

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

Marcadores Cromossômicos em *Hoplias malabaricus*
(Characiformes, Erythrinidae). Citogenética
Comparativa entre Cariomorfos.

Marcelo de Bello Cioffi

SÃO CARLOS - SP

- 2010 -

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

**“Marcadores Cromossômicos em *Hoplias malabaricus*
(Characiformes, Erythrinidae). Citogenética Comparativa
entre Cariomorfos.”**

Marcelo de Bello Cioffi

Dissertação 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 Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo

Co-orientador: Prof. Dr. César Martins

SÃO CARLOS - SP

- 2010 -

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

C576mc

Cioffi, Marcelo de Bello.

Marcadores cromossômicos em *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética comparativa entre cariomorfos / Marcelo de Bello Cioffi. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
181 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Citogenética de peixes. 2. Evolução cariotípica. 3. DNA repetitivo. 4. Cromossomos sexuais. I. Título.

CDD: 597.087322 (20ª)

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

**“MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM *HOPLIAS
MALABARICUS* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).
CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE CARIOMORFOS”**

Dissertação de Mestrado de Marcelo de Bello Cioffi

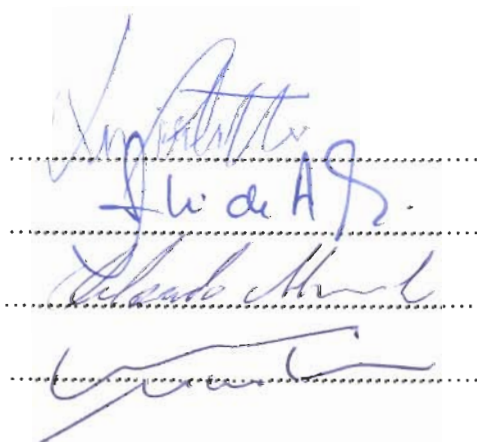
Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo

Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof. Dr. César Martins



Handwritten signatures of the exam board members, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in blue ink on a white background with horizontal dotted lines.

**Dedico este trabalho à
todas as pessoas que de
certa forma contribuíram
para sua realização.**

*"A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma."*

(John Ruskin)

"O que não se sabe é o mais importante na ciência"

(Philip Hanawalt)

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente todas as pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular gostaria de agradecer:

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPGGEv) pela infra-estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, meu orientador. Um professor e pesquisador de valor inestimável, extremamente ético e competente. Agradeço por todo apoio e pela confiança em mim depositada, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho e principalmente por ter se tornado um grande amigo. O senhor sabe o quanto o admiro e considero. Obrigado de verdade por fazer parte da minha vida!

Ao Prof. Dr. César Martins, meu co-orientador, pelo grande incentivo em mim depositado e pelas ótimas idéias durante a realização dos nossos trabalhos. Agradeço por ter aberto as portas de seu laboratório, e até mesmo de sua casa, permitindo que eu avançasse grandemente na parte experimental e teórica deste trabalho, principalmente pela oportunidade de tornarmos grande amigos. Obrigado “Pai”!.

Ao Prof. Orlando Moreira-Filho pelas várias conversas descontraídas e pelas sugestões em relação à minha vida profissional. Agradeço também pela sua presença tão atuante frente à diversas situações por nós enfrentadas aqui no laboratório e pelo grande carinho que sei que cultiva por mim. Saiba que o admiro muito como pesquisador e também como pessoa.

Aos Prof. Drs. Liano Centofante (UFMT), Jorge A, Dergam (UFV), Indrajit Nanda (Universität Würzburg), Marcelo Ricardo Vicari (UEPG) e Prof. Dra. Laureana Rebordinos (Universidad de Cádiz) pelas diversas contribuições que muito auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Percival e Vera Lúcia, ao meu irmão Leonardo, e aos meus avós Milton e Célia, que sempre estiveram presentes, com muito amor e dedicação, e que sempre lutaram para me propiciar uma educação de qualidade. À vocês, minha eterna gratidão.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos pela solidariedade e pela agradável e alegre convivência durante estes anos.

A todos os amigos também do Laboratório de Genômica Integrativa da UNESP- Botucatu, pela receptividade e auxílio nas várias oportunidades que estive em Botucatu. Além de contribuir diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, também pude fazer vários amigos durante minhas estadias em Botucatu.

Aos colegas de graduação e de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Carlos pelo companheirismo e apoio.

Aos técnicos do laboratório, Pedro Gallo e Luiz Henrique (Piau), por toda dedicação e esforço na obtenção das amostras de peixes, além da ótima convivência e de diversos momentos de descontração.

À todos os funcionários do Departamento de Genética e Evolução e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pelos mais diversos auxílios na realização deste trabalho.

Aos amigos da cidade de São Carlos e de Poços de Caldas pelos ótimos momentos de descontração e pela disposição em sempre colaborar de alguma maneira.

À minha namorada, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho.

À todas as “famílias” que me abraçaram durante esta estadia de mais de 6 anos na cidade de São Carlos. Famílias Stefane, Canevarolo, Bertollo, Lacerda e Godoy-Pereira. Muito obrigado por todo carinho e amizade!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido (Processo: 07/05565-5).

E em adição, gostaria de agradecer a todas as pessoas e amigos que, de alguma forma, auxiliaram em minha formação pessoal e social. Obrigado!

RESUMO

Hoplias malabaricus, um peixe eritrínídeo amplamente distribuído, é caracterizado por uma diversidade cariotípica, com sete cariomorfos já descritos. Este trabalho apresentou um estudo comparativo dos cariomorfos A, B, C e D, que foram previamente incluídos em um grupo cariotípico maior (Grupo I), com o intuito de avaliar as relações evolutivas entre eles. A investigação *in situ* de várias classes de DNAs repetitivos acrescentou novos caracteres informativos para estudos de genômica comparativa e forneceu novas informações sobre as relações evolutivas entre os cariomorfos. Além de corroborar a inclusão dos cariomorfos A-D em um grupo evolutivo próximo, os resultados forneceram evidências adicionais para uma maior proximidade entre os cariomorfos A-B e entre os cariomorfos C-D. Uma análise comparativa entre diferentes populações do cariomorfo A demonstraram uma contínua diferenciação genômica neste grupo, permitindo a detecção de eventos evolutivos recentes, sugerindo que este cariomorfo não pode ser considerado uma unidade evolutiva absoluta, conforme evidenciado pelas suas diferenciações cromossômicas particulares. Foi também expandido nosso conhecimento sobre a diferenciação dos cromossomos sexuais em *H. malabaricus*, permitindo concluir que os DNAs repetitivos desempenharam um papel importante no processo de diferenciação destes cromossomos. Foi detectado um críptico sistema XX/XY de cromossomos sexuais no cariomorfo C, que se mostrou claramente relacionado com a evolução do sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ de cromossomos sexuais do cariomorfo D. O mapeamento citogenético de cinco classes de DNAs repetitivos também indicaram a provável derivação dos cromossomos XX/XY do cariomorfo B à partir de cromossomos

autossômicos do cariomorfo A. Neste caso, os cromossomo X foram identificados como sítios preferidos para o acúmulo sequencias repetitivas, representando uma condição incomum do X acumulando mais DNAs repetitivos do que o cromossomo Y em peixes. De maneira geral, os resultados permitiram demonstrar que a fração repetitiva do genoma constitui bons marcadores evolutivos em *H. malabaricus*, aprimorando o entendimento dos mecanismos evolutivos que geraram a complexa estrutura genômica encontrada neste grupo de peixes.

ABSTRACT

Hoplias malabaricus, a widespread Erythrinidae fish, is characterized by a karyotypic diversity, with seven karyomorphs already described. This report presented a comparative study of the karyomorphs A, B, C and D, which were previously included in a major karyotypic group (Group I), in order to evaluate the evolutionary relationships among them. The *in situ* investigation of several classes of repetitive DNAs added new informative characters useful in comparative genomics and provided new insights into the evolutionary relationships among karyomorphs. In addition to corroborate the inclusion of karyomorphs A-D in a close evolutionary group, the results provide further evidence for a greater proximity between the karyomorphs A-B and karyomorphs C-D. A comparative analysis among distinct populations of karyomorph A demonstrated a continuing genomic differentiation in this group, allowing the detection of recent evolutionary events, suggesting that this karyomorph cannot be considered an absolute evolutionary unit, as evidenced by their inner chromosomal differentiation. It was also expanded our knowledge of the sex chromosomes differentiation in *H. malabaricus*, allowing to conclude that repetitive DNAs played an important role in the differentiation process. It was detected a cryptic differentiated XX/XY sex chromosome system in karyomorph C, which is clearly correlated with the evolution of the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system of karyomorph D. The cytogenetic mapping of five classes of repetitive DNAs also indicated the probable derivation of the XX/XY chromosomes of karyomorph B from autosomal chromosomes of karyomorph A.

In this case, the X chromosomes were seen as the preferred site for the accumulation of DNA repeats, which represents an unusual condition of X accumulating more repetitive DNAs than Y chromosome in fish. The overall results were able to demonstrate that the repetitive DNA fraction of the genome constitutes good evolutionary markers in *H. malabaricus*, allowing to improve the understanding of the evolutionary mechanisms that have generated the complex genomic structure found in this fish group.

LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 1 – Vista lateral de um espécime de *Hoplias malabaricus* pertencente ao cariomorfo A. Barra = 5 cm 49
- Figura 2 – Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta dos espécimes de *Hoplias malabaricus* utilizados no presente estudo. 1 = reservatório da UFSCar, ribeirão Monjolinho -São Carlos, SP (21° 58' 15" S - 47° 53' 16" O); 2 = rio do Pântano – Descalvado, SP (22° 05' 27" S - 47°45' 55" O); 3 = rio Bento Gomes - Poconé, MT (16° 40' 0" S - 57° 12' 0" O); 4 = rio Cuiabá - Sto. Antônio do Leverger, MT(15° 52' 18" S - 56° 04' 32" O) e 5= Parque Florestal do Rio Doce– lagoas: rio Doce, MG (20° 15' 48" S - 42° 54' 04"O) 50

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNA satélite 5SHindIII nos cromossomos (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 µm 75
- Figura 2 – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNAr 18S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 µm 76
- Figura 3 – Cromossomos metafásicos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D), apresentando análise seqüencial dos sítios de DNAr 18S e de Ag-RONs. Observar a correspondência geral entre o número e a localização dos cistrons de DNAr 18S e das Ag-NORs 77
- Figura 4 – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNAr 5S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 µm 78
- Figura 5 – Idiograma representativo dos cariomorfos A-D de *Hoplias malabaricus*, com base nas seqüências dos DNAs repetitivos analisados. A localização dos sítios de DNA satélite 5SHindIII, DNAr 18S e DNAr 5S nos cromossomos está indicada em azul escuro, verde e cinza, respectivamente. Em amarelo encontram-se indicados os cromossomos correspondentes dos cariomorfos A-B-C-D; em rosa os cromossomos correspondentes apenas pelos cariomorfos A-B e em laranja aqueles correspondentes apenas pelos cariomorfos C-D. Os cromossomos que são exclusivos dos cariomorfos A, B e C encontram-se indicados em azul claro, vermelho e preto, respectivamente. Os asteriscos indicam prováveis relações entre os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D, com alguns pares autossômicos dos cariomorfos A e C, respectivamente 79

Figura 6 – Pares cromossômicos portadores de sítios de DNAs repetitivos com correlações ou especificidades para os cariomorfos de <i>Hoplias malabaricus</i> . Os cromossomos entre chaves são identificados de acordo com suas posições nos cariótipos	81
---	-----------

