a caracterização do cariótipo e do sistema ZZ/ZW, buscando novos subsídios quanto à universalidade deste sistema neste grupo e sua origem.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 40 espécimes (23 machos e 17 fêmeas) de *T. nematurus*, provenientes do rio Piracicaba (bacia do alto Paraná), na região de Santa Maria da Serra (22°37'23"S; 48°10'14"W) São Paulo, Brasil. Os peixes foram identificados pela Dra. Maria Claudia Malabarba, do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) - Porto Alegre, RS, Brasil - onde foram depositados sob os números MCP 40735 e MCP 40765.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento *in vitro* descrito por Foresti *et al.* (1993). Cerca de trinta metáfases foram analisadas por indivíduo, para a determinação do número diplóide (2n). Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan *et al.* (1964) e organizados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho, conforme critério anteriormente adotado para outras espécies do gênero *Triportheus*. Para um melhor ajuste no pareamento dos cromossomos foi utilizado o programa Easy Idio (Diniz & Xavier, 2006). A heterocromatina constitutiva foi identificada segundo Sumner (1972) e as regiões organizadoras de nucléolo foram destacadas utilizando a coloração com o nitrato de Prata - AgRONs (Howell & Black, 1980).

As regiões ricas em pares de bases GC e AT foram identificadas respectivamente pelos fluorocromos Cromomicina A₃ e DAPI, de acordo (Christian *et al.*, 1998), onde após pingar o material nas lâminas, estas foram colocadas na formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 2 minutos. Em seguida, passadas por 2 banhos de 2xSSC à temperatura ambiente por 2 minutos em cada. Após este banho, as lâminas passaram por uma bateria de álcool 70%, 85% e 100%, 2 minutos em cada. Após a secagem das lâminas, adicionou-se 80 µL de cromomicina em cada uma e deixou-se por 30 minutos em câmara escura na geladeira. Após este período, as lâminas foram banhadas três vezes em PBS 1X, por dois minutos em cada banho. Antes que as lâminas secassem, as lâminas foram montadas com 80 µL de solução de DAPI/Antifading (0,2 µg/ml), retirando o excesso com papel filtro. Após alguns minutos, o material foi analisado.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para o mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S e rDNA 5S nos cromossomos. Foram empregadas

sondas de rDNA 18S (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e de rDNA 5S (Martins & Galetti Jr., 1999), conforme a metodologia de Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. Utilizou-se o procedimento Double FISH, que permite a hibridação simultânea com as duas sondas empregadas. As sondas foram marcadas por “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Neste caso, uma sonda recebeu uma marcação indireta, usando-se Adenina biotilada (14 dATP–biotin - Invitrogen), com posterior detecção pela Avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-Avidina conjugada 490/520 nm - Sigma) enquanto que a outra sonda recebeu uma marcação direta, empregando-se ChromaTide Alexa Flúor (546 – 14 dUTP 550/570 nm). As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX50, sendo as imagens cromossômicas capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

RESULTADOS

O número diplóide encontrado foi $2n=52$ cromossomos, tanto para machos quanto para fêmeas, incluindo cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos. Entretanto, enquanto que os espécimes machos apresentaram um cariótipo homomórfico (Fig. 1a), as fêmeas evidenciaram apenas um cromossomo do par $n^{\circ} 1$, o maior metacêntrico do cariótipo, além de um cromossomo subtelocêntrico pequeno, exclusivo deste sexo (Fig. 1b), caracterizando um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

A heterocromatina constitutiva foi evidenciada nas regiões pericentroméricas e teloméricas de vários cromossomos do cariótipo (Fig. 2).

Enquanto que o cromossomo Z mantém este padrão de distribuição da heterocromatina, ou seja, apresenta blocos heterocromáticos pericentromérico e teloméricos bem evidentes, o cromossomo W mostra-se quase totalmente heterocromático, com apenas uma pequena porção eucromática terminal no braço curto (Fig. 2b). No par cromossômico nº 2 destaca-se a heterocromatina localizada nas regiões telomérica e adjacente ao centrômero do braço curto, logo acima e abaixo da constrição secundária ali presente (Fig. 2).

Ag-RONs foram localizadas no braço curto do segundo par de cromossomos, na região da constrição secundária, tanto nos machos como nas fêmeas (Fig. 3a). Eventualmente, o cromossomo W de alguns espécimes também se apresentou marcado pela prata, na região terminal do braço longo (Fig. 3b). As Ag-RONs do par nº 2 responderam positivamente à coloração com o fluorocromo Cromomicina A₃ (Fig. 3c) e negativamente ao DAPI (Fig. 3e), mostrando-se assim como segmentos GC-ricos. O cromossomo W apresentou uma região CMA₃ positiva na porção terminal do braço longo (Fig. 3d), assim como um segmento menor DAPI⁺ também localizado neste mesmo braço (Fig. 3f). Entretanto, aparentemente apenas a região CMA₃ positiva parece ser coincidente com a RON presente nesse cromossomo.

A hibridação *in situ* possibilitou detectar a sintonia dos genes ribossomais 18S e 5S nos cromossomos do par nº 2. Enquanto que o sítio de rDNA 18S está localizado na região da constrição secundária, coincidente portanto com a Ag-RON, o sítio de rDNA 5S ocupa uma posição adjacente, logo abaixo do sítio 18S, mais próxima ao centrômero (Fig. 3g). Por sua vez, o cromossomo W também evidenciou um sítio de rDNA 18S na extremidade distal do braço longo, coincidindo com a Ag-RON ali localizada (Fig. 3h).

DISCUSSÃO

O cariótipo de *T. nematurus* mostrou uma macroestrutura similar àquela encontrada nas demais espécies desse gênero, tanto no que se refere à morfologia cromossômica, como ao número diplóide $2n=52$. O mesmo também é válido em relação ao sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, visto que todas as espécies já estudadas (cerca de 50% das espécies reconhecidas por Malabarba, 2004) caracterizam-se por esse sistema (Fig. 1). Na realidade, *Triportheus* é o único gênero de peixes onde um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos parece ser uma característica basal na sua filogenia (Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002), provavelmente pré-datando a especiação desse grupo. Em outros grupos de peixes, apenas algumas espécies são portadoras de um sistema cromossômico diferenciado entre os sexos, podendo ser encontradas ao lado de espécies congênicas com cariótipos homomórficos.

Um processo de heterocromatinização mostra-se claramente associado com a diferenciação do cromossomo W, na maioria dos casos ZZ/ZW entre os peixes (Haaf & Schmid, 1984; Phillips & Ihssen, 1985; Galetti Jr. & Foresti, 1986; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Artoni *et al.*, 2001; Vicari *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006). Por um lado, podem ser encontradas espécies com o cromossomo W heterocromático e maior que o cromossomo Z, ao lado de espécies com o cromossomo W heterocromático e menor que o Z (detalhamento em Centofante *et al.*, 2002), considerando a diferenciação deste sistema a partir de um possível par ancestral de homólogos. Em *T. nematurus* da população analisada, o cromossomo W, subtelocêntrico, apresenta-se também heterocromático em praticamente toda sua extensão, tendo apenas a porção distal do braço curto

euromática (Fig. 2). Esta heterocromatina mostra-se heterogênea na composição, pelo menos em relação ao braço longo, onde segmentos diferenciais ricos em pares de bases GC e AT podem ser identificados (Fig. 3d, f). Assim como nas demais espécies do gênero, o cromossomo W é menor que o cromossomo Z, podendo ser considerado de tamanho médio, similarmente ao que ocorre nas outras populações de *T. nematurus*, *T. cf. signatus*, *T. guentheri* e *T. venezuelensis* (Tabela 1). As particularidades apresentadas pelo cromossomo W entre as espécies de *Triportheus* evidenciam que esse cromossomo passou por uma diferenciação distinta ao longo da evolução cariotípica do grupo. Visto que o gênero *Triportheus* pode ser encontrado em várias bacias hidrográficas da América do Sul, o isolamento entre bacias ou mesmo entre tributários de uma mesma grande bacia, pode ter favorecido a evolução diferencial do cromossomo W entre as diferentes espécies (Artoni *et al.*, 2001). Por outro lado, o cromossomo Z evidencia apenas heterocromatina nas regiões pericentromérica e teloméricas, correspondendo ao metacêntrico de maior tamanho do cariótipo, característica esta que é também compartilhada pelas demais espécies de *Triportheus*, exceto *T. venezuelensis* que apresenta parte do braço longo também heterocromática (Nirchio *et al.*, 2007), mostrando-se assim conservada na maioria das espécies desse grupo.

Outra particularidade de destaque do cromossomo W de *T. nematurus* é a ocorrência de um sítio de RON na extremidade distal do braço longo, o que foi confirmado pela hibridação “in situ” com sonda de rDNA 18S (Fig. 3h). Entretanto, este sítio nem sempre se mostrou geneticamente ativo (Hsu *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1976), visto que a Ag-RON correspondente foi esporadicamente observada nessa região. Um sítio de RON no cromossomo W já foi também identificado em

outras populações de *T. nematurus*, *T. cf. auritus* e *T. guentheri* (Artoni & Bertollo, 2002), podendo assim corresponder a uma característica compartilhada pelas demais espécies do gênero, a exemplo do que ocorre com o sistema ZZ/ZW e as características do cromossomo Z. De fato, Artoni & Bertollo (2002) já consideraram a possibilidade da RON no cromossomo W representar uma condição antiga no gênero, provavelmente presente no cromossomo W ancestral do grupo, o que é também corroborado pela sua ocorrência na população de *T. nematurus* aqui analisada. Entretanto, Nirchio *et al.* (2007) não constataram esse sítio de RON no cromossomo W de *T. venezuelensis*, mas sim na região distal do braço longo do cromossomo Z, o que concorda com os dados obtidos em *T. guentheri* (Bertollo & Cavallaro (1992), onde um sítio de Ag-RON foi esporadicamente detectado nessa mesma região, embora não confirmado por FISH (Artoni & Bertollo, 2002). Um reduzido número de cópias de rDNA 18S, tanto no cromossomo W de *T. venezuelensis*, como no cromossomo Z de *T. guentheri*, poderia ser uma possível explicação pela não detecção desses sítios por FISH. Assim como nos demais vertebrados, a localização de sítios de RONs em cromossomos sexuais não é freqüente entre os peixes, tendo sido observada em apenas algumas espécies como *Fundulus diaphanus* (Howell & Black, 1979), *Oncorhynchus mykiss* (Móran *et al.*, 1996), *Salvelinus alpinus* (Reed & Phillips, 1997), *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000), além de *Triportheus*.

Uma pequena variação no número de Ag-RONs pode ocorrer em *Triportheus*, devido à presença esporádica desses sítios em alguns cromossomos (Falcão, 1988; Artoni & Bertollo, 2002). Novamente, *T. venezuelensis* mostrou-se divergente das demais espécies do gênero, evidenciando cinco pares portadores de Ag-NORs e nove pares portadores de sítios de rDNA 18S (Nirchio *et al.*, 2007).

Entretanto, em todas as espécies as Ag-RONs estão sempre presentes em um par cromossômico característico, geralmente evidenciando uma constrição secundária intersticial no braço curto, embora a posição desse par não seja fixa no cariótipo das diferentes espécies. Na população de *T. nematurus* em estudo, esse cromossomo corresponde ao par nº 2, representando o maior cromossomo portador de RON entre as espécies desse gênero, semelhante à condição também encontrada em *T. cf. signatus* (Falcão, 1988) e *T. venezuelensis* (Nirchio *et al.*, 2007). Nas demais espécies, assim como nas outras populações de *T. nematurus*, esse par é de menor tamanho (Falcão, 1988; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002), evidenciando assim modificações cariotípicas ao longo da história evolutiva desse grupo.