CAPÍTULO II

Figura 1 – Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta dos espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> pertencentes ao cariomorfo A. 1 = rio do Pântano (população PR), Estado de São Paulo; 2 = bacia do rio Cuiabá (população CR), Estado do Mato Grosso; 3 = bacia do rio Doce (população DR), Estado de Minas Gerais	107
Figura 2 – Cariótipos das populações PR, CR, e DR de <i>Hoplias malabaricus</i> organizados a partir de coloração seqüencial dos cromossomos com Giemsa (esquerda) e Bandejamento C (direita). Barra = 5 µm	108
Figura 3 – Metáfases de <i>Hoplias malabaricus</i> das populações PR, CR e DR após a coloração com Cromomicina A ₃ . As setas indicam as bandas fluorescentes brilhantes que correspondem aos segmentos de DNA GC-ricos, localizados no par cromossômico nº 16. CR* se refere à população CR após dupla FISH, mostrando a localização sintênica dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e de DNAr 18S (verdes) no par cromossômico nº 16 (setas)	109
Figura 4 – Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> das populações PR, CR e DR apresentando os sítios de 5SHindIII-DNA e do DNAr 5S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Barra = 5 µm	110
Figura 5 – Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> das populações PR, CR e DR apresentando os sítios de DNAr 18S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio e as Ag-RONs seqüencialmente analisadas. Observar a correspondência geral entre o número e a localização dos cistrons de DNAr e das Ag-NORs. Barra = 5 µm	111
Figura 6 – Idiograma representativo dos marcadores cromossômicos observados nas populações PR, CR e DR de <i>Hoplias malabaricus</i> . Os sítios de 5SHindIII-DNA, DNAr 18S e DNAr 5S estão indicados em azul, verde e vermelho, respectivamente.....	112

CAPÍTULO III

Figura 1 – Cariótipos dos cariomorfos C e D (macho/fêmea) de <i>Hoplias malabaricus</i> organizados a partir de coloração seqüencial dos cromossomos com Giemsa (esquerda) e bandamento C (direita). No cariomorfo C, machos e fêmeas apresentam praticamente o mesmo padrão cariotípico geral. Os cromossomos X e Y do cariomorfo C (par No. 11) e os cromossomos X ₁ , X ₂ e neo-Y do cariomorfo D estão destacados. Note a conspícua banda heterocromática proximal nos braços longos dos cromossomos X, Y and X ₁ e no braço curto do cromossomo neo-Y. Barra = 5 µm	137
---	------------

- Figura 2 – Cromossomos metafásicos dos cariomorfos C e D de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização dos sítios DAPI-, CMA₃⁺, 5SHindIII-DNA e DNAr 18S nos cromossomos. As seqüências DAPI-, CMA₃⁺ e de DNAr 18S, ocorrem como sítios homomórficos e heteromórficos em fêmeas e machos, respectivamente, e evidenciam a correspondência entre os cromossomos X e Y (cariomorfo C) e X₁ e neo-Y (cariomorfo D). Sítios centroméricos de 5SHindIII-DNA estão sendo evidenciados nos cromossomos correspondentes nº 20 (cariomorfo C) e X₂ (cariomorfo D), bem como intersticialmente no braço longo do cromossomo neo-Y. As setas indicam o conspícuo bloco heterocromático proximal localizado nos cromossomos X, Y, X₁ e neo-Y evidenciados pela contra-coloração com o iodeto de propídio **138**
- Figura 3 – Cromossomos X e Y (cariomorfo C) e X₁ e neo-Y (cariomorfo D) evidenciando bandas C positivas, DAPI-, CMA₃⁺ e sítios de 5SHindIII-DNA e DNAr 18S. Os cromossomos X e Y mostram-se claramente relacionados aos cromossomos X₁ e neo-Y, respectivamente, considerando os sítios DAPI-, CMA₃⁺ e de DNAr 18S homomórficos e heteromórficos. A correspondência entre o sítio intersticial de 5SHindIII-DNA, localizado no braço longo do cromossomo neo-Y, e o sítio centromérico nos cromossomos X₂ e nº 20 do cariomorfo C, está sendo também evidenciada. Os cromossomos X, Y, X₁ e neo-Y são desprovidos de sítios centroméricos de 5SHindIII-DNA, mas evidenciam conspícuos blocos heterocromáticos proximais após a contra-coloração com o iodeto de propídio. (a) cromossomos metafásicos de machos do cariomorfo D evidenciando claros sinais teloméricos hibridizados em ambos os telômeros de todos os cromossomos; (b) detalhe dos cromossomos sexuais, destacando o sítio telomérico intersticial (ITS) exclusivo no braço longo do cromossomo neo-Y **140**
- Figura 4 – Cromossomos meióticos de machos pertencentes ao cariomorfo D de *Hoplias malabaricus* analisados com a sonda de DNAr 18S. (a) células espermatogoniais mostrando 2n=39 cromossomos e dez sítios de DNAr 18S; (b) metáfases em zigóteno/paquíteno e (c-d) diacinese/ metáfase I, exibindo cinco sítios de DNAr 18S nos cromossomos emparelhados; (e-f) células em metáfase II com 19 e 20 cromossomos, respectivamente, mostrando cinco sítios de DNAr 18S. As setas indicam o sítio ribossomal conspícuo presente no trivalente sexual; as cabeças de seta indicam os sítios heteromórficos de DNAr 18S associados com os cromossomos neo-Y e X₁ **141**
- Figura 5 – Idiograma representativo da evolução do sistema X₁X₂Y presente no cariomorfo D, a partir de um sistema XX/XY críptico encontrado no cariomorfo C, evidenciado pelo mapeamento de seqüências de DNAs repetitivos nos cromossomos. O destaque central ilustra a fusão em tandem Ypter/20pter que originou o cromossomo neo-Y. A seta curvada indica a orientação invertida do cromossomo Y **142**

CAPÍTULO IV

- Figura 1 – Cariótipos dos cariomorfos A e B de *Hoplias malabaricus*, analisados sequencialmente pela coloração Giemsa convencional (esquerda) e bandamento C (direita). Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B estão destacados. Note as conspícuas bandas heterocromáticas C positivas no braço longo do cromossomo X. Barra = 5 μ m 166
- Figura 2 – Metáfases de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização cromossômica dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) após dupla-FISH (A1, B1 e B3) e os sítios de 5SHindIII-DNA (A2, B2 e B4). A se refere aos machos e às fêmeas do cariomorfo A; B1 e B2 se referem às fêmeas e B3 e B4 se referem aos machos do cariomorfo B. As setas indicam o menor par submetacêntrico do cariótipo (nº 21) do cariomorfo A e as cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais do cariomorfo B 167
- Figura 3 – Metáfases de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização das sequências (TTAGGG)_n (A1, B1 and B3) e (GATA)_n (A2, B2 and B4) nos cromossomos. A se refere aos machos e às fêmeas do cariomorfo A; B1 e B2 se referem às fêmeas e B3 e B4 se referem aos machos do cariomorfo B. As setas indicam o menor par submetacêntrico do cariótipo (nº 21) do cariomorfo A e as cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais do cariomorfo B 168
- Figura 4 – Par cromossômico nº 21 do cariomorfo A, e os cromossomos X e Y do cariomorfo B, evidenciando as bandas C e os sítios de DNAr 18S, 5SHindIII-DNA e (GATA)_n. C mostra um idiograma representativo dos cromossomos X e Y indicando a diferenciação do braço longo do cromossomo X pelo acúmulo de heterocromatina e de seqüências de DNAr 18S, a partir de um par ancestral homomórfico semelhante ao par cromossômico No. 21 encontrado no cariomorfo A. Em azul está representado o satélite 5SHindIII-DNA, em vermelho as repetições (GATA)_n e em verde as seqüências repetitivas (heterocromatina e DNAr 18S) no cromossomo X. D e E mostram a hibridização da fração C_{0t}-1 DNA nos cromossomos de machos e fêmeas do cariomorfo B, respectivamente. As cabeças de seta evidenciam a acumulação de seqüências alta e moderadamente repetitivas nos cromossomos X. A seta indica o provável cromossomo Y 169

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 1 – Espécimes de *Hoplias malabaricus*, com os respectivos cariomorfos e o número de exemplares. SP = São Paulo, MT = Mato Grosso, e MG = Estado de Minas Gerais **48**

CAPÍTULO I

- Tabela 1 – Cariomorfos previamente identificados em *Hoplias malabaricus* de acordo com Bertollo et al. (2000) **73**
- Tabela 2 – Espécimes de *Hoplias malabaricus* com os respectivos locais de coletas, cariomorfos e o número de exemplares **74**

CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Locais de coleta de espécimes do cariomorfo A de *H. malabaricus* **106**

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1 - A Citogenética de Peixes Neotropicais. Situação Atual	01
1.2 - Estudos Citogenéticos na Família Erythrinidae	03
1.3 - DNAs Repetitivos: Uma Importante Ferramenta Para Estudos de Evolução Cromossômica	09
1.4 - Referências Bibliográficas	20
II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
III- MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 - Amostragem do material biológico.....	33
3.2 - Preparação de cromossomos mitóticos.....	33
3.3 - Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos	34
3.4 - Preparação de cromossomos meióticos	35
3.5 - Bandeamentos cromossômicos	35
3.5.1 - Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs).....	35
3.5.2 - Análise da Heterocromatina C - Positiva (Bandeamento C)	36
3.6 - Coloração por fluorocromos base - específicos	36
3.6.1 - DAPI (AT-específico) e Cromomicina A3 (GC - Específico)	36
3.7 - Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sondas de DNAr 5S, DNAr 18S, 5S <i>Hind</i> III-DNA, <i>Cot</i> -1 DNA, (TTAGGG) <i>n</i> e (GATA) <i>n</i>	37
3.7.1 - Preparação das Sondas	37
3.7.2 - Marcação das Sondas	43
3.7.3 - Preparação das Lâminas, Hibridização e Detecção do Sinal	43
3.8 - Localização seqüencial das RONs em material previamente submetido à FISH	44
3.9 - Análises Cariotípicas	45
3.10 - Referências Bibliográficas	45

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Capítulo I - Mapeamento cromossômico comparativo de seqüências repetitivas. Implicações quanto à evolução genômica no peixe, <i>Hoplias malabaricus</i>	52
4.2 Capítulo II - Variabilidade cromossômica entre populações alopátricas do peixe Eritrinídeo <i>Hoplias malabaricus</i>: mapeamento de três classes de DNAs repetitivos	82
4.3 Capítulo III - Diferenciação inicial de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em <i>Hoplias malabaricus</i>. Correlação com a origem do sistema X₁X₂Y neste grupo de peixes	113
4.4 Capítulo IV - Diferenciação de um sistema de cromossomos sexuais XY no peixe <i>Hoplias malabaricus</i> (Characiformes, Erythrinidae). Acúmulo incomum de seqüências repetitivas no cromossomo X.....	143
V - CONCLUSÕES GERAIS	171
BIOGRAFIA	176
ANEXOS	178

1- Introdução Geral

1.1 A Citogenética de Peixes Neotropicais. Situação Atual

Pouco ainda se conhece sobre a biologia dos peixes quando comparado com outros grupos de vertebrados, principalmente sobre a sua evolução, sistemática e biogeografia. Possivelmente, uma das principais razões para essa carência seja o elevado número de espécies, estimado em mais de 28.400 (Nelson, 2006), o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies de todos os demais vertebrados. Os peixes Neotropicais compõem a ictiofauna de água doce mais rica e diversificada do mundo, representada principalmente pelas ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (Lundberg et al., 2000). Sem dúvida, a grande diversidade de ambientes ecológicos existentes na América do Sul deve ter permitido uma grande irradiação evolutiva desse grupo de vertebrados.

Nas duas últimas décadas a citogenética vem contribuindo significativamente para o conhecimento da biodiversidade de nossa ictiofauna, fornecendo informações valiosas quanto à caracterização e evolução de vários grupos, incluindo não somente número e fórmula cromossômica, mas também a ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supernumerários, padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, número e localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), padrões de bandas de restrição, localização *in situ* de seqüências de DNA ribossômico e DNA satélite, entre outras. A utilização da citogenética molecular, com o desenvolvimento da hibridização fluorescente *in situ*, vem permitindo a

localização de diversas seqüências específicas de DNA nos cromossomos de várias espécies animais e vegetais, além dos sítios de DNAr 18S e 5S. Algumas dessas seqüências têm sido usadas como sondas específicas, para detectar rearranjos cromossômicos, cromossomos sexuais e caracterizar híbridos interespecíficos. Entre os peixes, importantes informações têm sido também obtidas com o emprego desta metodologia, no que se refere à caracterização da diversidade e evolução da ictiofauna (Almeida-Toledo, 1998; Bertollo et al., 2000; Artoni et al., 2001; Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2008).

Considerando o conjunto dos dados disponíveis, três situações gerais podem ser resumidas no tocante à ictiofauna Neotropical, ou seja: (1) uma diferenciação morfológica das espécies/populações, não refletida em nível cariotípico, como observado em *Hoplias* grupo *lacerdae* (Morelli et al., 2007), (2) uma diferenciação cariotípica de espécies/populações, geralmente não refletida em nível morfológico, como observado em *Hoplias* grupo *malabaricus* (Bertollo et al., 2000) e *Eigenmannia* (Almeida- Toledo et al., 1993), (3) uma diferenciação cariotípica e morfológica de espécies/populações, compartilhada de forma total ou parcial, como observado entre espécies de alguns grupos, a exemplo de *Astyanax* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991) e de *Parodon* (Jesus et al., 2003). Assim sendo, importantes subsídios têm sido fornecidos pela citogenética de peixes para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, assim como para a caracterização de prováveis grupos de espécies taxonomicamente mais problemáticas.

1.2 Estudos Citogenéticos na Família Erythrinidae

A família Erythrinidae, amplamente distribuída na região Neotropical, é relativamente pequena entre os Characiformes, compreendendo apenas três gêneros: *Hoplias* Gill, 1903; *Hoplerythrinus* Gill, 1895 e *Erythrinus* Scopoli, 1977, todos endêmicos às Américas do Sul e Central. Esta família é considerada como membro de um clado composto pelas famílias Lebiasinidae, a africana Hepsetidae e Ctenolucidae (Fink & Fink, 1981; Vari et al., 1995).

Hoplias malabaricus é o grupo que apresenta a distribuição geográfica mais ampla, aparentemente presente na maioria das bacias hidrográficas sul-americanas (Oyakawa, 2003). Apesar de ser uma família relativamente pequena, a identificação precisa das espécies desta família é bastante problemática. Oyakawa (2003) relata apenas duas espécies para o gênero *Erythrinus* (*E. erythrinus* e *E. kessleri*) e três para o gênero *Hoplerythrinus* (*H. unitaeniatus*, *H. cinereus* e *H. gronovii*) e cerca de nove espécies para o gênero *Hoplias*. Entretanto, *H. malabaricus* e *H. lacerdae* correspondem, na realidade, a um grupo de espécies (Oyakawa, 1990). Em uma recente revisão, baseada em dados merísticos e morfométricos, foram identificadas cinco espécies distintas pertencentes ao grupo *H. lacerdae*, ou seja, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. curupira*, estas duas últimas correspondendo a espécies novas (Oyakawa & Mattox, 2009). Entretanto, no que se refere ao grupo *H. malabaricus*, a problemática taxonômica permanece ainda a ser solucionada.

Espécies do grupo *H. lacerdae* têm evidenciado uma estrutura cariotípica mais conservada em relação ao número cromossômico diplóide ($2n=50$) e fórmula cariotípica, com todos os cromossomos do tipo meta-submetacêntricos,

sem a presença de cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados (Bertollo et al., 1978; Morelli et al., 2007). No entanto, como relatado acima, este grupo foi taxonomicamente caracterizado como sendo constituído por diversas espécies (Oyakawa & Mattox, 2009). Assim sendo, ao que tudo indica, o grupo *lacerdae* parece se enquadrar entre os casos conhecidos em que a especiação não foi acompanhada por mudanças acentuadas em nível cromossômico, o que representa uma exceção dente os Erythrinidae frente à diversidade cariotípica que tem sido evidenciado nesta família (Bertollo, 2007).

Embora usualmente referida como uma única entidade taxonômica, *H. malabaricus* possui uma grande diversidade cariotípica, apresentando diferenças populacionais significativas (Dergam & Bertollo, 1990; Bertollo et al., 1997a, 1997b, 2000; Born & Bertollo, 2000; Vicari et al., 2005). Apesar de uma ampla distribuição geográfica, este grupo apresenta uma baixa capacidade migratória, o que favorece a manutenção de rearranjos cromossômicos em pequenas populações e, conseqüentemente, um aumento na variabilidade cariotípica interpopulacional.

Bertollo et al. (2000) identificaram sete cariomorfos principais (A-G) para esta espécie, diferenciados pelos números diplóides, morfologia dos cromossomos e sistemas diferenciados de cromossomos sexuais.

O cariomorfo A é caracterizado pela presença de $2n = 42$ cromossomos meta-submetacêntricos em ambos os sexos, sem um aparente sistema de cromossomos sexuais. Apresenta uma ampla distribuição geográfica, desde a região norte a sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina.

O cariomorfo B também possui $2n = 42$ cromossomos, tanto em machos como em fêmeas, sendo a estrutura cariotípica geral semelhante à do cariomorfo A. Entretanto, pode ser diferenciado por um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, onde as fêmeas apresentam dois cromossomos X subtelocêntricos e os machos apenas um destes cromossomos, juntamente com um pequeno cromossomo submetacêntrico, o menor do complemento cariotípico, correspondendo ao cromossomo Y. Este cariomorfo tem uma distribuição geográfica restrita a um sistema lacustre na região de Vale do Rio Doce (Minas Gerais) e no primeiro “plateau” do rio Iguaçu (Paraná).

O cariomorfo C apresenta $2n = 40$ cromossomos meta- submetacêntricos, aparentemente homomórficos tanto nos machos como nas fêmeas. Também evidencia uma ampla distribuição, ocorrendo desde a região norte do Brasil até o nordeste da Argentina.

O cariomorfo D é caracterizado por $2n = 40$ e $2n = 39$ cromossomos nas fêmeas e nos machos, respectivamente, devido a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. (Bertollo et al., 1997b, 2000). Os bandeamentos C e G possibilitaram demonstrar que o cromossomo Y, um dos maiores do complemento cariotípico, originou-se a partir de um rearranjo estrutural entre dois cromossomos de dois braços. De fato, o braço longo deste cromossomo é resultante da fusão entre um cromossomo semelhante ao atual X_2 e o braço curto de um cromossomo semelhante ao atual X_1 ; conseqüentemente, o braço curto do cromossomo Y apresenta correspondência com o braço longo do cromossomo X_1 (Bertollo et al., 1997b). Como conseqüência deste processo, o macho do cariomorfo D passou a apresentar $2n=39$ cromossomos e três

cromossomos sexuais (X_1 , X_2 e Y), enquanto que a fêmea permaneceu com o número diplóide ancestral, ou seja, $2n=40$ cromossomos, dos quais dois correspondem ao cromossomo X_1 e dois ao cromossomo X_2 ($X_1X_1X_2X_2$). Análises meióticas convencionais e de complexos sinaptonêmicos mostraram que esse sistema deve se encontrar estabilizado na espécie, originando dois tipos de gametas equilibrados e que o trivalente meiótico, formado pelos cromossomos X_1 , X_2 e Y , passa por um ajuste sináptico durante a gametogênese masculina (Bertollo & Mestriner, 1998). A distribuição deste cariomorfo concentra-se na bacia do Alto Paraná.

O cariomorfo E possui $2n=42$ cromossomos, assim como os cariomorfos A e B. Entretanto, diferencia-se destes últimos pelo tamanho relativamente maior do primeiro par de cromossomos, assim como pela presença de um par de cromossomos acrocêntricos (par 6), o que representa uma característica rara no grupo *H. malabaricus*. Até o momento, este cariomorfo foi encontrado em apenas uma localidade na região norte do Brasil (rio Trombetas, PA).

O cariomorfo F possui $2n=40$ cromossomos nos machos e nas fêmeas, sem um sistema de cromossomos sexuais diferenciados. Diferencia-se do cariomorfo C pela presença de um par metacêntrico grande, o maior em tamanho em *H. malabaricus*, enquanto que o segundo par cromossômico corresponde ao primeiro par encontrado no cariomorfo E. Apresenta uma distribuição preferencial na região leste do Brasil, estendendo-se desde Minas Gerais até o Suriname.

O cariomorfo G possui uma estrutura cariotípica similar a apresentada pelo cariomorfo F, diferenciando-se pela presença de $2n=40$ cromossomos nas fêmeas

e $2n=41$ cromossomos nos machos, devido a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 . Sua distribuição geográfica mostra-se restrita a algumas localidades da região Amazônica.

A diversidade cariotípica em *H. malabaricus* indica a provável ocorrência de distintas espécies englobadas em uma denominação específica comum, o que é reforçado pela ocorrência de simpatria entre alguns cariomorfos, sem evidências de fluxo gênico entre eles (Bertollo et al., 2000). Especificamente para os cariomorfos A e C e para os cariomorfos A e D, os resultados obtidos com marcadores genômicos de RAPD-PCR também foram congruentes com ausência de fluxo gênico, promovendo evidências adicionais para os cariomorfos como unidades evolutivas distintas (Dergam et al., 1998).

Considerando a morfologia cariotípica geral, Bertollo et al., (2000) reconheceram dois grupos cromossômicos maiores em *H. malabaricus*, um deles constituído pelos cariomorfos A, B, C, D (Grupo I) e o outro pelos cariomorfos E, F, G (Grupo II). De fato, os cariomorfos A e B apresentam uma estreita similaridade cariotípica com os cariomorfos C e D, apesar das diferenças existentes quanto aos números diplóides. Assim sendo, estas quatro formas cariotípicas aparentam possuir uma estreita relação evolutiva. O cariomorfo B ($2n=42$), com um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY , provavelmente representa uma forma derivada do cariomorfo A ($2n=42$). Por sua vez, o cariomorfo D ($2n = 40$ nas fêmeas/ $2n = 39$ nos machos), com um sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, aparenta ser derivado de um cariótipo similar ao cariomorfo C ($2n = 40$). Considerações similares também são válidas quanto aos cariomorfos do Grupo II, onde é

possível propor uma derivação dos cariomorfos F e G a partir do cariomorfo E (Bertollo et al., 2000).

Estudos citogenéticos no gênero *Hoplerythrinus* foram inicialmente realizados por Giuliano-Caetano (1986), em uma análise comparativa entre populações de *H. unitaeniatus* pertencentes a diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Neste estudo foi constatado que diferenças cariotípicas intra- e interpopulacionais também ocorrem nesse grupo. Na população do Rio Negro (Manaus, AM), foi verificada a presença de quatro cariomorfos distintos, provavelmente associados a fusões e inversões cromossômicas. A somatória desses dados, com os obtidos em diversas outras populações, foram compilados mostrando uma diversidade cromossômica tanto numérica como estrutural, com números diplóides variando de $2n=48$ a $2n=52$, associados à números também variáveis de cromossomos acrocêntricos (Giuliano-Caetano et al., 2001; Diniz & Bertollo, 2003). Entretanto, até o presente momento, nenhum heteromorfismo sexual foi detectado nesse gênero. Levando-se em conta os dados citogenéticos disponíveis, *H. unitaeniatus* pode também corresponder a um grupo com espécies distintas, requerendo uma análise taxonômica pormenorizada.