O sítio autossômico de rDNA 18S de *T. nematurus* coincide com a região da constrição secundária do par nº 2, em concordância com a localização da Ag-RON, sendo esta região CMA₃ positiva e DAPI negativa (Fig. 3a, c, e, g). A NOR é banda C negativa, mas encontra-se delimitada por heterocromatina localizada logo acima e abaixo da constrição secundária (Fig. 2). Nenhum outro cromossomo, além do cromossomo W, mostrou sítio adicional de RON, mesmo que esporadicamente.

Sítios de rDNA 5S estão frequentemente localizados em posição intersticial nos cromossomos de várias espécies de peixes e outros vertebrados (Martins & Galetti Jr., 2001). A utilização conjunta de sondas de rDNA 18S e rDNA 5S evidenciou a sintonia desses dois genes no par cromossômico nº 2 de *T. nematurus*, sendo o cluster de rDNA 5S adjacente e situado logo abaixo ao cluster de rDNA 18S (Fig. 3g). Sintonia dos sítios de rDNA 18S e 5S também não tem sido uma condição usual nos cromossomos de vertebrados, sendo detectada

em algumas poucas espécies de peixes, como *Salmo salar* (Pendás *et al.*, 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Móran *et al.*, 1996), *Prochilodus lineatus* (Jesus & Moreira-Filho, 2003), *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004), *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2005), *Parodon nasus* e *P. tortuosus* (Bellafronte *et al.*, 2005). *T. nematurus* é a primeira espécie desse gênero com dados sobre o mapeamento do rDNA 5S nos cromossomos o que, por ora, não possibilita concluir se a sintonia dos genes ribossomais é também compartilhada no gênero ou é um marcador exclusivo dessa espécie..

Assim como para a maioria dos peixes Characidae, não existe ainda uma filogenia proposta para o gênero *Triportheus*, seja ela baseada em dados moleculares ou morfológicos. Entretanto, considerando os resultados até então obtidos, pode-se constatar que os caracteres cromossômicos são particularmente importantes para a sistemática/taxonomia desse grupo. Por um lado, ocorre uma conservação cariotípica no gênero, considerando as características gerais do cariótipo e o número diplóide $2n=52$, a presença de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW compartilhado pelas diferentes espécies, mostrando um cromossomo Z conservado e a presença de cistrons de rDNA 18S no cromossomo W. De fato, o sistema ZZ/ZW e suas características cromossômicas mostram sinapomorfias presentes no gênero *Triportheus* entre os prováveis grupos de Characidae. Por outro lado, ocorrem também marcadores cromossômicos específicos, como as características morfológicas/estruturais do cromossomo W e dos cromossomos portadores dos sítios maiores de RONS, os quais podem ser de utilidade na identificação de diferentes espécies e populações desse grupo. Os dados cariotípicos apresentados por *T. nematurus* corroboram

ambos os casos, somando assim importantes informações quanto à evolução cromossômica desse grupo da ictiofauna Neotropical.

Agradecimentos

À Dra. Maria Claudia Malabarba, do Museu de Ciências e Tecnologia (PUCRS), pela identificação dos exemplares e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas, citadas no presente trabalho, encontram-se reunidas no final deste volume.

Tabela 1. Dados cromossômicos sobre o sistema de cromossomos sexuais em *Triportheus* (atualizados de Artoni *et al.*, 2001).

Espécies	Sistemas hidrográficos	2n	SCS	WRL	WS	Ref
<i>T. auritus</i>	Rios Negro e Solimões (AM, Brasil)	52	ZZ/ZW	75%	large	1
<i>T. cf. auritus</i>	Rio Araguaia (MT, Brasil)	52	ZZ/ZW	75%	large	2
<i>T. nematurus</i>	Rio Cuiabá (MT, Brasil)	52	ZZ/ZW	60%	medium	2
<i>T. nematurus</i>	Rio Paraguai (MS, Brasil)	52	ZZ/ZW	60%	medium	2
<i>T. nematurus</i>	Rio Paraná (Corrientes, Argentina)	52	ZZ/ZW	55%	medium	3
<i>T. cf. signatus</i>	Piscicultura de Promissão (SP, Brasil)	52	ZZ/ZW	55%	medium	1
<i>T. guentheri</i>	Rio São Francisco (MG, Brasil)	52	ZZ/ZW	50%	medium	2, 4
<i>T. venezuelensis</i>	Laguna de Castillero (Bolivar, Venezuela)	52	ZZ/ZW	50%	medium	5
<i>T. nematurus</i>	Rio Piracicaba (SP, Brasil)	52	ZZ/ZW	50%	medium	6
<i>T. angulatus</i>	Rios Negro e Solimões (AM, Brasil)	52	ZZ/ZW	45%	small	1
<i>T. albus</i>	Rios Negro e Solimões (AM, Brasil)	52	ZZ/ZW	35%	small	1
<i>T. culter</i>	Rio Solimões (AM, Brasil)	52	ZZ/ZW	-----	-----	1

SCS = sistema de cromossomos sexuais; WRL = comprimento relativo do cromossomo W; WS = tamanho estimado do cromossomo W; Ref = referências; 1 = Falcão (1988); 2 = Artoni *et al.* (2001); 3 = Sánchez & Jorge (1999); 4 = Bertollo & Cavallaro (1992); 5 = Nirchio *et al.* (2007); 6 = presente estudo.

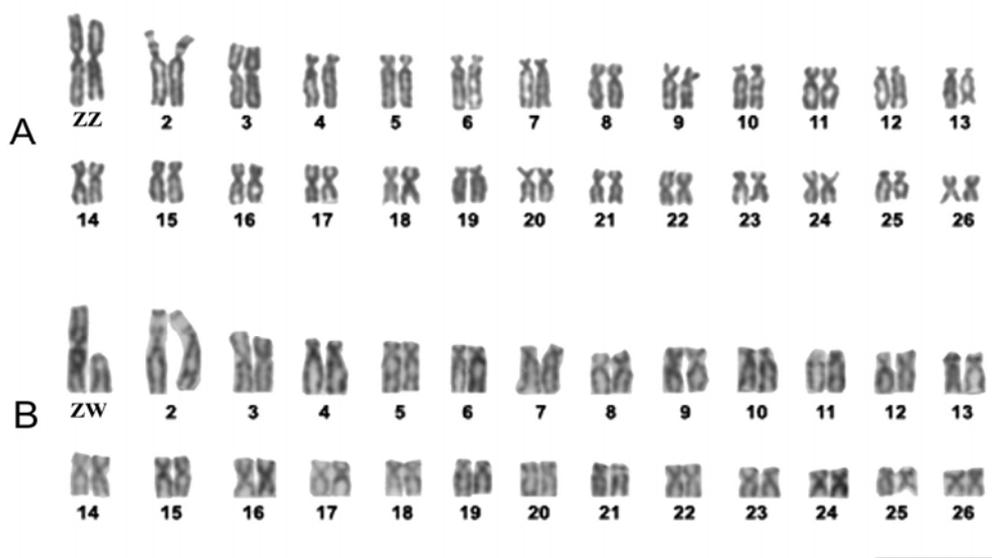


Figura 1: Cariótipo de *Triportheus nematurus*, macho (A) e fêmea (B), após coloração convencional com Giemsa, mostrando o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. O par cromossômico n° 2 apresenta uma conspícua constrição secundária no braço curto.

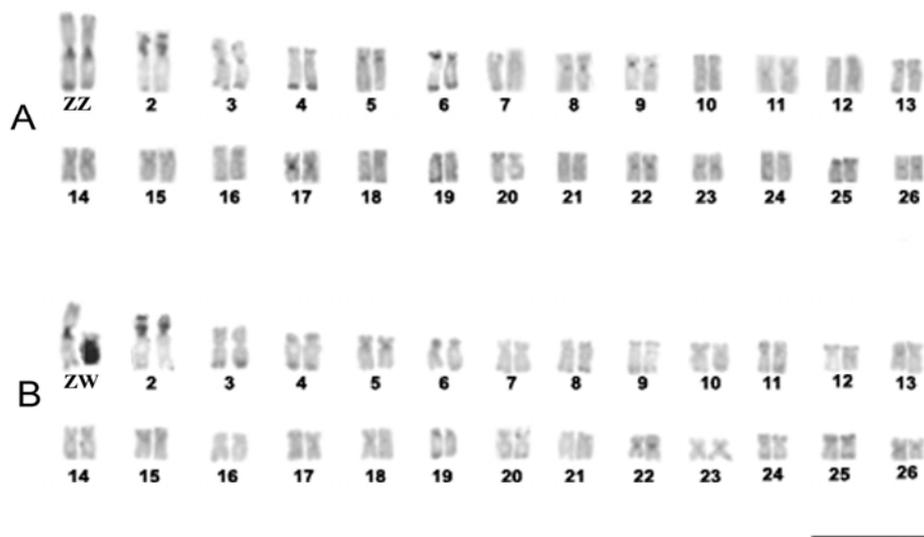


Figura 2: Cariótipo de *Triportheus nematurus*, macho (A) e fêmea (B), após bandamento C, mostrando a distribuição da heterocromatina nos cromossomos. O cromossomo W é quase totalmente heterocromático. O braço curto do par nº 2 apresenta regiões heterocromáticas acima e abaixo da constrição secundária.

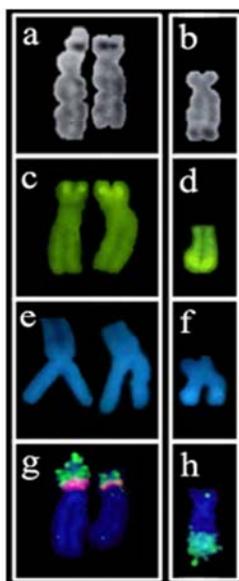


Figura 3: Par cromossômico n° 2 (a, c, e, g) e cromossomo W (b, d, f, h) de *Triportheus nematurus*, apresentando (a, b) Ag-RONs; (c, d) sítios CMA₃⁺; (e) sítios DAPI⁻ e (f) sítios DAPI⁺, no braço longo do cromossomo W, respectivamente; (g, h) sítios de rDNA 18S (em verde) e (g) sítios de rDNA 5S (em magenta). Observe a localização dos sítios 18S e 5S no braço curto do par n° 2.

**Capítulo II. Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em espécies
de *Triportheus* (Characiformes, Characidae)**

Débora Diniz, Alejandro Laudicina & Luiz Antonio Carlos Bertollo

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

² Laboratório de Citogenética Molecular, Centro Nacional de Energia Atômica, Buenos Aires, Argentina..

RESUMO

O mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S e de rDNA 5S foi realizado em oito espécies de *Triportheus* (Characiformes, Characidae), de diferentes bacias hidrográficas, portadoras de $2n=52$ cromossomos e de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. As hibridações com sondas de rDNA 18S evidenciaram a presença destes sítios no braço curto de um par de cromossomos característico para esse grupo. Em algumas espécies dois sítios adicionais foram também identificados em outros pares de cromossomos. Em seis espécies, onde exemplares fêmeas puderam ser analisados, observou-se a presença de um sítio de rDNA 18S na extremidade distal do braço longo do cromossomo W, corroborando a proposta de que esta deve ser uma característica compartilhada pela espécie de *Triportheus*. Em uma das populações de *T. angulatus* analisadas, foi detectada uma provável inversão pericêntrica no par organizador nucleolar principal, englobando a região da RON. O mapeamento físico dos sítios de rDNA 5S identificou dois sítios em todas as espécies, presentes no braço curto de apenas um par de cromossomos, proximamente ao centrômero. A única exceção ocorreu em *T. auritus*, onde 10 sítios desse gene foram evidenciados. Em duas populações de *T. nematurus*, onde análises de hibridações seqüenciais ou de “doublé” FISH puderam ser realizadas, foi constatada a ocorrência de sintenia dos sítios de rDNA 18S e 5S, os quais apresentam uma localização adjacente, no braço curto do par organizador nucleolar. Os dados obtidos evidenciam que em *Triportheus* ocorrem características compartilhadas por diferentes espécies, corroborando sinapomorfias características desse grupo, ao lado de outras características cromossômicas que podem ser marcadoras para algumas espécies.