Erythrinus é o gênero citogeneticamente menos conhecido da família Erythrinidae. Dados reunidos em um único estudo também evidenciaram a ocorrência de variações cariotípicas interpopulacionais em *E. erythrinus*, onde quatro cariomorfos (A-D) puderam ser claramente identificados (Bertollo et al., 2004). O cariomorfo A, representado pelas populações de Birigui (SP), Penápolis (SP) e Resistência (AR), caracteriza-se por $2n=54$ cromossomos, sendo $6M + 2ST + 46A$. Os cariomorfos B, C e D se diferenciam do cariomorfo A pela presença de

um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. O cariomorfo B, representado pela população de Guaíra (PR), apresenta $2n=54$ cromossomos nas fêmeas ($6M + 2ST + 46A$) e $2n=53$ cromossomos nos machos ($7M + 2ST + 44A$). Os cariomorfos C e D apresentam $2n=52/51$ cromossomos nas fêmeas e machos, respectivamente, diferindo quanto ao número de cromossomos metacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Assim, o cariomorfo C, representado pela população de Manaus (AM), apresenta uma estrutura cariotípica formada por $6M + 2SM + 6ST + 38A$ nas fêmeas e $7M + 2SM + 6ST + 36A$ nos machos. Por sua vez, o cariomorfo D, representado pela população de Natal (RN), apresenta o cariótipo composto por $4M + 2SM + 2ST + 44A$ nas fêmeas e $5M + 2SM + 2ST + 42A$ nos machos. A grande variabilidade cromossômica encontrada em *E. erythrinus*, com rearranjos cromossômicos já fixados entre diferentes populações isoladas, além da ocorrência/ausência de cromossomos sexuais diferenciados entre as populações, é também indicativa da ocorrência de um grupo de espécies distintas nessa espécie nominal.

1.3 DNAs Repetitivos: Uma Importante Ferramenta Para Estudos de Evolução Cromossômica.

Uma característica interessante do genoma de eucariotos é a presença de grande quantidade de seqüências de DNA repetitivo, as quais incluem os DNAs satélites, arrançados em tandem, seqüências de minissatélites e microssatélites, além de elementos repetitivos dispersos como os transposons e retrotransposons (Charlesworth et al., 1994). Estudos dessas frações repetitivas do genoma podem

contribuir para o conhecimento da organização do DNA no núcleo celular, além de serem ótimos marcadores cromossômicos em estudos evolutivos, identificação de um tipo particular de cromossomo, de rearranjos cromossômicos e de cromossomos sexuais.

Embora DNAs repetitivos tenham sido muito estudados em invertebrados e mamíferos, em peixes as informações disponíveis são ainda restritas, considerando o grande número de espécies existentes. Entretanto, o advento da hibridização “in situ” fluorescente (FISH), permitindo que seqüências específicas de DNA possam ser localizadas em cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos, tem propiciado o mapeamento físico de algumas dessas seqüências também entre os peixes, trazendo importantes informações para a caracterização da diversidade e evolução da nossa ictiofauna.

As seqüências de DNAs satélites podem variar de 1.000 até 10.000 cópias de unidades repetidas, cada uma delas comumente apresentando 100-300 pares de bases. Estas seqüências estão organizadas em grandes clusters localizados majoritariamente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, sendo o principal componente das heterocromatinas. Os centrômeros, que representam a contração primária de cada cromossomo metafásico dos eucariotos, são fundamentais para a segregação correta dos cromossomos durante a divisão celular. Por sua vez, os telômeros desempenham um papel crítico na manutenção da estabilidade cromossômica, além de estarem envolvidos no processo de replicação do cromossomo. Assim, as seqüências de DNAs repetitivos localizadas nessas estruturas podem desempenhar um papel importante no genoma dos eucariotos. De fato, a organização molecular,

localização cromossômica e possíveis funções dos DNAs satélites vêm sendo estudadas em diversos grupos de animais (Singer, 1982; Clabby et al., 1996; Badaeva et al., 2007), indicando que tais seqüências desempenham um importante papel tanto em nível nuclear como cromossômico (Singer, 1982; Haaf & Schmid, 1991; Grewal & Jia, 2007).

Famílias de DNA satélites podem corresponder de 0-66% do genoma de certas espécies de mamíferos e sua composição e número pode variar grandemente entre as espécies (Beridze, 1986; Jurka et al., 2005). Diferentes espécies geralmente apresentam famílias de DNAs satélites divergentes, como resultado de mecanismos de evolução em concerto (Arnheim, 1983; Topp & Dave, 2006).

A distribuição cromossômica da heterocromatina tem sido extensivamente estudada em peixes por métodos citológicos, como o bandeamento C. Entretanto, dados moleculares sobre os DNAs satélites, presentes na heterocromatina, são restritos à poucas espécies. A primeira descrição de uma família de DNA satélites em peixes data do final dos anos 80 (Datta et al., 1988; Moyer et al., 1988). A partir daí, alguns estudos vêm se sucedendo, com importantes contribuições sobre a origem e evolução dessas seqüências repetitivas no genoma dos peixes. Wright (1989) identificou e caracterizou um fragmento *HaeIII*, de 237 pares de bases, no genoma da tilápia *Oreochromis mossambicus*, que se apresentou organizado em tandem. A análise desta seqüência revelou um alto grau de conservação na unidade monomérica e apresentou uma pequena região de 9pb AT rico, regularmente espaçada que, segundo o autor, poderia representar o progenitor da seqüência amplificada. Em outro estudo, Crollius et al. (2000),

descreveram a ocorrência de duas famílias de DNA satélites (uma centromérica e outra subtelomérica) no genoma de *Tetraodon nigroviridis*. A família satélite centromérica mostrou-se organizada uniformemente em todos os centrômeros do complemento cariotípico, enquanto que o DNA satélite subtelomérico foi localizado no braço curto da maioria dos cromossomos da espécie, sendo que a organização bastante uniforme destas seqüências repetitivas poderia indicar um mecanismo de evolução em concerto.

Mestriner et al. (2000) identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma de *A. scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51pb, denominado As51. Análises por FISH mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em alguns sítios de RONS e no cromossomo B da população analisada. Os resultados obtidos evidenciaram que o macrocromossomo B dessa espécie é um isocromossomo, de origem intraespecífica, que passou por ampliações do DNA satélite As51 em ambos os braços cromossômicos. Em *Prochilodus lineatus*, a localização cromossômica de duas famílias de DNAs repetitivos (SATH1 e SATH2) evidenciou que os pequenos cromossomos B, presentes nesta espécie, mostram estreita correlação com a família SATH1, também encontrada na região pericentromérica de vários cromossomos do cariótipo, suportando uma origem intraespecífica dos Bs (Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006).

Uma vez que os cromossomos sexuais presentes nos peixes são ricos em seqüências de DNA repetitivos (Martins, 2007), a investigação da organização cromossômica dessas seqüências pode propiciar evidências sobre a origem e evolução desses cromossomos. A grande maioria das espécies de peixes

analisadas não evidenciam cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. Entretanto, entre as espécies portadoras de cromossomos sexuais heteromórficos, aproximadamente 64% apresentam heterogametia feminina e 36% heterogametia masculina. Oitenta por cento destes casos correspondem a sistemas de cromossomos sexuais simples e os 20% restantes a sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, (Centofante et al., 2002). Diferentemente das aves e dos mamíferos, que apresentam cromossomos sexuais na base de sua filogenia, os peixes evidenciam um surgimento independente de sistemas de cromossomos sexuais ao longo do processo evolutivo, onde processos de heterocromatinização, translocações X-autossomo, Y-autossomo e fissões cêntricas desempenharam um papel preponderante (Moreira-Filho et al., 1993; Bertollo et al., 1997b; Bertollo & Mestriner, 1998; Almeida-Toledo et al., 2000; Almeida-Toledo et al., 2001).

Seqüências repetitivas sexo-específicas já foram isoladas e mapeadas nos cromossomos de diversas espécies de peixes, a exemplo de *Leporinus elongatus* (Nakayama et al., 1994; Parise-Maltempa et al., 2007), *Chiondraco hamatus* (Capriglione et al., 1994), *Poecilia reticulata* (Nanda et al., 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin et al., 1991; Stein et al., 2001), *Salvelinus namaycush* (Stein et al., 2002), *Oreochromis niloticus* (Harvey et al., 2002; Ezaz et al., 2004), *Parodon hilarii* (Vicente et al., 2003), entre outros. Nos Poecilidae, embora os cromossomos sexuais não sejam diferenciados por coloração convencional, eles podem ser facilmente caracterizados por um grande bloco heterocromático na região telomérica dos cromossomos Y e W de algumas espécies, rico em DNA repetitivo, o qual se mostra reduzido nos cromossomos X e Z, respectivamente,

sugerindo que o surgimento e o desenvolvimento dessas seqüências tenham sido os primeiros passos na diferenciação citológica desses cromossomos (Nanda et al., 1990). Em *L. elongatus* duas famílias de DNAs satélites sexo-específicas foram isoladas do genoma, cujas seqüências não mostraram clara homologia com nenhuma outra seqüência conhecida (Nakayama et al., 1994). Uma dessas famílias foi localizada, por FISH, em ambos cromossomos (Z e W), enquanto que a outra parece específica do cromossomo W. Por outro lado, algumas seqüências repetitivas são compartilhadas tanto pelos cromossomos sexuais como pelos autossomos. Assim, Vicente et al. (2003), isolaram e identificaram uma família de DNA satélite, denominado pPh2004, utilizando o método de restrição enzimática do DNA genômico de *Parodon hilarii*. Este DNA foi identificado como uma seqüência monomérica de 200pb e 60% rico em pares de bases AT. A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou 14 sítios deste DNA satélite em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W. Este padrão de distribuição, juntamente com dados de bandamentos C e G, permitiu inferir sobre a origem e diferenciação do cromossomo W a partir de um cromossomo ancestral similar ao cromossomo Z dessa espécie e também da espécie *P. moreirai*.

Em *Hoplias malabaricus*, uma família de DNA repetitivo em tandem, como similaridade a repetições de DNAr 5S, foi isolada a partir do DNA genômico e denominada 5SHindIII-DNA. A clonagem e o seqüenciamento desta família identificou fragmentos de DNA de 350-360 pares de bases, com a presença de inserções, deleções e substituição de bases entre os clones (Martins et al., 2006). A principal diferença entre as unidades de repetição do DNAr 5S e da família

5SHindIII-DNA está na presença da seqüência expandida de um microsátelite TAAA no ITS (espaçador não-transcrito) e duas pequenas deleções internas na região transcricional do RNAr 5S desta família de DNA repetitivo. A transferência de unidades repetitivas do “DNAr 5S verdadeiro” para a posição centromérica pode ter modificado o status de pressão seletiva sobre esses genes, possibilitando sua multiplicação e dispersão ao longo dos centrômeros de vários pares cromossômicos, como tem sido demonstrado para outras seqüências satélites centroméricas. A primeira cópia de 5SHindIII-DNA pode ter se associado com outra seqüência repetitiva, localizada na heterocromatina centromérica, facilitando a sua dispersão para os outros cromossomos, devido à mecanismos de evolução em concerto (Martins et al., 2006). Por sua vez, é igualmente provável que esta família de DNA tenha sido favorecida durante o processo evolutivo, devido a um possível papel no que se refere à estrutura ou à função dos centrômeros.

Uma análise comparativa entre os cariomorfos de *H. malabaricus*, *H. lacerdae*, *H. unitaeniatus* e *E. erythrinus* mostrou que esta família de DNA satélite é exclusiva de *H. malabaricus*, não sendo evidenciada em nenhum dos cromossomos das demais espécies de Erythrinidae, mesmo na espécie congênica, *H. lacerdae* (Ferreira et al. 2007). Entretanto, diferenças quanto ao número e à posição de sítios de 5SHindIII-DNA foram detectadas entre os cariomorfos A, D e F de *H. malabaricus*, evidenciando que esse DNA satélite deve ter surgido durante a divergência de *H. malabaricus* dos demais grupos de Erythrinidae e antes da diversificação dos cariomorfos de *H. malabaricus* e, desde então, acompanhado a diferenciação destas formas cariotípicas. Dessa forma, o

satélite 5SHindIII-DNA mostra-se extremamente promissor como marcador citogenético nos estudos cromossômicos do complexo *H. malabaricus*.

Nos eucariotos superiores, os genes do RNA ribossômico (RNAr) encontram-se organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e DNAr 5S, as quais são compostas por unidades repetitivas, com centenas a milhares de cópias. O DNA ribossômico 45S compreende os genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5,8S e 28S, os quais se encontram separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 E ITS2) e flanqueados pelos espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não transcritos (NTS) (Long & David, 1980). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs). Entre os peixes, estas regiões têm mostrado uma grande variabilidade, não somente em relação ao número, posição e tamanho dos cístrons ribossômicos, mas também em relação à atividade diferencial dos mesmos, estando sujeitas a extensos polimorfismos (Foresti et al., 1981; Almeida-Toledo, 1998; Galetti Jr, 1998; Vicari et al., 2006; Capistano et al., 2008).