Palavras chave: *Triportheus*, rDNA 18S, rDNA 5S, sintenia gênica

INTRODUÇÃO

O advento da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) possibilitou o mapeamento de seqüências específicas de DNA no genoma de várias espécies animais. A localização dos genes ribossomais (rDNAr 45S e rDNA 5S) tem sido um dos aspectos mais estudados entre os peixes, tanto na caracterização de espécies ou populações como no estudo de relações evolutivas.

As espécies de *Triportheus* já analisadas compartilham o mesmo número diplóide, $2n=52$ cromossomos, com uma macroestrutura cariotípica bastante similar, assim como um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo Z é o maior do complemento e o cromossomo W apresenta tamanhos distintos conforme a espécie, sendo sempre menos que o cromossomo Z. (Falcão, 1988), Bertollo & Cavallaro, 1992; Sánchez & Jorge, 1999; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002; (Nirchio *et al.*, 2007).

As Ag-NORs estão geralmente localizadas no braço curto de um par de cromossomos portadores de constrição secundária, que se evidencia como sendo o sítio organizador nucleolar principal. Este padrão tem sido encontrado em quase todas as espécies analisadas, embora algumas variações quanto ao número de Ag-RONs já tenham sido também constatadas (Falcão, 1988; Artoni & Bertollo, 2002). Em *T. nematurus*, *T. cf. auritus* e *T. guentheri* foi também detectado um sítio de rDNA 18S na extremidade distal do braço longo do cromossomo W (Artoni & Bertollo, 2002). Até o presente momento, não se tem dados disponíveis sobre o mapeamento dos sítios de rDNA 5S nos cromossomos de *Triportheus*.

O presente estudo teve como finalidade mapear os sítios de rDNAr 18S e de rDNA 5S em diferentes espécies desse gênero, com o intuito de obter subsídios para uma análise comparativa da distribuição desses sítios entre os

autossomos e cromossomos sexuais dessas espécies e uma melhor compreensão da evolução cariotípica do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas oito espécies/populações de *Triportheus*, provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil e da Argentina: *T. trifurcatus* (rio Araguaia - MT), *T. guentheri* (rio São Francisco - MG), *T. cf. signatus* (rio Piranha-açu, açude Itans - RN), *T. albus* (rio Negro - AM), *T. auritus* (rio Negro - AM), *T. angulatus* (rio Negro - AM), *T. nematurus* (rio Paraná – Corrientes, Argentina e rio Piracicaba - SP).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Foresti *et al.*, 1993), sendo que em *T. trifurcatus* e *T. auritus* apenas exemplares machos puderam ser analisados. As preparações cromossômicas foram submetidas à hibridação fluorescente *in situ* (FISH), conforme a metodologia geral descrita por Pinkel *et al.* (1986), utilizando-se sondas de rDNA 18S Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e de rDNA 5S (Martins & Galetti Jr., 1999). As sondas foram marcadas por “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Uma das sondas recebeu uma marcação indireta, usando-se Adenina biotilada (14 dATP–biotin - Invitrogen), com posterior detecção pela Avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-Avidina conjugada - Sigma), seguida por duas ampliações. Os cromossomos foram contracolorados com 8µl de iodeto de propídio (50 µg/ml) e 200µl de antifading (1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Fluka 78460), aplicando-se a alíquota de 25 µl por lâmina. A outra sonda recebeu uma marcação direta, empregando-se ChromaTide Alexa Flúor 546 (14 dUTP - Molecular Probes), e os cromossomos

foram contracolorados com DAPI (0,2µg/ml). Em *T. nematurus*, foi usada uma hibridação simultânea (“double FISH”) para identificação dos rDNAs 18S e 5S. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX50, sendo as imagens cromossômicas capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

RESULTADOS

Hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S

T. guentheri, *T. cf. signatus*, *T. albus* e *T. nematurus* evidenciaram sinais positivos de hibridação no braço curto de um par autossômico, assim como um sítio característico na extremidade do braço longo do cromossomo W nos exemplares fêmeas (Fig. 1b, c, d; Fig. 3a, c). *T. trifurcatus* e *T. auritus* evidenciaram sítios de rDNA 18S no braço curto de dois pares de autossomos (Fig. 1a, e). Em todos esses casos o único par de cromossomos marcados, ou pelo menos um deles como em *T. trifurcatus* e *T. auritus*, apresenta os sítios de rDNA 18S em posição correspondente às Ag-RONs, devendo corresponder ao cromossomo organizador nucleolar principal dessas espécies. *T. angulatus* evidenciou os sinais positivos de hibridação em cinco cromossomos do complemento cariotípico (Fig. 1f). Dois desses sítios estão localizados no braço curto de um par submeta/metacêntrico grande, evidenciando uma provável inversão paracêntrica em um dos homólogos (detalhe na Fig. 1f). Outros dois sítios estão no braço longo de um outro par meta/submetacêntrico, possivelmente homólogos, embora com tamanhos ligeiramente distintos, enquanto que o sítio restante encontra-se na região distal do braço longo do cromossomo W.

Hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 5S

T. trifurcatus, *T. guentheri*, *T. cf. signatus*, *T. albus* e *T. angulatus* evidenciaram apenas um par de cromossomos portadores de rDNA 5S e, embora nem sempre a morfologia cromossômica tenha se mostrado muito nítida nas preparações obtidas, esses sítios parecem estar sempre localizados no braço curto dos cromossomos, adjacentes ao centrômero (Fig. 2a, 2b, 2c, 2d, e 2f). *T. auritus* diferiu desse padrão apresentando 10 sítios ribossomais, mas com localização cromossômica similar à das demais espécies (Fig. 2e). Duas populações de *T. nematurus* mostraram sintonia dos genes ribossomais 18S e 5S, a partir de hibridações seqüenciais (Fig. 3a, b) ou pela metodologia de “double” FISH (Fig. 3c), onde esses sítios ocupam uma localização adjacente no braço curto do cromossomo portador da RON, próximos ao centrômero.

DISCUSSÃO

Triportheus tem se caracterizado como um grupo de peixes que apresenta um cariótipo conservado no que diz respeito ao número diplóide ($2n=52$ cromossomos), à macroestrutura do cariótipo e ao sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Contudo, essa conservação não é tão evidente quando as regiões organizadoras de nucléolos são consideradas, visto que elas podem apresentar uma relativa variação quanto ao número de sítios presentes nos cromossomos e quanto aos cromossomos portadores dos mesmos (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni & Bertollo, 2002). Neste contexto, *T. venezuelensis* é a espécie que mais se destaca das demais, apresentando um extenso polimorfismo em relação aos sítios de NORs, onde vários cromossomos mostram Ag-RONs e/ou sítios de rDNA 18S (Nirchio *et al.*, 2007).

No que se refere às espécies ora analisadas, as regiões organizadoras de nucléolos mostraram-se sempre presentes no braço curto de um par autossômico característico, embora a posição desse par possa ser variável no cariótipo. Além desse par, cromossomos portadores de sítios adicionais foram também identificados em *T. trifurcatus*, *T. auritus* e *T. angulatus*, enquanto que *T. guentheri*, *T. cf. signatus* e *T. albus* evidenciaram apenas um par de RONS. Em *T. guentheri*, Bertollo & Cavallaro (1992), identificaram também um segundo par autossômico com sítios de Ag-RONS, o que entretanto não foi corroborado pelo mapeamento do rDNA 18S nesta espécie (Artoni & Bertollo, 2002; presente estudo). Em *T. angulatus*, estudos anteriores já haviam descrito quatro sítios de Ag-RONS para esta espécie (Falcão, 1988), o que concorda com os dados do presente estudo com FISH. Além disso, uma provável inversão paracêntrica pode ser constatada em um dos pares de cromossomos, provavelmente o par organizador nucleolar principal, onde a RON situa-se no braço curto.

Outra característica interessante em *Triportheus* é a ocorrência de sítios de rDNA 18S na região distal do braço longo do cromossomo W, conforme já constatado em *T. guentheri*, *T. nematurus* (rio Cuiabá), *T. nematurus* (rio Paraguai) e *T. cf. auritus* (Artoni & Bertollo, 2002). De fato também ocorre na nova população de *T. nematurus* ora analisada, assim como em *T. cf. signatus*, *T. albus*, *T. angulatus* e na re-análise de *T. guentheri*. Apenas em *T. trifurcatus* e *T. auritus* não foi possível a confirmação dessa ocorrência, visto que os exemplares analisados eram machos. Em *T. guentheri*, Bertollo & Cavallaro (1992), relataram a ocorrência de Ag-NORs esporádicas na região telomérica do braço longo do cromossomo Z, o que não foi confirmado por FISH (Artoni & Bertollo, 2002; presente estudo). Coincidentemente, *T. venezuelensis* evidenciou sítios de rDNA

18S nessa região do cromossomo Z, embora não no cromossomo W conforme o esperado (Nirchio *et al.*, 2007). Tal fato, entretanto, pode ter um significado importante, visto que poderia estar evidenciando a possível ancestralidade dos sítios de rDNA 18S nos cromossomos sexuais de *Triportheus*, alocados em regiões correspondentes nos cromossomos Z e W desse grupo. Aparentemente, em algumas espécies o sítio do cromossomo Z poderia ter sido eliminado ao longo do processo evolutivo, enquanto que em outras ele estaria sendo mantido, embora nem sempre ativo. Neste último caso, sua não-detecção por FISH, como em *T. guentheri*, poderia estar associada a um reduzido número de cópias gênicas, mas podendo ser identificado após uma intensa transcrição ou amplificação gênica, conforme hipótese considerada por Nirchio *et al.* (2007) para explicar alguns dados obtidos em *T. venezuelensis*. Artoni & Bertollo (2002), já assinalaram para a hipótese de que os sítios de NORs no cromossomo W poderiam representar uma condição ancestral para *Triportheus*, compartilhada por diferentes espécies. Os dados obtidos no presente estudo corroboram de fato esta proposição, na medida em que várias outras espécies vieram se somar às anteriormente analisadas, evidenciando sítios de rDNA 18S sempre presentes em regiões correspondentes no cromossomo W. As evidências disponíveis favorecem de fato a proposta de que a presença de RONS nos cromossomos sexuais de *Triportheus* teria antecedido o processo de diferenciação destes cromossomos, assim como a especiação do grupo, constituindo um modelo único entre os peixes.

Os genes ribossomais 5S foram evidenciados no braço curto de um único par de cromossomos, próximos ao centrômero, em todas as espécies analisadas. A única espécie que diferiu desse padrão numérico foi *T. auritus*, a qual

apresentou um total de dez sítios distribuídos em diferentes pares de cromossomos. Relatos referentes à presença de muitos sítios de rDNA 5S no genoma de peixes é escasso. Na ordem Perciformes, Affonso & Galetti Jr. (2003) encontraram 18 sítios de rDNA 5S em *Centropyge aurantonotus*, uma espécie de peixe marinho. Estes autores sugerem que esse elevado número de sítios ribossomais pode ser atribuído à presença de pseudogenes no genoma da espécie. Independentemente disso, e considerando os dados até então disponíveis, a situação encontrada em *T. auritus* pode representar um marcador genético exclusivo para este taxon.