Pendás et. al (1994), analisaram comparativamente a região organizadora de nucléolos do salmão do Atlântico pela coloração com o nitrato de Prata e pelo FISH/DNAr 18S, evidenciando a correspondência entre as Ag-RONs e os sítios de DNAr 18S, como também uma dispersão do DNAr na heterocromatina presente no par cromossômico nucleolar. A correspondência entre as Ag-RONs e os cístrons DNAr foi também evidenciada em outras espécies de peixes, tais como *Salvelinus malma* (Alonso et al., 1999), *Anguilla anguilla* (Viñas et al., 2004), entre muitos outros estudos incluindo diversas espécies Neotropicais. As seqüências de

DNAr 5S também tem sido investigadas em várias espécies de peixes teleósteos, mostrando-se um bom marcador cromossômico para o entendimento da dinâmica evolutiva das famílias repetitivas multigênicas no genoma (Martins & Wasko, 2004). Para a maioria das espécies de peixes, os genes de RNAr 5S tem uma posição intersticial nos cromossomos, o que pode sugerir alguma vantagem quanto à esta distribuição no genoma. A maior conservação dos sítios de DNAr 5S na região intersticial dos cromossomos, comparada com a maior variação observada nos sítios de DNAr 45S, pode estar associada com a localização mais comum destes últimos sítios nas regiões teloméricas dos cromossomos, facilitando a sua dispersão (Martins & Galetti, 1999). De acordo com Schweizer & Loidl (1987), regiões teloméricas são mais propícias à transferência de material genético devido às suas proximidades dentro do núcleo interfásico.

Sabe-se que os loci de DNAr 45S e 5S podem assumir uma organização sintênica no cromossomo ou podem estar localizados em pares cromossômicos distintos. Entretanto, a localização não-sintênica dos loci das RONS e do DNAr 5S aparenta ser a situação mais comumente observada nos peixes (Lucchini et al., 1993) e até o momento o padrão de distribuição mais freqüente observado entre os vertebrados (Suzuki et al., 1996). Em eucariotos, os genes RNAr 45S são transcritos pela enzima nucleolar RNA polimerase I, enquanto os genes RNAr 5S são transcritos fora do nucléolo pela enzima RNA polimerase III. É sugerido que tal divergência funcional requer uma localização física diferente dos *clusters* de DNAr 45S e 5S. Outro fato, também relevante, é que a localização sintênica dos clusters 45S e 5S poderia facilitar a ocorrência de translocações entre essas

seqüências gênicas, causando interferências nas estruturas bem como nas funções desses genes (Martins & Galetti, 1999).

Seqüências teloméricas têm sido uma ferramenta importante na análise de processos evolutivos. Essas seqüências, originalmente isoladas de bibliotecas de DNA repetitivo humano, consistem de repetições curtas, ricas em Guanina – (TTAGGG)_n – e amplamente distribuídas e conservadas no genoma de vertebrados. Os complexos formados pelas seqüências (TTAGGG)_n com proteínas específicas constituem estruturas altamente especializadas nas extremidades dos cromossomos dos eucariotos – os telômeros – os quais desempenham uma série de funções vitais, tais como conferir estabilidade aos cromossomos e permitir a replicação completa das suas extremidades (Blackburn, 1994). Desta maneira, seqüências (TTAGGG)_n estão presentes nos telômeros dos cromossomos de todos os vertebrados e o seu estudo permite fazer inferências a respeito dos rearranjos cromossômicos, envolvidos na evolução cariotípica de vários grupos de organismos. O aparecimento de sítios cromossômicos intersticiais da seqüência (TTAGGG)_n tem sido resolutivo na análise da evolução cariotípica envolvendo fusões teloméricas a partir de uma condição ancestral. De fato, há evidências de sítios teloméricos intersticiais, remanescentes de verdadeiros telômeros, resultantes de rearranjos cromossômicos tais como inversões, fusões cêntricas e em tandem ocorridas durante a evolução cariotípica em várias espécies. No entanto, muitos casos de fusões cromossômicas em tandem ou de fusões cêntricas podem não mostrar os sítios intersticiais esperados, provavelmente pela perda ou redução drástica do DNA telomérico durante esses rearranjos (Schubert et al., 1992).

Entre os peixes, a localização de seqüências (TTAGGG)_n vem sendo também utilizada na busca de indícios de rearranjos cromossômicos associados aos processos evolutivos. Embora em muitos casos a localização cromossômica dessas seqüências mostre apenas a sua distribuição primária nos telômeros (Meyne et al., 1990; Rossi & Gornung, 2005), sítios não teloméricos têm sido também observados em alguns casos (Reed & Phillips, 1995; Chew et al., 2002; Ocalewicz et al., 2004). Em algumas espécies de trutas e salmões (*Salmo trutta*, *S. salar*, *Onchorhynchus kisutch* e *O. mykiss*), seqüências teloméricas foram localizadas em regiões correspondentes às RONS (Abuín et al., 1996), sugerindo a dispersão desses elementos ao longo da região organizadora de nucléolo. A presença de sítios teloméricos intersticiais em um par cromossômico de *S. salar*, bem como da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Chew et al., 2002), foi considerada indicativa de eventos de fusão cromossômica ocorridos durante a evolução cariotípica dessas espécies.

A investigação de DNAs repetitivos em peixes Neotropicais, embora relativamente recente, é uma ferramenta promissora para a análise da organização e evolução genômica desse grupo. Assim, o emprego de DNAs repetitivos, associado a outros procedimentos de análise cromossômica, vêm fornecendo importantes contribuições para o conhecimento do componente heterocromático do genoma bem como da evolução cariotípica geral de diversas espécies de peixes, mostrando-se particularmente eficaz no que se refere à origem, diferenciação e organização de algumas classes de cromossomos, entre as quais se destacam os cromossomos sexuais e os cromossomos B.

1.4 Referências Bibliográficas

- Abuín M, Martínez P, Sánchez L: Localization of the telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. **Genome** 9: 1035-1038 (1996).
- Almeida-Todelo LF, Foresti F, Oliveira C: A citogenética de peixes no Brasil. In: **Anais do X Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Instituto Oceanográfico, São Paulo, pp. 347-376 (1993).
- Almeida-Todelo LF: Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari, RP, Lucena ZMS and Lucena CAS (eds.): **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Edipucrs, Porto Alegre, pp. 583-588 (1998).
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho AS: Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma** 109:197-200 (2000).
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Pequignot EV, Daniel-Silva MF: XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. **Cytogenet Cell Genet** 95:73–78 (2001).
- Alonso MA, Fujiwara E, Yamaha S, Kimura S: Ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions associated with heterochromatin in Alaskan char *Salvelinus malma* and chum salmon *Oncorhynchus keta*. **Hereditas** 131: 221–225 (1999).

- Arnheim N: Concerted evolution of multigene families. In: Nei M, Koehn RK (eds.): **Genes and Evolution of Genes and Proteins**, Sinauer, Sunderland, pp. 36-61 (1983).
- Artoni RF, Falcão JN, Moreira-filho O, Bertollo LAC: An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Res** 9: 449-456 (2001).
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica** 127:277-284 (2006).
- Badaeva ED, Dedkova OS, Gay G, Pukhalskyi VA, Zelenin AV, Bernard S, Bernard M: Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. **Genome** 50:907-926 (2007).
- Beridze T: Satellite DNA. **Springer Verlag**, Berlin-Heidelberg (1986).
- Bertollo LAC: Chromosome evolution in the neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C Foresti F, Kapoor BG (eds): **Fish Cytogenetics**. Science Publisher, Inc., Enfield, pp 195-211 (2007).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J Genet** 1:103-120 (1978).
- Bertollo LAC, Mestriner CA: The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. **Chromosome Res** 6:141-147 (1998).

- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Res** 5:493-499 (1997a).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS: Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n = 40 chromosomes. **Brazil J Genet** 20:237-242 (1997b).
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res** 8: 603–613 (2000).
- Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MS, Falcão JN, Fenocchio AS: Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity** 93:228–233 (2004).
- Blackburn EH: Telomeres: No end in sight. **Cell** 77, 621-623 (1994).
- Born GG, Bertollo LAC: An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res** 8: 111-118 (2000).
- Capistano TG, Castro ALBP, Julio-Junior HF: Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genet Mol Biol** 31:203-207 (2008).
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 55:139–150 (2002).

- Capriglione T, Morescalchi A, Olmo E, Rocco L, Stingo L, Manzo S: Satellite DNAs heterocromatin and sex chromosomes in *Chianodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). **Polar Biol** 14: 285-290 (1994).
- Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 371: 215–220 (1994).
- Chew JSK; Oliveira C; Wright JM; Dobson MJ: Molecular and cytogenetics analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma** 111: 45-52 (2002).
- Clabby C, Goswami U, Flavin F, Wilkins NP, Houghton JA, Powell R: Cloning, characterization and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Gene** 168: 205-209 (1996).
- Crollius HR, Jaillon O, DaSilva C, Ozouf-Costaz C, Fischer C, Bouneau L, Billault A, Quetier F, Saurin W, Bernot A, Weissenbach J: Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Res** 10: 939-949 (2000).
- Datta U, Dutta P, Mandal K: Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. **Gene** 62: 331-336 (1988).
- Devlin RH, Mcneil BK, Donaldson EM: Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. **Can J Fish Aquat Sci** 48: 1606-1612 (1991).
- Dergam JA, Bertollo LAC: Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazil J Genet** 4:755-766 (1990).

- Dergam JA, Suzuki HI, Shibatta AO, Silva LFD, Júlio HF, Giuliano-Caetano L, Black WC: Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) in the Iguassu, Tibagi, and Paraná rivers. **Genet Mol Biology** 21:493-496 (1998).
- Diniz D, Bertollo LAC: Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** 56:303–313 (2003).
- Ezaz MT, Myers JM, Powell SF, Mcandrew BJ, Penman DJ: Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** 232:205–214 (2004).
- Fink SV, Fink WL: Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zool J Linnean Soc** 72:297-353 (1981).
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C: Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus*' species complex. **Cytogenet Genome Res** 118:78–83 (2007).
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo Filho AS: Polymorphic nature of nucleolar organizer regions in fishes. **Cytogenet Cell Genet** 31: 137-144 (1981).
- Galetti Jr, PM: Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital J Zool** 65:53-56 (1998).
- Galetti Jr. PM, Lima NRW, Venere PC: A monophyletic ZW chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia** 60: 375-382 (1995).
- Grewal SIS, Jia S: Heterochromatin revisited. **Nat Rev Genet** 8:35–46 (2007).

- Giuliano-Caetano L, Jorge LC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia** (Tokyo) 66:39–43 (2001).
- Haaf T, Schmid M: Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. **Exp Cell Res** 192: 325-332 (1991).
- Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LAP, Bromage NR, Penman DJ, Griffin DK: Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. **Cytogenet Gen Res** 97: 76-80 (2002).
- Jesus CM, Galetti Jr PM, Valentini SR, Moreira-Filho O: Molecular and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** 118: 25-32 (2003).
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet Genome Res** 110:462–467 (2005).
- Long EO, David ID: Repeated genes in eukaryotes. **Ann Rev Biochem** 49: 727-764 (1980).
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F: Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome** 36: 762-773 (1993).
- Lundberg JG, Kottelat M, Smith GR, Stiassny MLJ, Gill AC: So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Ann Mo Bot Gard** 87: 26-62 (2000).

- Martínez JL, Mórán P, Garcia-Vásquez E, Pendás AM: Chromosomal localization of the major and minor 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenet Cell Genet** 73:149-152 (1996).
- Martins C, Galetti Jr PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 7: 363–367 (1999).
- Martins C, Wasko AP: Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed.): **Focus on Genome Research**, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY., pp. 289-318 (2004).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** 127: 133–141 (2006).
- Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C Foresti F, Kapoor BG (eds.): **Fish Cytogenetics**. Science Publisher, Inc., Enfield, pp 421–453 (2007).
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM: Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85:1–9 (2000).
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyziz RK: Distribution of nontelomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma** 99: 3-10 (1990).
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC: *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. **Brazil J Genet** 14: 331–357 (1991).

- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM: Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia** 46: 115-125 (1993).
- Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC: Evolutionary cytogenetics in species of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Brazil J Biol** 67:897-903 (2007).
- Moyer SP, Ma DP, Thomas TL, Gold JR: Characterization of a highly repeated satellite DNA from the cyprinidae fish *Notropis lutrensis*. **Comp Biochem Physiol** 91: 639-646 (1988).
- Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Schart I M, Chourrout D: Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma** 103: 31–39 (1994).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J Mol Evol** 30:456–462 (1990).
- Nelson, JS: **Fishes of the World**. John Wiley & Sons Inc., New York. 4th edition. 601pp (2006).
- Ocalewicz K, Sliwinska A, Jankun M: Autosomal localization of interstitial telomeric sites (ITS) in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Pisces, Salmonidae). **Cytogenet Genome Res** 105:79–82 (2004).
- Oyakawa OT: Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei, Erythrinidae). Unpublished, M.Sc. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo p.114 (1990).

- Oyakawa OT: Family Erythrinidae. In Reis R; Kullander S; Ferraris C (Eds): **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, pp. 238-240 (2003).
- Oyakawa OT, Mattox GMT: Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotrop Ichthyol** 7:117-140 (2009).
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F: Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet Genome Res** 116:218-223 (2007).
- Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E: Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic Cell Genet** 67: 31-36 (1994).
- Reed KM, Phillips RB: Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma** 104:242-251 (1995).
- Rossi AR, Gornung E: Cytogenetic analysis of three Italian populations of *Coregonus lavaretus* (Pisces, Salmoniformes) with chromosomal localization of major and minor ribosomal genes, and telomeric repeats. **Hereditas** 142: 1-7 (2005).
- Schubert I, Schriever-Schwemmer G, Werner T, Adler ID: **Telomeric** signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. **Cytogenet Cell Genet** 59: 6-9 (1992).

- Schweizer D, Loidl J: A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosomes Tod** 9: 61-74 (1987).
- Singer MF: Highly repetitive sequences in mammalian genomes. **Int Rev Cytol** 76: 67-112 (1982).
- Stein J, Phillips RB, Devlin RH: Identification of the Y chromosome in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenet Cell Genet** 92:108-110 (2001).
- Stein J, Reed KM, Wilson CC, Phillips R: A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. **Environ Biol Fishes** 64: 211-216 (2002).
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y: Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet Cell Genet** 72: 1-4 (1996).
- Topp CN, Dawe RK: Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. **Curr Opin Plant Biol** 9:647–653 (2006).
- Vari RP, Castro RMC, Raredon SJ: The neotropical fish family Chilodontidae (Teleostei: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of *Centropus günther*. **Smiths Contrib Zool** 577:1-32 (1995).
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genet Mol Biol** 28: 103-110 (2005).

- Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF: Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genet Mol Biol** 29: 621-625 (2006).
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenet Genome Res** 122:67-72 (2008).
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O: Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G-and C-banding. **Genetica** 119: 115-120 (2003).
- Viñas AM, Abuín BG, Pardo P, Martínez L: Characterization of a new HpaI centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. **Genetica** 121: 81-87 (2004).
- Wright JM: Nucleotide sequence, genomic organization and the evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). **Nucleic Acids Res** 17: 5071-5079 (1989).

2- Justificativa e Objetivos

Considerando os dados até agora disponíveis, *Hoplias malabaricus* provavelmente representa um grupo de espécies distintas, hoje englobadas em uma mesma denominação específica. Sete cariomorfos (A-G) já foram identificados, com base na macroestrutura do cariótipo, ou seja, o número e a morfologia dos cromossomos e a presença ou ausência de cromossomos sexuais heteromórficos.

Dentre estes sete cariomorfos, quatro deles (A, B, C e D) aparentam possuir um relacionamento cariotípico mais estreito (Grupo I), quando comparados com os outros três cariomorfos (E, F e G), também aparentemente mais relacionados entre si (Grupo II).

Por sua vez, dentro do Grupo I, os cariomorfos A e B mostram-se mais relacionados, apresentando o mesmo número diplóide $2n=42$ cromossomos, e diferenciando-se por um sistema de cromossomos sexuais XX/XY presente no cariomorfo B, enquanto que o cariomorfo A não evidencia diferenças cromossômicas quanto aos sexos. O mesmo parece ser também válido para os cariomorfos C e D. Enquanto que o cariomorfo C apresenta $2n=40$ cromossomos tanto em machos como em fêmeas, sem cromossomos sexuais heteromórficos distintos, o cariomorfo D apresenta $2n=40$ cromossomos nas fêmeas e $2n=39$ cromossomos nos machos, devido a um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$ característico.

Paralelamente, os avanços da citogenética molecular vêm permitindo o uso de diversos marcadores, os quais têm se mostrado extremamente úteis e resolutivos

para a análise da diferenciação e evolução cromossômica, dentre os quais aqueles gerados pela análise de DNAs repetitivos.

Assim sendo, a proposta básica do presente estudo foi uma análise comparativa mais pormenorizada dos cariomorfos A, B, C e D de *Hoplias malabaricus* (Grupo I), buscando:

- a) evidências adicionais reforçando as relações cromossômicas entre essas quatro formas cariotípicas, suportando sua alocação em um mesmo grupo evolutivo maior (Grupo I), bem como a maior proximidade entre os cariomorfos A e B e os cariomorfos C e D;
- b) uma caracterização mais específica do processo de diferenciação do sistema de cromossomos sexuais XX/XY, presente no cariomorfo B, bem como do sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, presente no cariomorfo D.

Para tanto, além das análises cariotípicas por coloração Giemsa convencional, bandamento C, Ag-RONs e emprego de fluorocromos base específicos, foi também utilizado o mapeamento citogenético de diferentes marcadores pela hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a partir de distintas classes de DNAs repetitivos.

3- Material e Métodos

3.1 Amostragens do material biológico

Foram analisados espécimes de *Hoplias malabaricus* (**Figura 1**), pertencentes aos cariomorfos A, B, C e D (**Tabela 1**), oriundos de diferentes bacias hidrográficas. As coordenadas relativas aos respectivos locais de coleta estão indicadas na legenda da Figura 2. Os espécimes foram depositados na Coleção Ictiológica do Departamento de Morfologia (UNESP, Campus de Botucatu, SP), sob números de registro LBP9014, LBP9015 e LBP9016.

3.2 Preparação de cromossomos mitóticos

Foi adotada a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978) para preparações cromossômicas *in vivo*. Foi injetada uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na região abdominal do peixe, na proporção de 1ml/100g de peso. Posteriormente, o exemplar foi mantido em aquário com aeração, durante 50–60 minutos. Após esse tempo, o animal foi sacrificado e foram retirados fragmentos do rim anterior. Este material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M) e transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10 ml desta mesma solução, sendo então bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação. A fragmentação do material foi completada com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, absorvendo e eliminando várias vezes os fragmentos de tecido renal, facilitando assim a separação das células e a obtenção de uma suspensão celular homogênea. A suspensão obtida foi incubada em estufa

a 36 - 37°C, durante vinte minutos. O material foi então agitado cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferido para um tubo de centrífuga, adicionando-se algumas gotas (5-6) de fixador, recém preparado (metanol + ácido acético glacial 3:1). Esta mistura foi novamente revolvida várias vezes e centrifugada por 10 minutos a 500 – 800 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se ao sedimento celular 5-7ml de fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo. O material foi revolvido novamente com auxílio da pipeta Pasteur, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de fixador ao sedimento celular, misturando-os bem. Este material foi então guardado à -20°C, acondicionado em pequenos frascos.

3.3 Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos

Três a quatro gotas das suspensões celulares obtidas foram adicionadas sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, mantida em água destilada levemente aquecida (40-50°C), ou sobre uma lâmina seca aquecida ao redor de 40°C, em chapa aquecedora. O excesso de material foi eliminado, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro. As preparações foram secas diretamente ao ar e coradas com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 6 a 8 minutos. O excesso de corante foi retirado pela lavagem da lâmina com água destilada e o material secado ao ar.

3.4 Preparação de cromossomos meióticos

Cromossomos meióticos foram obtidos de acordo com Kligerman & Bloom (1977), como descrito em Bertollo & Mestriner (1998). Os testículos foram seccionados em pequenos fragmentos e submetidos a um tratamento hipotônico (KCl 0,075M), por 20-30 minutos, seguindo-se a fixação do material em metanol + ácido acético glacial (3:1), durante 30 minutos. Repetiu-se o procedimento de fixação pelo menos mais uma vez. Os fragmentos de testículo foram então tratados com algumas gotas de solução de ácido acético glacial 50% e fragmentados com pinças de dissecação até a obtenção de uma suspensão celular homogênea. Gotas desta suspensão foram transferidas para uma lâmina de vidro pré-aquecida (30°C), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta bem fina. O material foi pingado e imediatamente sugado pela pipeta, formando um anel celular com aproximadamente 1 cm em diâmetro na lâmina. As preparações foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato, pH 6,8, durante 5-6 minutos, lavadas com água corrente e secadas ao ar.

3.5 Bandamentos cromossômicos

3.5.1 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de Prata (Ag-RONs)

(Howell & Black, 1980)

As Ag-RONs foram evidenciadas tratando-se as preparações cromossômicas com 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2%, contendo ácido fórmico a 1%, e 2 gotas de nitrato de Prata a 50%. O material foi então incubado em estufa a 60°C, durante um período de 3-5 minutos, lavado e água corrente e corado com Giemsa

a 1% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 1 minuto, novamente lavado em água corrente e secado ao ar.

3.5.2 Análise da heterocromatina C-positiva (bandamento C)

(Sumner, 1972, com pequenas modificações)

As preparações cromossômicas foram tratadas com uma solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, por 13 minutos, lavadas em água destilada e secadas ao ar. Seguiram-se a incubação do material em uma solução de hidróxido de Bário a 5%, a 42°C, por um período de 70 segundos e uma lavagem rápida em solução de HCl 0,2N e água destilada e secagem ao ar. A seguir, as preparações foram tratadas com uma solução 2xSSC, a 60°C, por 45 minutos, lavadas em água destilada e coradas com solução Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 10-20 minutos, e secadas ao ar.

3.6 Coloração por fluorocromos base-específicos

3.6.1 DAPI (AT-específico) e Cromomicina A₃ (GC-específico).

(Sola, 1982, com algumas modificações)

As preparações foram inicialmente tratadas com uma solução de Distamicina A (0,3 mg/ml) durante 15 minutos, em temperatura ambiente, lavadas em tampão McIlvaine e secadas ao ar. A seguir, o material foi tratado com uma solução de Cromomicina A₃ (0,5 mg/ml) durante 60 minutos (no escuro), lavado em tampão McIlvaine e secado ao ar. Foi aplicada sobre a lâmina 40 µl de uma solução de DAPI (1,2 µg/ml) + *Antifading* (Vectashield), o material foi coberto com uma lâminula de vidro e estocado (no escuro) por aproximadamente 30 dias,

para a estabilização da fluorescência. A análise foi realizada em microscopia de epifluorescência, com filtro de 450-490 nm.

3.7 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 5S, DNAr 18S, 5SHindIII-DNA, *Cot-1* DNA, (TTAGGG)_n e (GATA)_n.

(Pinkel et al., 1986, com algumas modificações)

3.7.1 Preparação das Sondas

Sondas de DNAr 5S e 5SHindIII-DNA

A sonda de DNAr 5S utilizada é constituída pelo segmento transcricional do gene RNAr 5S, com 120 pares de bases (pb), e pelo espaçador não-transcrito (NTS), com 200 pares de bases. A seqüência de DNA satélite 5SHindIII-DNA com 360 pb, é composta de um segmento com 95 pb, com similaridade ao gene de RNAr 5S e um segmento com 265 pb, similar ao NTS da primeira sonda. Ambas as sondas foram previamente clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em *Escherichia coli* DH5 α (Martins et al., 2006).