Os sítios de rDNA 18S e 5S geralmente estão situados em distintos cromossomos, o que tem sido a situação mais freqüente entre os peixes (Martins & Galetti, 1999; 2000; 2001). Os genes ribossomais constituem famílias multigênicas distintas, compostas por centenas a milhares de cópias repetidas em tandem, caracterizando um DNA altamente repetitivo. Segundo Dover (1986), mecanismos como conversão gênica e “crossing-over” desigual agem comumente no processo evolutivo nesses arranjos em tandem. A eficiência destes mecanismos pode ser aumentada, se estes se encontrarem em posições ou cromossomos distintos, evitando assim uma translocação indesejada das sequências do rDNA 5S no rDNA 45S, ou vice-versa. Assim sendo, a ocorrência sintênica e adjacente desses genes em *T. nematurus* é uma condição de destaque entre as espécies analisadas. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de que essa situação seja também compartilhada pelas demais espécies, considerando a localização do rDNA 18S e do rDNA 5S no braço curto de cromossomos semelhantes. Infelizmente, por ora, não houve possibilidade de análises de hibridação sequencial com as diferentes sondas de rDNA ou de

“double” FISH nas demais espécies. Sua confirmação viria novamente indicar uma outra sinapomorfia para este grupo entre os demais Characidae, à semelhança do que ocorre com as outras características associadas ao sistema ZZ/ZW e à localização das RONS no cromossomo W. Caso contrário, tal característica seria então um marcador cromossômico exclusivo de *T. nematurus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Maria Muhlmann-Diaz, do laboratório de Citogenética Molecular no Centro Nacional de Energia Atômica (Buenos Aires - Argentina), pela disponibilização das suas instalações para a execução de parte deste trabalho e aos pesquisadores Celeste Mutuko Nakayama, Wagner Franco Molina, Lilian Cristina Jorge, Paulo Cesar Venere e Issakar Lima Souza pelo auxílio quanto aos espécimes e/ou material analisado. Agradecem também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas, citadas no presente trabalho, encontram-se reunidas no final deste volume.

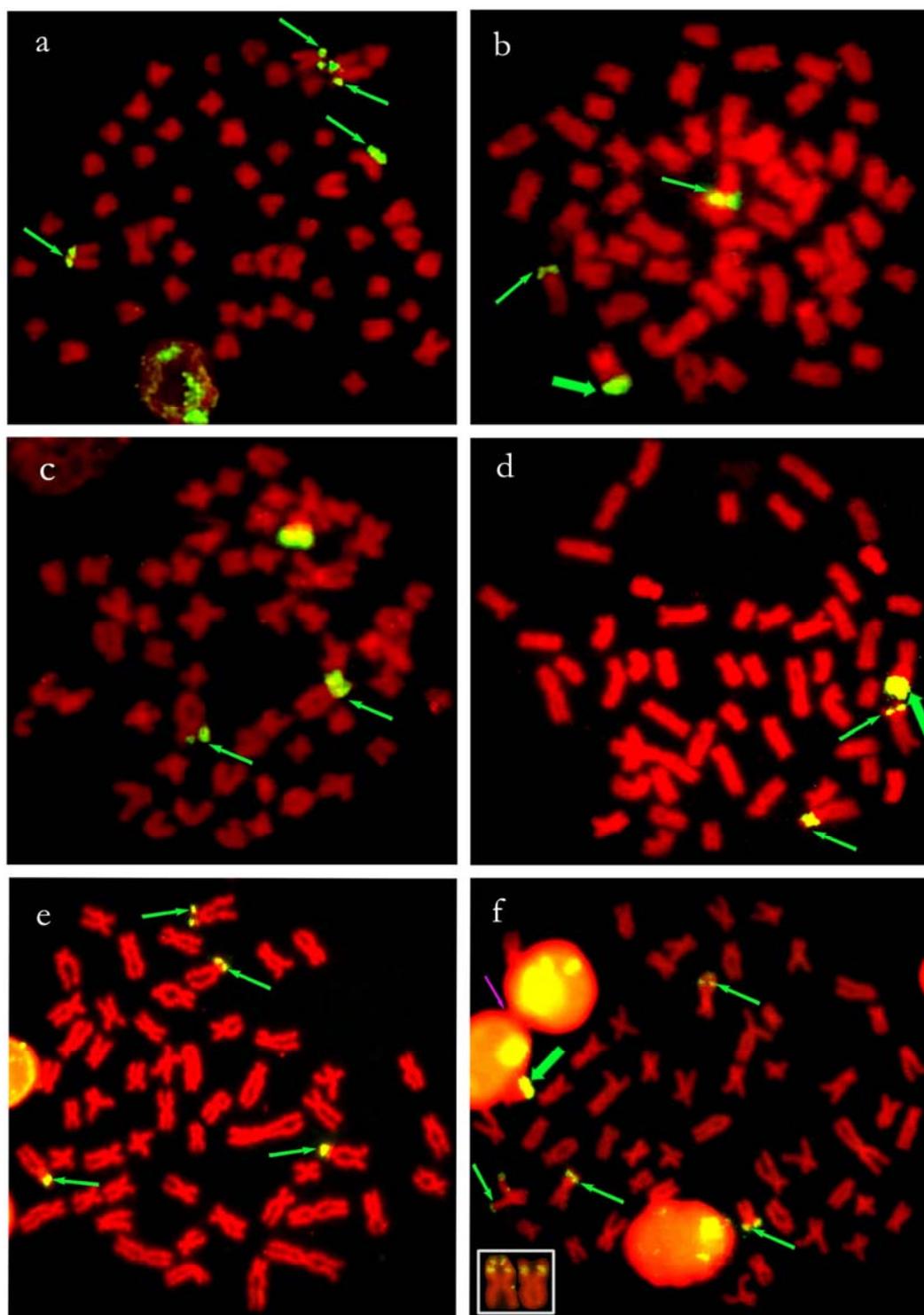


Figura 1: Mapeamento físico dos sítios de rDNA 18S (setas) em cromossomos metafásicos: a) *T. trifurcatus*; b) *T. guentheri*; c) *T. cf. signatus*; d) *T. albus*; e) *T. auritus*; f) *T. angulatus* (no quadro menor, destaque para o par portador de uma inversão paracêntrica), contracorados com iodeto de propídio. As setas mais grossas indicam a localização gênica no cromossomo W.

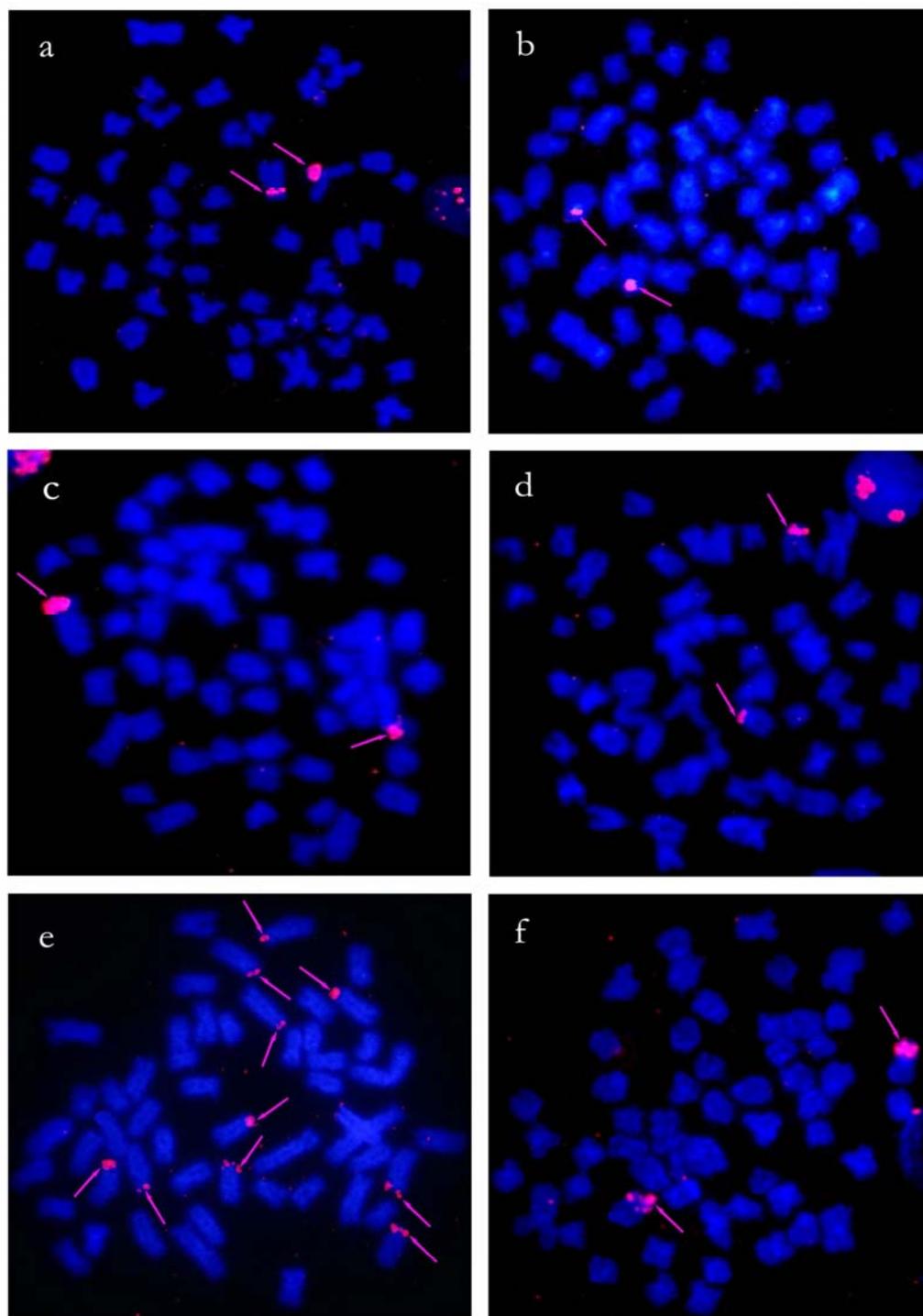


Figura 2: Mapeamento físico dos sítios de rDNA 5S (setas) nos cromossomos metafásicos: a) *T. trifurcatus*; b) *T. guentheri*; c) *T. cf. signatus*; d) *T. albus*; e) *T. auritus*; f) *T. angulatus*, contracolorados com DAPI.