Sonda de DNAr 18S

Para a obtenção da sonda de DNAr 18S, o DNA genômico de *H. malabaricus* foi extraído a partir do fígado, de acordo com o método de fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 2001). A seqüência de DNAr 18S foi obtida a partir da amplificação por PCR com a utilização dos primers R (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3') e F (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3'), desenhados a partir da seqüência de DNAr 18S de *Ictalurus punctatus* para

amplificar um segmento de aproximadamente 1.400 pb da região que transcreve o RNAr 18S. Para a amplificação foram utilizados 50ng de DNA genômico, 150 pmol de cada primer, 1,25 mM de cada dNTP, tampão de reação contendo 1,5 mM MgCl₂ e 1U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação seguiram a seguinte programação: 5 minutos a 94°C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 95°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C e 7 minutos a 72°C (extensão). Um fragmento amplificado, de tamanho aproximado de 1.400 pares de bases, foi obtido a partir da corrida do produto de PCR em um gel de agarose a 1% **(Anexos: Figura 1)**.

Purificação de produtos de PCR (kit GFX PCR DNA and Purification – Amersham Biosciences)

As colunas de filtração foram acopladas a um tubo Eppendorf, adicionando-se 500 µl de tampão de captura e 20 µl do produto de PCR do gene RNAr 18S. A mistura foi pipetada de 4 a 6 vezes e, logo após, centrifugada a 14.000 rpm, por 30 segundos. A solução que passou pelas colunas foi descartada e foram adicionados mais 500 µl de tampão de lavagem à coluna, o qual foi novamente centrifugado a 14.000 rpm, por 30 segundos e descartado. A seguir, as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 ml e nelas foram adicionados 20 µl de água estéril a 37° C. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 14.000 rpm, por mais 1 minuto para recuperação do DNA.

Ligação de fragmentos de DNA a vetores de clonagem

Os fragmentos de DNA r 18S, gerados por PCR e purificados, foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega). A reação, utilizando este vetor, foi realizada acrescentando-se a um tubo 3µl do fragmento de DNA de interesse (produto de PCR purificado), 5µl de tampão de ligação 2x, 1µl da enzima T4 ligase (3U), 1µl do vetor (50ng/µl) e 3µl de água estéril, totalizando um volume de 10µl. A mistura foi agitada cuidadosamente e incubada, por cerca de 12 horas, a 4°C.

Transformação de bactérias competentes e identificação de colônias recombinantes

Em um tubo estéril, foram colocados 50µl de bactérias competentes (*Escherichia coli* DH5α) e 10µl da reação de ligação, os quais foram misturados cuidadosamente. Os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos, submetidos a um choque térmico a 37°C, por 40 segundos e transferidos novamente para o gelo, onde permanecem por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados a cada tubo 950µl de meio líquido LB (peptona 1% /NaCl 0,17M/extrato de levedura 0,5%, pH 7,5), à temperatura ambiente. Após serem cuidadosamente misturados, os tubos foram incubados a 37°C, por cerca de 1 hora, sob agitação (250 rpm) e depois centrifugados, por 20 segundos, a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o produto da transformação espalhado em placas de Petri estéreis, contendo meio sólido LB (peptona 1% /NaCl 0,17M/extrato de levedura 0,5%/agar 1,5%, pH 7,5), ampicilina (50mg/ml/ml de meio LB) e 50µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galatoside, 50mg/ml). As placas foram

incubadas por 16h em estufa a 37°C. No dia seguinte, as colônias de coloração branca, potencialmente portadoras do inserto de interesse nos plasmídios, foram selecionadas e esta presença confirmada por PCR.

PCR para a confirmação da presença de insertos

As colônias brancas foram replicadas em meio LB sólido e submetidas diretamente à reação de amplificação por PCR. O conjunto de primers utilizados foi o M13F e M13R, que possuem similaridade às regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento no plasmídio. A reação foi realizada com tampão de PCR 10x, 10mM de dNTPs, 50mM de MgCl₂, 10µM de cada primer e 1 unidade de Platinum DNA Taq polimerase (Invitrogen), totalizando um volume final de 25µl. O programa utilizado no termociclador consistiu em um passo a 95°C por 3 minutos, seguido por 34 ciclos a 95°C por 30 segundos, a 50°C por 1 minuto e a 72°C por 2 minutos. Seguiu-se uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O sucesso da clonagem foi verificado através da checagem do produto resultante da PCR, em gel de agarose 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta.

Mini-preparações para a purificação de plasmídios recombinantes (Kit wizard Plus Minipreps DNA purification System – PROMEGA)

As bactérias, contendo os plasmídios recombinantes, cresceram por 16h em 3ml de meio de cultura líquido LB (peptona 1% / NaCl 0,17M , extrato de levedura 0,5%, pH 7,5), acrescido de ampicilina (50mg/ml de meio LB). No dia seguinte as bactérias foram transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas por

2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet revolvido em 200µl de solução tampão. Logo após, foram adicionados 200µl da solução de lise celular e os tubos foram invertidos lentamente por 4 vezes. Foram adicionados 200µl de solução de neutralização, invertendo-se novamente os tubos por mais 4 vezes. O lisado foi centrifugado por 5 minutos, a 10.000rpm, e a porção líquida obtida foi transferida para uma seringa acoplada à uma minicoluna, contendo 1 ml de resina de purificação. Vagarosamente a mistura foi filtrada a vácuo, proporcionado pelo acoplamento do êmbolo da seringa. Em seguida, foram adicionados 2ml de solução de lavagem à seringa e a solução foi novamente filtrada, da mesma forma. Finalmente a minicoluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e centrifugada por 2 minutos, a 10.000rpm. Um novo tubo foi acoplado a minicoluna, acrescentando-se 50µl de água deionizada para eluir o DNA. Após 1 minuto de incubação em temperatura ambiente, foi realizada mais uma centrifugação por 20 segundos, a 10.000rpm, para a recuperação do DNA. A minicoluna foi descartada e o tubo com o DNA purificado foi armazenado em freezer a -20°C.

Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA

Os clones obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer), com o kit de reação ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Perkin-Elmer). As seqüências nucleotídicas foram submetidas ao software Blastn (Altschul et al., 1990) para análise de similaridade em relação às sequencias depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) website

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Essa seqüência foi depositada com o número de acesso FJ577367 (**Anexos: Figura 2**).

Isolamento da fração C_{0t}-1 DNA

O DNA genômico de *H. malabaricus* (cariomorfo B) foi extraído, utilizando o procedimento de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001). Uma biblioteca enriquecida com seqüências repetitivas foi construída, com base na cinética de renaturação de C_{0t}-1DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas de DNA) (Zwick et al., 1997; Ferreira & Martins, 2008). Amostras de DNA (200µl de 100–500ng µl⁻¹ de DNA genômico em 0.3M NaCl) foram autoclavadas por 10 minutos, à 1,4 atmosferas de pressão e 120°C e o DNA fragmentado foi separado por eletroforese, em um gel à 1%. Os fragmentos de DNA variaram em tamanho de 100 a 1000 pares de bases. Amostras de 50µl do DNA fragmentados foram desnaturadas a 95°C, durante 10 minutos, colocadas em gelo por 10 segundos e transferidas para um banho de água a 65°C, para reanelamento do DNA. Após 1 minuto, as amostras foram incubadas a 37°C, por 8 minutos, com 1U da enzima S1 nuclease, permitindo a digestão das fitas simples de DNA. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio (**Anexos: Figura 3**).

Sondas de DNA telomérico (TTAGGG)_n e seqüências (GATA)_n

A sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n foi gerada por PCR, utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅. A sonda GATA foi uma repetição (GATA)_n, também gerada por PCR utilizando os primers (GATA)₇ e (TATC)₇. Ambas as

reações de PCR se deram na ausência de um DNA molde (Ijdo et al., 1991) e produziram uma população heterogênea de moléculas repetitivas de vários tamanhos (Variando de 100 a 2000 pb), quando submetidas a um gel de agarose 1% (**Anexos: Figura 4**).

3.7.2 Marcação das Sondas

As diferentes sondas utilizadas foram marcadas com biotina-14-dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) ou com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do manual do fabricante.

3.7.3 Preparação das lâminas, hibridização e detecção do sinal

As preparações cromossômicas foram inicialmente desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho e, a seguir, incubadas com RNase (40 µg/ml), por 1 hora à 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/ 2xSSC, o material foi novamente desidratado em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. As misturas de hibridização, contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida, em um volume final de 30µl, foram aquecidas a 100°C, por 10 minutos, e então aplicadas sobre as lâminas e a hibridização realizada por um período de 16-18h à 37°C, em câmara úmida. No caso de experimentos de dupla-FISH, sondas biotiniladas e marcadas com digoxigenina foram adicionadas concomitantemente no mix de hibridização, em uma proporção de 1:1. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em

formamida 50%, durante 15 minutos, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC, por 15 minutos e uma última lavagem em 4xSSC, também por 15 minutos, à temperatura ambiente. A detecção das sondas foi realizada com avidina-FITC 0,07% conjugados (Sigma) em tampão C (0.1 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl), por 1h, para sondas previamente marcadas com biotina ou com anti-digoxigenina-rhodamina (Roche) em tampão C (0.1 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl) também por 1h, para sondas previamente marcadas com digoxigenina. Em experimentos de dupla-FISH as detecções foram realizadas concomitantemente. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (50 µg/mL) ou com DAPI (1,2 µg/ml) e foram montados em solução antifading (Vector Laboratories).

3.8 Localização seqüencial das RONS em material previamente submetido à FISH

Lâminas com cromossomos previamente submetidos ao tratamento por FISH foram desmontadas, lavadas com jatos de água para retirada do meio de montagem e desidratadas em uma série alcoólica a 75%, 85% e 100%, durante 5 minutos em cada banho. Após secar ao ar, as lâminas foram submetidas ao tratamento para localização das RONS, como descrito por Howell e Black (1980), com algumas modificações. Foram colocadas sobre as lâminas duas gotas de gelatina (2%), duas gotas de água destilada e quatro gotas de nitrato de Prata, a uma concentração de 50%. A gelatina foi misturada com a água e a prata e o material coberto com uma lamínula. As lâminas foram então incubadas em estufa a 60°C, por 3 a 5 minutos, lavadas com água destilada e secadas ao ar.

3.9 Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro, estabelecendo-se o número diplóide modal de cromossomos para cada cariomorfo. Cerca de 30 células foram analisadas para cada metodologia proposta. As imagens das melhores metáfases foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro , Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetic). As preparações com fluorocromos e hibridização fluorescente *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx50, com os filtros apropriados, sendo as imagens capturadas também com a utilização do mesmo software. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) ou subtelocêntricos (st), com base na relação de braços proposta por Levan et al. (1964).

3.10 Referências Bibliográficas

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215:403-410 (1990).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J Genet** 1:103-120 (1978).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015 (1980).

- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res** 19:4780 (1991).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52:201-220 (1964).
- Martins C, Galetti Jr PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 7:363–367 (1999).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** 127:133–141 (2006).
- Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E: Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet Cell Genet** 67:31-36 (1994).
- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83:2934–2938 (1986).
- Sambrook J, Russel DW: **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3^a edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ: Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. **Cytogenet Cell Genet** 60:229–235 (1992).

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.

Exp Cell Res 75:304-306 (1972).

Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Nurul-Islam-Faridi M, Stelly DM: A rapid procedure for the isolation of C0t-1DNA from plants. **Genome** 40:138-142 (1997).

Tabelas

Tabela 1. Espécimes de *Hoplias malabaricus* por locais de coleta, com os respectivos cariomorfos e o número de exemplares analisados.