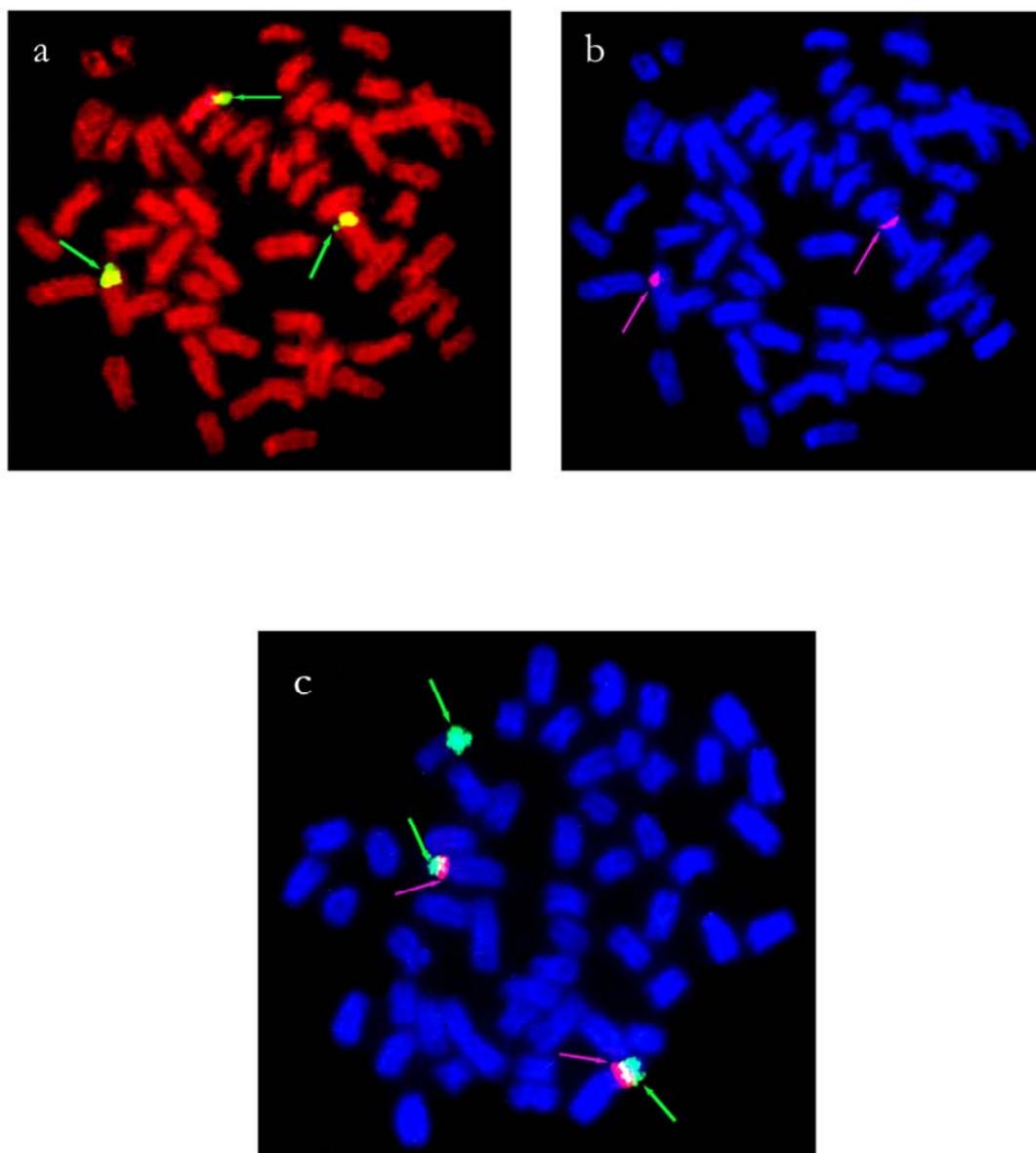


Figura 3: Mapeamento físico dos sítios sintênicos de rDNA 5S e rDNA 18S (setas), em *T. nematurus*. Em (a) e (b) estão sendo evidenciados os sítios 18S e 5S respectivamente, em análise sequencial. Em (c) estão sendo evidenciados os sítios 18S (verde) e 5S (magenta) em “doble” FISH. O terceiro sítio de rDNA 18S, mostrando em (a) e (c), corresponde ao cromossomo W. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (a) e DAPI (b,c).

Microdissecção cromossômica e pintura cromossômica total (WCP) em cromossomos sexuais de *Triportheus* (Characiformes, Characidae)

Débora Diniz¹, Alejandro Laudicina² & Luiz Antonio Carlos Bertollo¹

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

² Laboratório de Citogenética Molecular, Centro Nacional de Energia Atômica, Buenos Aires, Argentina..

RESUMO

As espécies de peixes do gênero *Triportheus* apresentam um número cromossômico diplóide $2n=52$, com uma macroestrutura cariotípica semelhante, e um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW que parece constituir uma sinapomorfia para esse grupo. No presente trabalho uma sonda específica do cromossomo Z, de *T. nematurus*, foi obtida por microdissecção, seguida de amplificação inespecífica por DOP-PCR. Essa sonda foi utilizada para pintura cromossômica total (WCP - Whole Chromosome Painting) por FISH, em várias espécies de *Triportheus*, assim como em espécies de outros gêneros de Characidae relativamente próximos de *Triportheus*, com o objetivo de analisar o processo evolutivo do sistema ZW no grupo. O cromossomo Z mostrou hibridação completa em todas as espécies de *Triportheus* analisadas, enquanto que o cromossomo W apresenta apenas uma marcação reduzida no braço curto, ou na região adjacente ao centrômero conforme a espécie. Os cromossomos das espécies de outros gêneros de Characidae não evidenciaram nenhuma hibridação detectável. Os resultados obtidos reforçam as hipóteses de que o sistema ZZ/ZW de *Triportheus* é uma sinapomorfia exclusiva desse grupo de Characidae e que o cromossomo Z apresenta-se conservado entre as diferentes espécies. É também evidenciado que a evolução do cromossomo W foi acompanhada por mudanças acentuadas não só na redução de tamanho, como também na composição do seu material genético, considerando sua diferenciação a partir de um provável par de homólogos ancestral. Assim, apenas uma pequena região homóloga ao cromossomo Z está hoje presente no cromossomo W das diferentes espécies,

ocupando uma posição preferencial no braço curto e na proximidade do centrômero.

Palavras chave. *Triportheus*, microdissecção cromossômica, cromossomos sexuais, pintura cromossômica

INTRODUÇÃO

O gênero *Triportheus*, pertencente à família Characidae, é representado por peixes de porte relativamente pequeno, com ampla distribuição na América do Sul. Análises citogenéticas realizadas em espécies de diferentes bacias hidrográficas demonstraram que todas apresentam número cromossômico diplóide $2n=52$, com uma macroestrutura cariotípica muito semelhante, além de compartilhar um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1990; Sánchez & Jorge 1999; Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo 2002; Nirchio *et al.*, 2007), que parece constituir uma sinapomorfia para esse grupo de caracídeos.

O desenvolvimento metodológico da Biologia Molecular nas últimas décadas possibilitou a amplificação de qualquer segmento de DNA através de DOP-PCR (DNA Degenenerate Oligonucleotide-Primed), trazendo grandes avanços na aplicação da citogenética molecular em muitos campos até então não explorados. A construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvida a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), tem sido amplamente utilizada em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, essa metodologia só mais recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes.

No presente trabalho uma sonda específica do cromossomo Z, de *T. nematurus*, foi obtida por microdissecção seguida de amplificação inespecífica por DOP-PCR. Essa sonda foi utilizada para pintura cromossômica total (WCP - Whole Chromosome Painting) por FISH, em várias espécies de *Triportheus*, assim como em espécies de outros gêneros de Characidae relativamente próximos de *Triportheus*, com o objetivo de analisar o processo evolutivo do sistema ZW no grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies analisadas e preparação cromossômica

Foram analisadas sete espécies/populações de *Triportheus*, provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil e da Argentina: *T. trifurcatus* (rio Araguaia – MT), *T. guentheri* (rio São Francisco - MG), *T. cf. signatus* (rio Piranha-açu, açude Itans - RN), *T. albus* (rio Negro - AM), *T. angulatus* (rio Negro - AM), *T. nematurus* (baixo rio Paraná – Corrientes, Argentina) e *T. nematurus* (rio Piracicaba - SP). Cinco espécies de outros gêneros da família Characidae foram também analisadas: *Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Salminus hilarii*. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim, conforme a metodologia descrita por Foresti *et al.* (1993).

Microdissecção cromossômica e amplificação por DOP-PCR

Preparações cromossômicas de *T. nematurus* (rio Piracicaba, SP) foram transferidas para em uma lamínula limpa, em coradas com Giemsa 5%. A microdissecção foi feita no cromossomo Z, o qual é facilmente identificado por corresponder ao maior cromossomo do cariótipo em todas as espécies desse gênero. Foram utilizados um microscópio invertido (Nikon) e um micromanipulador

manual (5171-Eppendorf) com uma agulha de vidro acoplada, previamente esterilizada. Foram microdissectados ao redor de 15-20 cromossomos Z, os quais foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 0,5 ml do mix para DOP-PCR, que consiste de 14,5 μ l de água destilada esterilizada, 2 μ l. de 10X Tampão de reação da Termosequenase, 4 μ l de dNTP (2,5 mM cada) e 2 μ l de 2 μ M primer DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3') (Telenius *et al*, 1992). O tubo com o mix foi aquecido para desnaturação inicial a 90°C, por 10 min. e centrifugado brevemente. Em seguida, adicionou-se 2,5 μ l de 4U/ μ l termosequenase (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit - USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient da Eppendorf. nas seguintes condições: 94°C – 3min, 12 ciclos a 94°C – 1min. e 30s; 37°C – 2min, 37°C – 1s (subindo 0,2°C/s até 72°C); 72°C – 2min seguido de mais 30 ciclos a 94°C – 1min e 30s; 62°C – 1min; 72°C – 1min e 30s. Após DOP-PCR, realizou-se uma PCR convencional. com uma reação de 33,5 μ l de água destilada esterilizada, 5 μ l de 10X Tampão para PCR, 4 μ l de MgCl₂, 2 μ l de dNTP (2,5 mM cada), 3 μ l de 100 μ M DOP primer e 0,5 μ l de 5U/ μ l de Taq polymerase e 2 μ l do produto DOP-PCR, nas seguintes condições: 90°C – 3min, 30 ciclos a 90°C – 1min e 30s; 56°C – 1min e 30s; 72°C – 1min e 30s. As sondas foram marcadas por PCR. A solução de reação consistiu de 31,5 μ l de água destilada esterilizada, 5 μ l de 10X Tampão para PCR, 4 μ l de MgCl₂, 3 μ l de dNTP (2,5 mM cada), 1 μ l de 1,25 mM dNTP marcado, 3 μ l de 100 μ M DOP primer, 3 μ l de produtos da segunda PCR e 0,5 μ l de 5U/ μ l Taq polymerase. Após cada PCR as amostras amplificadas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1% para a

verificação do tamanho dos fragmentos, os quais devem apresentar um tamanho entre 300 a 600 pb.

Hibridação Fluorescente *in situ* (Fish)

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) seguiu a metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986). Nos testes de hibridações com as espécies dos outros gêneros, foi realizado um teste controle para se verificar a eficácia da sonda e do procedimento de FISH. Assim, uma gota de suspensão celular de *T. nematurus* (controle positivo) foi adicionada sobre um campo distinto da mesma lâmina contendo o material das demais espécies a serem testadas. Em alguns casos, além da sonda do cromossomo Z, foi também utilizada, simultaneamente, uma sonda de rDNA 5S.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com os espécimes machos de *T. nematurus*, *T. angulatus*, *T. guentheri* e *T. trifurcatus*, mostra uma hibridação completa do cromossomo Z dessas espécies com a sonda obtida do cromossomo Z de *T. nematurus* (Fig. 1a, b, c, d). Nos casos onde fêmeas puderam ser analisadas, como em *T. albus*, *T. cf. signatus* e nas duas populações de *T. nematurus* foram observados resultados idênticos aos anteriores, ou seja, o cromossomo Z mostrou sinais de hibridação distribuídos ao longo de toda sua extensão. Particularmente para esses quatro últimos casos, onde o cromossomo W pode ser também analisado, constatou-se sítios reduzidos de hibridação nesse cromossomo, localizados preferencialmente no braço curto, exceto em *T. nematurus* da

Argentina, onde este sítio se localiza no braço longo do W, nas proximidades da região centromérica (Fig. 2a, b, c, d).

Os testes de hibridação da sonda Z nos demais gêneros de Characidae (*Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Salminus hilarii*) foram sempre negativos (Figs. 3).

DISCUSSÃO

Embora estudos cromossômicos já tenham sido realizados em várias espécies de *Triportheus*, esta foi a primeira tentativa de microdissecção cromossômica e a obtenção de sonda do cromossomo Z para pintura cromossômica total (WCP). Neste grupo, o cromossomo Z é facilmente identificado, correspondendo a um metacêntrico típico e o de maior tamanho no cariótipo. Seguramente, essas características foram importantes para o sucesso dos estudos realizados, visto que em muitas espécies de peixes a identificação de um dado cromossomo alvo é dificultada pela similaridade entre os cromossomos do cariótipo.

Em todas as espécies/populações de *Triportheus* o cromossomo Z (em machos ou nas fêmeas) apresentou fortes sinais de hibridação com a sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*. Assim sendo, a hipótese de que o cromossomo Z seja conservado em *Triportheus*, com base na sua morfologia e distribuição de heterocromatina nas regiões teloméricas e centromérica (Artoni *et al.*, 2001; Artoni & Bertollo, 2002), ganha um forte reforço com os dados ora obtidos, onde é destacada a acentuada homologia existente entre eles. A única exceção até agora conhecida é *T. venezuelensis*, onde o braço longo do cromossomo Z

mostra-se também heterocromático (Nirchio *et al.*, 2007), representando assim um caso de interesse para estudos posteriores com essa espécie.

Por sua vez, o cromossomo W mostrou um único sítio de hibridação com a sonda do cromossomo Z. Em *T. nematurus* do rio Piracicaba (SP), *T. albus* e *T. cf. signatus* este sítio situa-se no braço curto, enquanto que em *T. nematurus* da Argentina ele se localiza no braço longo, proximalmente ao centrômero. A diferenciação do cromossomo W em *Triportheus* se caracteriza por uma redução de tamanho em relação ao cromossomo Z, concomitantemente à sua heterocromatinização, a partir de um provável W ancestral homólogo ao cromossomo Z (Falcão, 1988; Artoni *et al.*, 2001). Entretanto, o cromossomo W das diferentes espécies pode mostrar-se distinto tanto em relação ao tamanho como à distribuição da heterocromatina, mas com segmentos eucromáticos constantes no braço curto (Fig. 4). O sítio de hibridação no cromossomo W das espécies analisadas situa-se em regiões eucromáticas, demonstrando serem essas as regiões que mantêm uma homologia com o cromossomo Z, embora bastante restrita. É interessante destacar que diferentes populações de *T. nematurus* evidenciam sítios eucromáticos específicos intersticiais no braço longo, na proximidade do centrômero além dos sítios eucromáticos no braço curto. (Fig. 4). O sítio de hibridação observado na população de *T. nematurus* da Argentina situa-se na região eucromática intersticial, e não no braço curto como nas demais espécies, evidenciando que o cromossomo W passou por prováveis rearranjos adicionais, envolvendo esse sítio.

Por outro lado, não se verificou hibridação entre a sonda do cromossomo Z de *Triportheus* com nenhum cromossomo das demais espécies de Characidae analisadas, ou seja, *Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax*

fasciatus, *Salminus hilarii*. Estas espécies mostram certo grau de relacionamento filogenético com *Triportheus* (Lucena, 1993; Orti & Meyer, 1997) (Fig. 5) e apresentam o primeiro par do cariótipo diferenciado dos demais, geralmente metacêntrico e o maior do complemento. A ausência de hibridação indica que a provável homeologia desse primeiro par entre diferentes espécies de Characidae (Daniel-Silva, 2001), não deve ser uma característica universal, uma vez que não é observada em relação à *Triportheus*.

Estudos realizados por Phillips *et al.* (2001), mostram que os cromossomos sexuais entre diferentes gêneros de Salmonidae parecem evoluir de forma independente. Neste caso duas sondas específicas, a sonda (Yp), obtida a partir do braço curto e a sonda (Yq), obtida a partir do braço longo do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*, foram hibridadas nos cromossomos de *Oncorhynchus mykiss* e *O. tshawytscha*. As sondas foram conjuntamente hibridadas nos cromossomos dessas espécies, evidenciando sinais de hibridação em dois diferentes pares de autossomos, em cada uma delas, evidenciando ausência de homologia entre os cromossomos sexuais no gênero *Salvelinus* e *Oncorhynchus*. Entre os peixes neotropicais, a diferenciação de cromossomos sexuais também parecer se apresentar como um evento independente entre diferentes grupos, visto que distintos tipos de sistemas de cromossomos sexuais podem ser encontrados dentro de uma mesma família e até mesmo em um mesmo gênero (Almeida-Toledo & Foresti, 2001). A ausência de hibridação da sonda Z de *Triportheus* nos cromossomos das espécies dos demais gêneros testados, além de evidenciar claramente esse evento, reforça também a proposta de que o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW deve ser, de fato, uma condição

sinapomórfica característica de *Triportheus* , pré-datando a especiação nesse grupo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Maria Muhlmann-Diaz pela disponibilização do laboratório de Citogenética Molecular, do Centro Nacional de Energia Atômica (Buenos Aires – Argentina), para a execução de parte deste trabalho e aos pesquisadores Wagner Franco Molina, Celeste Mutuko Nakayama, Paulo Cesar Venere, Issakar Lima Souza, Lilian Cristina Jorge, Marcelo Ricardo Vicari e Vladimir Pavan Margarido pelo auxílio quanto aos espécimes e/ou material analisado. Agradecem também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas no presente trabalho encontram-se reunidas no final deste volume, no item Referências Bibliográficas.

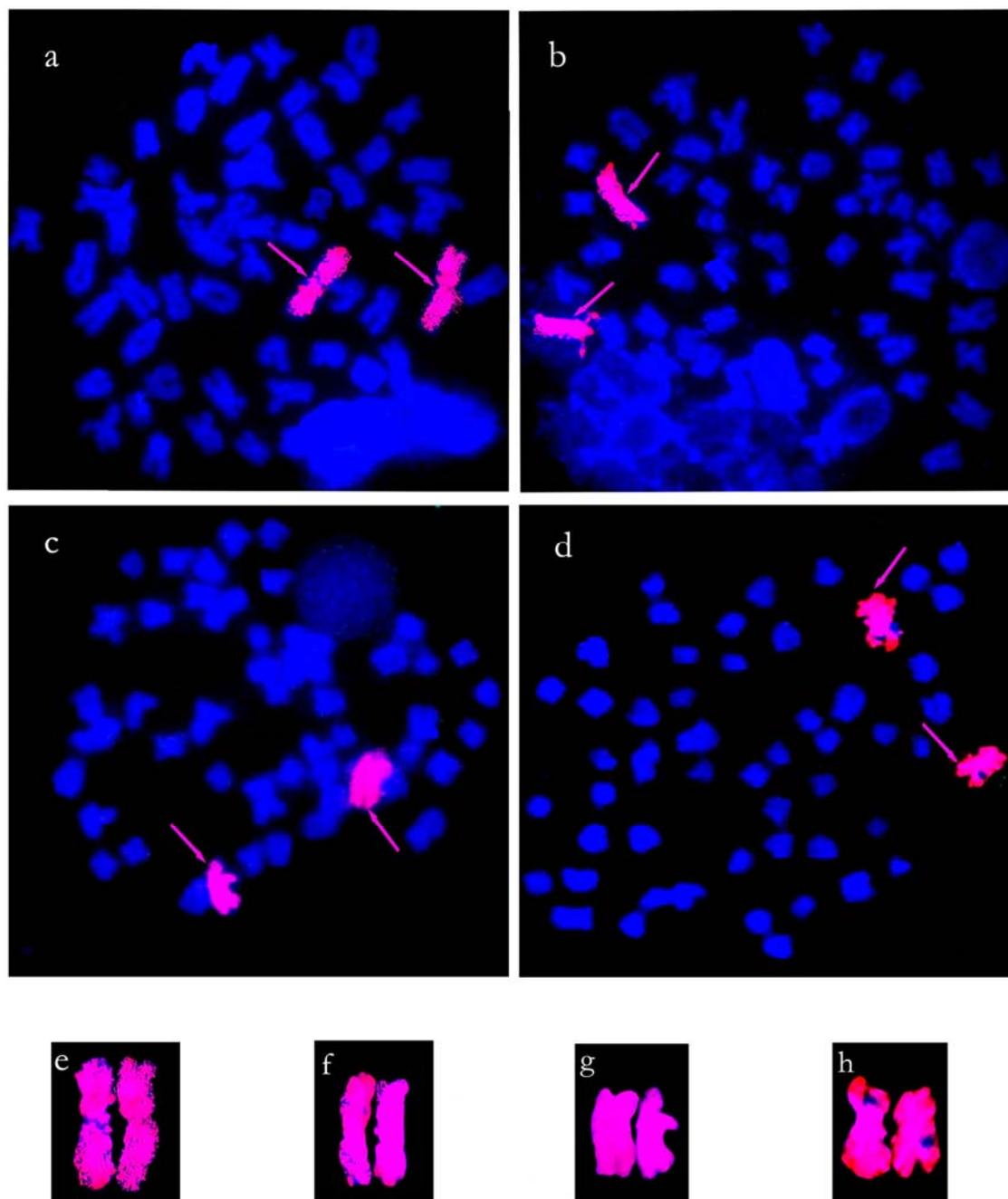


Figura 1: Pintura cromossômica total (WCP) dos cromossomos Z de machos de: *T. nematurus* do rio Piracicaba-SP (a,e); *T. angulatus* (b, f); *T. guentheri* (c, g) e *T. trifurcatus* (d, h), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*.

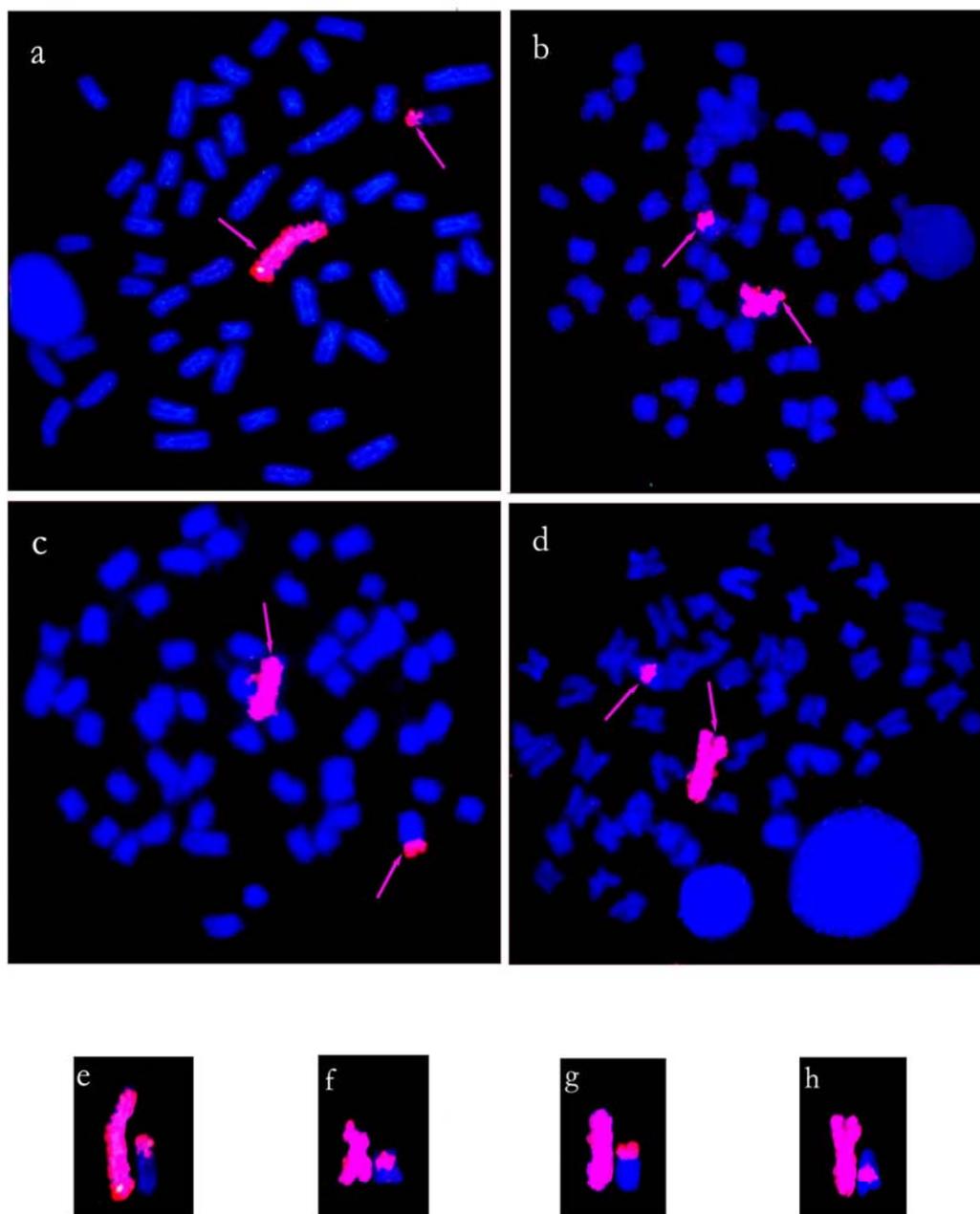


Figura 2: Pintura cromossômica total (WCP), dos cromossomos Z (cromossomos maiores) e W (cromossomos menores) de fêmeas de *T. nematurus* do rio Piracicaba-SP (a,e); *T. albus* (b,f); *T. cf. signatus* (c,g) e *T. nematurus* do rio Paraná -AR (d,h), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*.

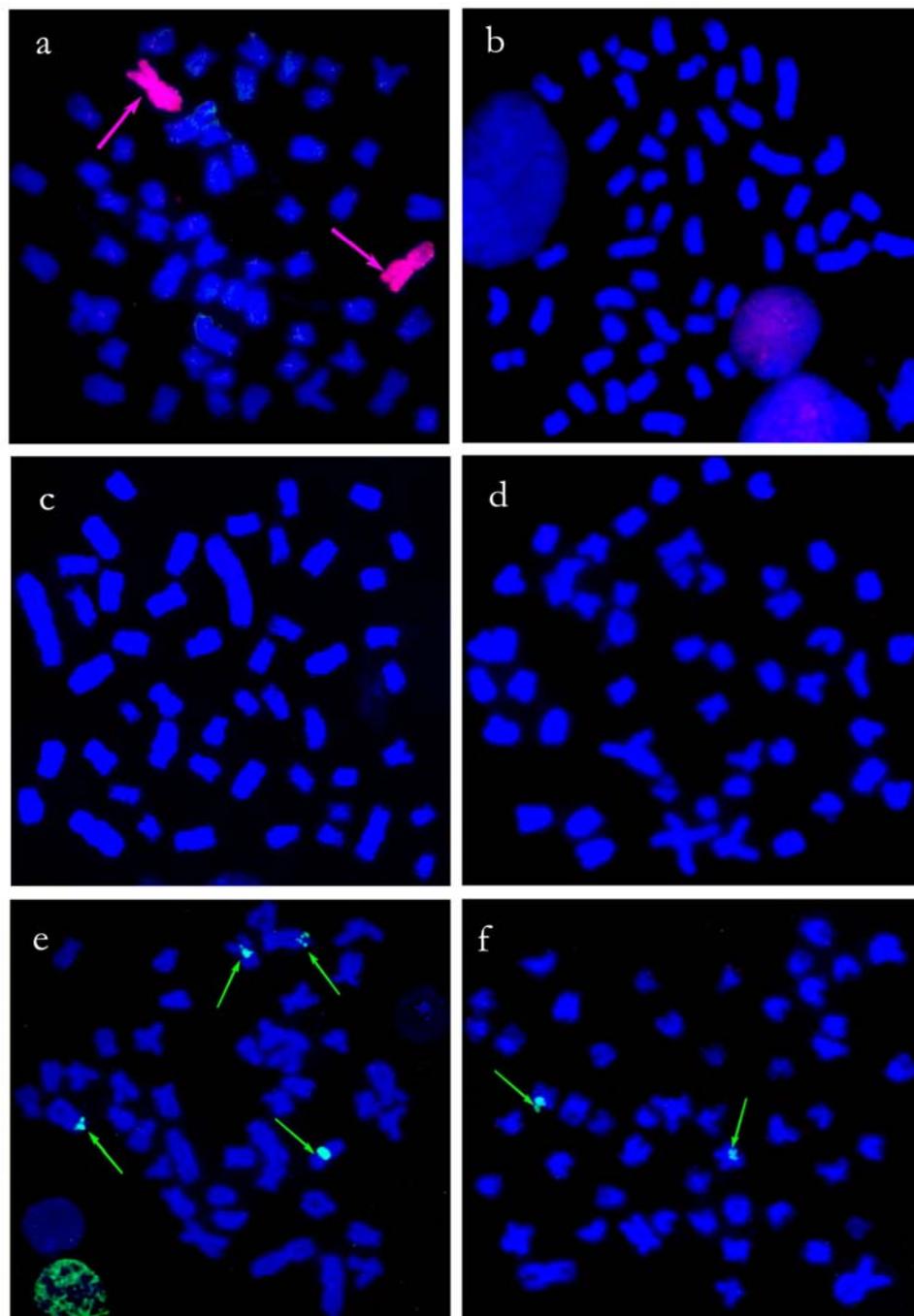


Figura 3: Pintura cromossômica total (WCP), com sonda do cromossomo Z de *T. nematurus*, em espécies de diferentes gêneros de Characidae. Controle positivo em macho de *T. nematurus* (setas magenta (a)). Cromossomos metafásicos de *Chalceus* sp (b); *Brycon* sp (c); *Astyanax scabripinnis* (d); *Astyanax fasciatus* (e); *Salminus hilarii* (f) evidenciando ausência de sinais de hibridação. Em alguns casos, os sinais verdes evidenciam sítios de rDNA 5S, como controle da eficácia da técnica de FISH.

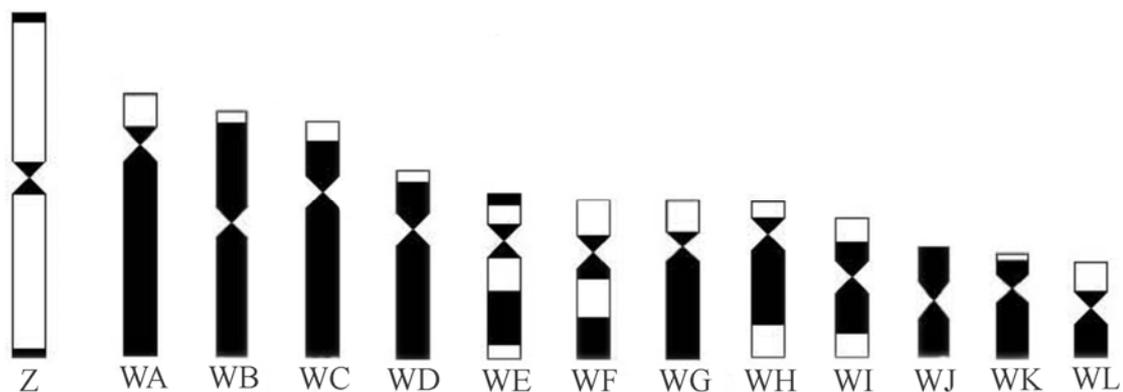


Figura 4. Esquema comparativo entre o cromossomo Z e o cromossomo W de distintas espécies de *Triportheus*, evidenciando a distribuição da euromatina (blocos brancos) e da heterocromatina (blocos escuros) nos cromossomos WA=*T. auritus* (rio Negro e rio Solimões); WB=*T. cf. signatus* (rio Piranha-açu); WC=*T. cf. auritus* (rio Araguaia); WD=*T. nematurus* (rio Paraguai); WE=*T. nematurus* (rio Piracicaba); WF=*T. nematurus* (rio Cuiabá); WG=*T. nematurus* (rio Paraná, Argentina); WH=*T. cf. signatus* (piscicultura de Promissão, SP); WI=*T. guentheri* (rio São Francisco); WJ=*T. angulatus* (rio Negro e rio Solimões); WL=*T. albus* (rio Negro e rio Solimões). Atualizado de Artoni *et al.* (2001).

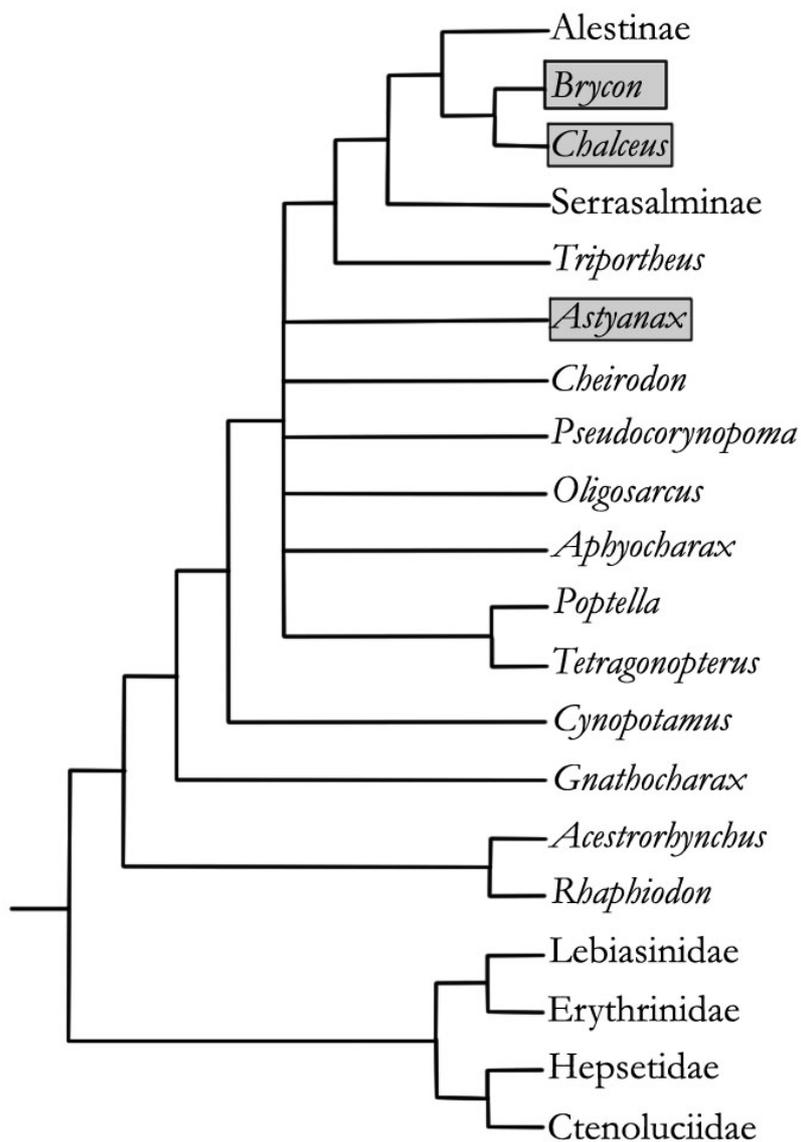


Figura 5. Relações filogenéticas apresentadas por *Triportheus* com outros gêneros da família Characidae (destaque), conforme Lucena (1993) e Orti & Meyer (1997).

4. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram estudos anteriores no gênero *Triportheus* (Falcão, 1988, Sánchez & Jorge, 1999, Artoni *et al.*, 2001, Artoni & Bertollo, 2002; Nirchio *et al.*, 2007), acrescentando novas informações relevantes para este grupo de peixe.

Os dados obtidos para uma nova população de *T. nematurus* (rio Piracicaba, SP) mostram que esta espécie segue o padrão apresentado pelo grupo no que se refere à presença de número diplóide com 52 cromossomos, presença de cromossomos sexuais hetermórficos ZZ/ZW e macroestrutura cariotípica. O cromossomo W, submetacêntrico, é também menor em relação ao Z, podendo ser considerado de tamanho médio comparativamente ao cromossomo W de outras espécies do grupo. O braço longo é totalmente heterocromático, reforçando as evidências de que um processo de heterocromatinização teve um papel importante na diferenciação do cromossomo W entre os *Triportheus*. Por sua vez, o cromossomo Z só evidencia bandas heterocromáticas teloméricas e centroméricas, mostrando que este padrão continua sendo mantido dentro do grupo.

A presença de Ag-RONs nos cromossomos sexuais em *Triportheus*, (Falcão, 1988; Artoni & Bertollo, 2002) foram confirmados através de sinais positivos de hibridação com sonda de rDNA 18S. Estes sinais localizaram-se no braço longo do cromossomo W de *T. nematurus* (duas populações), *T. cf. signatus* e *T. albus*, somando-se aos dados anteriormente obtidos por Artoni & Bertollo (2002) em *T. guentheri*, *T. nematurus* (rio Cuiabá), *T. nematurus* (rio Paraguai) e *T. cf. auritus* (rio Araguaia), fortalecendo assim a hipótese proposta

por esses autores de que as RONS no cromossomo W pode representar uma condição antiga para esse gênero, antecedendo o processo de diferenciação desse cromossomo, constituindo um modelo único entre os peixes neotropicais.

Além da confirmação da presença de sítios de rDNA 18S no cromossomo W, outros sítios foram também detectados nos autossomos. Assim, além de um par organizador nucleolar característico para o grupo, um segundo par de autossomos pode ser também identificado em *T. trifurcatus*, *T. auritus* e *T. angulatus*, esta última espécie apresentando uma possível inversão paracêntrica heterozigota, associada ao sítio das RONS.

A localização dos genes de rDNA 5S também mostrou particularidades interessantes, estando presente no braço curto de um único par de cromossomos, proximamente ao centrômero. A única exceção observada ocorreu em *T. auritus*, onde 10 sítios de rDNA 5S foram detectados. Por sua vez, as duas populações de *T. nematurus*, ou seja, do rio Piracicaba (SP) e do baixo Paraná (Corrientes, Argentina), evidenciaram uma localização sintênica adjacente dos genes ribossomais 18S e 5S. Por ora, essa ocorrência é conhecida apenas nesta espécie de *Triportheus*. Estudos posteriores poderão indicar se essa ocorrência estaria sendo também compartilhada dentro do gênero, a exemplo de outras características do cariótipo, ou se trata de um caráter marcador dessa espécie.

A microdissecção do cromossomo Z de *T. nematurus* e a obtenção de sonda para pintura cromossômica total (WCP), foram metodologias eficientes em *Triportheus*. Em todas as espécies testadas, o cromossomo Z apresentou-se totalmente hibridado com a sonda obtida de *T. nematurus*, mostrando assim a conservação presente neste cromossomo entre as diferentes espécies do gênero. A hibridação dessa sonda no cromossomo W indicou que apenas um pequeno

segmento desse cromossomo mantém homologia com o cromossomo Z, correspondendo a regiões eucromáticas presentes no braço curto desse cromossomo. Entretanto, na população de *T. nematurus* da Argentina esse sítio de homologia situa-se no braço longo, próximo ao centrômero, evidenciando uma provável inversão nessa população. Os dados obtidos confirmam que o cromossomo W passou por intensas modificações ao longo do seu processo evolutivo, não só quanto à redução de seu tamanho e heterocromatinização, mas também quanto à perda de homologia em relação ao Z.

A hibridação da sonda do cromossomo Z foi testada em espécies de outros gêneros de Characidae, proximamente relacionadas a *Triportheus*, a maioria delas compartilhando a presença de um cromossomo metacêntrico grande, correspondendo ao primeiro par do complemento. Não foi observado nenhum sinal de hibridação positiva em todas as espécies testadas, indicando que o sistema ZZ/ZW de *Triportheus* parece, de fato, ser uma condição sinapomófica característica deste grupo entre os Characidae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affonso, P. R. A. M. & Galetti Jr., P. M. 2005. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica* 123: 227-233.
- Almeida-Toledo, L. F. 1998. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. in: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M. & Lucena, C.A.S. (eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipurcs, pp. 583-588.
- Almeida-Toledo, L. F. & Foresti, F. 2001. Morphological differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111: 91-100.
- Alves, A. L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A. & Foresti, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a neotropical fish species. *Genetica* 128: 1-9.
- Andreatta, A. A.; Almeida-Toledo, L. F.; Oliveira, C. & Toledo-Filho, S. A. 1993. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterocromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63: 215-220.
- Andreatta, A. A.; Foresti, F. & Oliveira, C. 1999. Evidência da ocorrência de um sistema cromossômico de determinação sexual em *Microlepidogaster* sp. (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). In *Resumos do 45º Congresso Nacional de Genética*, p. 67, Gramado, RS.
- Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2002. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A

monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89: 15-19.

Artoni, R. F.; Falcão, J. N.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C., 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Research* 9: 449-456.

Artoni, R. F.; Venere, P. C. & Bertollo, L. A. C. 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421-425.

Bellafronte, E.; Margarido, V. P. & Moreira-Filho, O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genetics and Molecular Biology* 28: 710-716.

Bertollo, L. A. C. & Mestriner, C. A., 1998. The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome Research* 6: 141-147.

Bertollo, L. A. C.; Born, G. G.; Dergam, J. A.; Fenocchio, A. S. & Moreira-Filho, O. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and citotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613.

Bertollo, L. A. C. & Cavallaro, Z. I. 1992. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60: 60-63.

Bertollo, L. A. C.; Fontes, M. S.; Fenocchio, A. S. & Cano, J., 1997. The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research* 5: 493-499.

- Born, G. G. & Bertollo, L. A. C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8: 111-118.
- Britski, H. A. 1992. Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais. In: Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil. Documento do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Maringá, PR. 127p
- Britski, H. A.; Sato, Y. & Rosa, A. B. S. 1988. Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias. 3^a edição. CODEVASP, MG. 115p.
- Centofante, L.; Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. 2001. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54: 253-260.
- Centofante, L.; Bertollo, L. A. C.; Buckup, P. A. & Moreira-Filho, O. 2003. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidim* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138: 213-218.
- Centofante, L.; Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. 2002. ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55: 139-150.
- Christian, A.; Mcniel, E.; Robinson, J.; Drabek, R.; Larue, S.; Waldren, W. & Bedford, J. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 82: 172-179.
- Daniel-Silva, M. F. Z. 2001. Análises Citogenéticas Comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Diniz, D.; Moreira-Filho, O. & Bertollo L. A. C. Karyotype, physical mapping of 18S and 5S ribosomal genes and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica* (submitted).
- Diniz, D. & Xavier, P.M. 2006. .Easy Idio. (<http://geocities.yahoo.com.br/easyidio/>). cited 12 jan 2007.
- Dover, G. A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics* 2: 159-165
- Falcão, J. N. 1988. Caracterização Cariotípica em Peixes do Gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Feldberg, E.; Bertollo, L. A. C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O. & Santos, A. F. 1987. Biological aspects of amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* 20: 1-4
- Foresti, F.; Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49:810-813
- Foresti, F. 1987. Estudos Cromossômicos em Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi). Tese de Livre Docência. UNESP, Campus de Botucatu, SP.

- Galetti Jr., P. M. & Foresti, F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 43:43-46.
- Galetti Jr., P. M.; Lima, N. R. W. & Venere, P. C. 1995. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia* 60: 375-382.
- Haaf, T. & Schmid, M. 1984. An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* 89:37-41.
- Hatanaka, T. & Galetti Jr., P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244.
- Howel, W. M. & Black, D. A. 1979. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosome of the banded killifish *Fundulus diaphanus*. *Copeia* 1979: 544-546.
- Howel, W. M. & Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hsu, T. C.; Spirito, S. C. & Pardue, M. L. 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25-33.
- Jesus, C. M. & Moreira-Filho, O. 2003. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 56: 281-287.
- Kao, T. T. 1990. Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Research* 360: 89-104.

- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lima, F. C. T.; Malabarba, L. R.; Buckup, P. A.; Silva, J. F. P.; Vari, R. P.; Harold, H.; Benine, R.; Oyakawa, O.; Pavanelli, C. S.; Menezes, N. A.; Lucena, C. A. S.; Malabarba, M. C. S. L.; Lucena, Z.M. S.; Reis, R. E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V. A.; Moreira, C. & Lucinda, P. H. F. 2003. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, J. R. C. J. (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, 1st edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lucena, C. A. S. 1993. Estudo Filogenético da Família Characidae, com uma Discussão dos Grupos Naturais Propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Ortí, G. & Meyer, A. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematics Biology* 46: 75-100.
- Lundberg, J. G.; Kottelat, M.; Smith, G. R.; Stiassny, M. L. J. & Gill, A. C. 2000. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 26-62.
- Maistro, E. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 1998. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 201-206.

- Malabarba, M. C. S. 2004. Revision of the neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 2:167-204.
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S. & Moreira-Filho, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211-216.
- Martins, C. & Galetti jr., P. M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363-367.
- Martins, C. & Galetti jr., P. M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 8: 353-355.
- Martins, C. & 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.
- Meltzer, P. S., Guan, X. Y., Burgess, A. & Trent, J. M. 1992. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics* 1: 24-28.
- Miller, D. A.; Dev, V. G.; Tantravahi, R. & Miller, O. J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research* 101: 235-243.
- Molina, W.; Schmid, M. & Galetti Jr., P. M. 1998. Heterochromatin and sex chromosomes in the neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94: 141-149.

- Morán, P.; Martínez, J. P., García-Vásquez, E. & Pendás, A. M. 1996. Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics* 75: 145-150.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. & Galetti, Jr., P. M. 1993. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125.
- Mühlmann-Diaz, M. C.; Christian, A. T. & Bedford, J. S. 1995. Chromosome microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Würzburg, Germany.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New York. 600p.
- Nirchio, M. , Oliveira, C., Ferreira, I. A., Granado, A. & Ron, E. 2007. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 30: 25-30.
- Oliveira, R. R. 2006. Diversidade Cariotípica ente Dez Espécies do Gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica. Estrutura e Mecanismos de Evolução Cromossômica. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas.
- Pendás, A. M.; Morán, P.; Freire, J. P. & Garcia-Vazquez, E. 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* 67: 31-36.
- Phillips, R. B; Honkol, N. R.; Reed, K. M., & Stein, D. 2001. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosome in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 111: 119-123.

- Pieczarka, J. C.; Nagamachi, C. Y.; O'briem, P. C. M.; Yang, F.; Rens, W.; Barros, R. M. S.; Noronha, R. C. R.; Rissino, J. D.; Oliveira, E. H. C. & Fergusonsmith, M. A. 2005. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 13: 339-347.
- Pinkel, D.; Straume, T. & Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 2934-2938.
- Reed, K. M. & Phillips, R. B. 1997. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex-related. *Chromosome Research* 5: 221-227.
- Ribeiro, P. M. 1941. Nota para o estudo dos caracínídeos brasileiros (Pisces – gênero *Calcinus* Cuv e Val, 1849). *Papeis Avulsos do Departamento de Zoologia*,. São Paulo. I (18): 159-176.
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O. & Margarido, V. P. 2006. Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genetica* 128: 159-166.
- Sánchez S. & Jorge, L. C. 1999. A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus *Triportheus* (Pisces, Triportheinae). *Cytologia* 64: 395-400.
- Scavone, M. D. & Julio Jr., H. F. 1995. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish, *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae, Siluriformes). *Brazilian Journal of Genetics* 18: 31-35.

- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Speicher, R. M. & Carter, N. P. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature* 6: 782-792.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sumner, A.T., 1990. *Chromosome Banding*. Unwin Hyman Inc., London.
- Telenius, H.; Carter, N. P.; Bebb, C. E.; Nordenskjold, M.; Ponder, B. A. & Tunnacliffe, J. 1992. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerated primer. *Genomics* 8: 718-725.
- Venere, P. C. 1998. *Diversificação Cariotípica em Peixes do Médio Rio Araguaia, com Ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. & Bertollo, L. A. C. 2006. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetics and Genome Research* 114: 163–168.
- Vicente, V. E.; Bertollo, L. A. C.; Valentini, S. R. & Moreira-Filho, O. 2003. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119: 115-120.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York.