Localidade	Cariomorfo	N
Descalvado (SP) – rio do Pântano	A	8♂ 6♀
Sto. Antônio do Leverger (MT) – rio Cuiabá	A	7♂ 8♀
Parque Florestal do Rio Doce (MG) – lagoas: rio Doce	A,B	7♂ 8♀
Poconé (MT) – lagoas: rio Bento Gomes	C	11♂ 9♀
São Carlos (SP) – reservatório da UFSCar: ribeirão Monjolinho	D	10♂ 7♀

SP = São Paulo, MT = Mato Grosso e MG = Minas Gerais

Figuras



Figura 1. Vista lateral de um espécime de *Hoplias malabaricus* pertencente ao cariomorfo A. Barra = 5 cm.

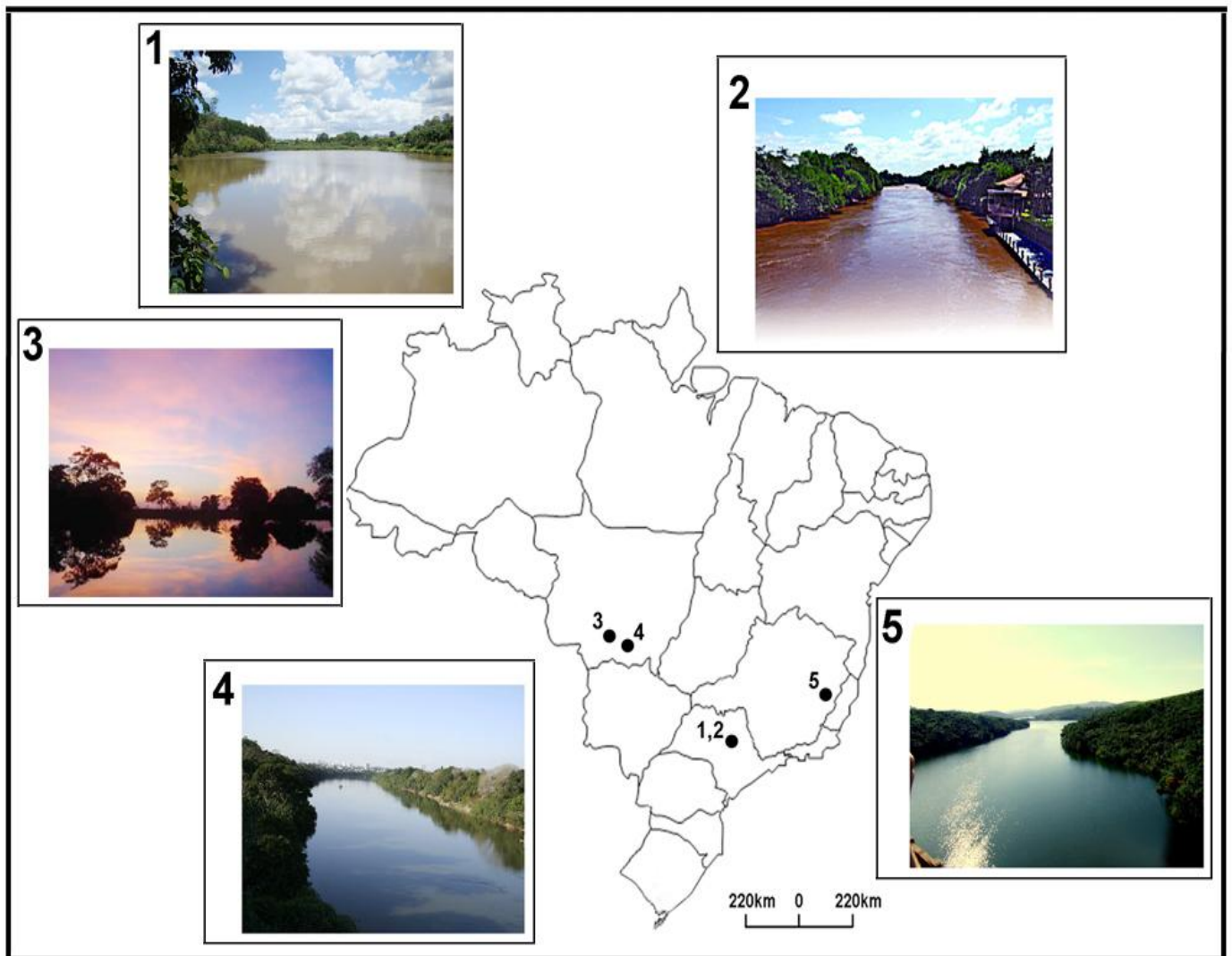


Figura 2. Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta dos espécimes de *Hoplias malabaricus* utilizados no presente estudo. **1** = reservatório da UFSCar, ribeirão Monjolinho -São Carlos , SP (21° 58' 15" S - 47° 53' 16" O); **2** = rio do Pântano – Descalvado, SP (22° 05' 27" S - 47° 45' 55" O); **3** = rio Bento Gomes - Poconé , MT (16° 40' 0" S - 57° 12' 0" O); **4** = rio Cuiabá - Sto. Antônio do Leverger, MT(15° 52' 18" S - 56° 04' 32" O) e **5** = Parque Florestal do Rio Doce-lagoas: rio Doce, MG (20° 15' 48" S - 42° 54' 04" O).

4- Resultados e Discussão

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de capítulos, os quais correspondem a artigos científicos já publicados ou aceitos para publicação.

4.1 Capítulo I

Mapeamento cromossômico comparativo de seqüências repetitivas. Implicações quanto à evolução genômica do peixe *Hoplias malabaricus*.

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics** 2009, 10:34. doi: 10.1186/147-2156-10-34

Resumo

Introdução: Sete cariomorfos do peixe, *Hoplias malabaricus* (A-G) foram previamente incluídos em dois grupos principais, Grupo I (A, B, C, D) e Grupo II (E, F, G), com base nas similaridades de suas estruturas cariotípicas. Neste trabalho, cariomorfos do Grupo I foram analisados por meio de distintos marcadores cromossômicos, incluindo a impregnação com nitrato de Prata das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) e a localização cromossômica de seqüências repetitivas (DNAr 18S e 5S, e o satélite 5SHindIII-DNA), através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com o intuito de analisar as relações evolutivas entre eles.

Resultados: Os resultados mostraram vários marcadores com localização conservada nos cromossomos dos quatro cariomorfos, além de alguns outros conservados apenas em cromossomos correspondentes dos cariomorfos A e B ou C e D. Estes dados reforçaram e confirmaram a proposta de agrupamento para os cariomorfos A-D (Grupo I), e também evidenciaram uma relação de maior proximidade entre os cariomorfos A e B, bem como entre C e D. Além disso, o padrão de mapeamento de alguns marcadores entre os autossomos e os cromossomos sexuais XY (cariomorfo B) e X_1X_2Y (cariomorfo D) forneceram evidências adicionais quanto à provável origem dos cromossomos sexuais.

Conclusão: A investigação *in situ* de seqüências de DNAs repetitivos acrescentou caracteres informativos úteis para os estudos de genômica comparativa em nível cromossômico, possibilitando um melhor entendimento das relações evolutivas entre os cariomorfos de *H. malabaricus*.

Abstract

Background: Seven karyomorphs of the fish, *Hoplias malabaricus* (A-G) were previously included in two major groups, Group I (A, B, C, D) and Group II (E, F, G), based on their similar karyotype structure. In this paper, karyomorphs from Group I were analyzed by means of distinct chromosomal markers, including silver-stained nucleolar organizer regions (Ag-NORs) and chromosomal location of repetitive sequences (18S and 5S rDNA, and satellite 5SHindIII-DNA), through fluorescence in situ hybridization (FISH), in order to evaluate the evolutionary relationships among them.

Results: The results showed that several chromosomal markers had conserved location in the four karyomorphs. In addition, some other markers were only conserved in corresponding chromosomes of karyomorphs A-B and C-D. These data therefore reinforced and confirmed the proposed grouping of karyomorphs A-D in Group I and highlight a closer relationship between karyomorphs A-B and C-D. Moreover, the mapping pattern of some markers on some autosomes and on the chromosomes of the XY and X₁X₂Y systems provided new evidence concerning the possible origin of the sex chromosomes.

Conclusion: The *in situ* investigation of repetitive DNA sequences added new informative characters useful in comparative genomics at chromosomal level and provides insights into the evolutionary relationships among *H. malabaricus* karyomorphs.

Introdução

Embora usualmente considerada uma unidade taxonômica *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae), possui uma ampla diversidade cariotípica, com diferenças populacionais bem definidas quanto ao número diplóide, morfologia dos cromossomos e sistemas de cromossomos sexuais. Tal diversidade intra-específica possibilitou a caracterização de sete cariomorfos principais (A-G), onde aqueles que não possuem sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (A, C, E e F) mostram uma distribuição geográfica mais ampla comparativamente a aqueles que apresentam tais sistemas (B, D e G), o que, de certa forma, evidencia o caráter derivado destes últimos [1]. Independentemente das diferenças no número cromossômico diplóide, ou na presença/ausência de sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, os sete cariomorfos foram subdivididos em dois grandes grupos (I e II), com base na similaridade cariotípica geral [1]. Assim, o Grupo I compreendeu os cariomorfos A-D, enquanto que o Grupo II incluiu os cariomorfos E-G (**Tabela 1**).

A diversidade cariotípica em *H. malabaricus* indica a provável existência de distintas espécies, o que é reforçado pela ocorrência de simpatria entre alguns cariomorfos, sem evidências de fluxo gênico entre eles [1]. Especificamente para os cariomorfos A e C e para os cariomorfos A e D, os resultados obtidos com marcadores genômicos de RAPD-PCR também foram congruentes com ausência de fluxo gênico, fornecendo evidências adicionais para a caracterização dos cariomorfos como unidades evolutivas distintas [2].

Entre os Erythrinidae, uma classe de DNA repetitivo denominada 5SHindIII-DNA, que compartilha similaridades com as repetições de DNAr 5S, foi previamente isolada e caracterizada [3]. Esta seqüência não foi localizada nos cromossomos de *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias lacerdae*, mostrando-se específica de *H. malabaricus*. Sua presença exclusiva nesta espécie indica que esta classe de DNA repetitivo provavelmente se originou após a divergência dos três gêneros de Erithrynidae e das espécies de *Hoplias* [4]. Por sua vez, os genes ribossomais (18S e 5S) foram também importantes marcadores em *H. malabaricus*, mostrando diferenças significativas entre populações desta espécie [5, 6].

A organização molecular e o mapeamento citogenético de genes ribossomais e de outras seqüências de DNAs repetitivos têm fornecido importantes contribuições para a caracterização da biodiversidade e da evolução da ictiofauna [7-9]. De fato, uma fração substancial de qualquer genoma eucariótico consiste em seqüências repetitivas de DNA, incluindo satélites, minissatelites, microsátélites e elementos transponíveis. Apesar de intensivos estudos nas últimas décadas, as forças moleculares que geram, propagam e mantêm os DNAs repetitivos no genoma ainda são discutidas [10]. Possíveis funções dos DNAs satélites têm sido investigadas em diversos grupos de animais, evidenciando que estas seqüências podem desempenhar um importante papel, tanto em nível cromossômico como nuclear [8, 9, 11-16].

O presente estudo reporta uma análise comparativa entre os cariomorfos de *H. malabaricus* pertencentes ao Grupo I (A, B, C e D), utilizando distintos marcadores cromossômicos, incluindo a impregnação com nitrato de Prata das

regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) e a localização cromossômica de seqüências repetitivas (DNAr 18S e 5S, e o satélite 5SHindIII-DNA) pelo emprego da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com o intuito de analisar as relações evolutivas entre eles.

Material e Métodos

Preparação de cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de espécimes de *H. malabaricus* pertencentes aos cariomorfos A, B, C e D, oriundas de diferentes bacias hidrográficas, como especificado na **Tabela 2**. Os animais foram injetados com uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na região abdominal, na dosagem de 1 ml/100g de peso do animal. Após 50-60 minutos, os espécimes foram sacrificados e as preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior [17].

Sondas

Foram utilizadas três seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus*. A primeira sonda consistiu de cópias repetidas de DNAr 5S, incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS) [3]. A segunda sonda consistiu de uma cópia da seqüência do DNA satélite 5SHindIII-DNA com 360 pares de bases, composta de um segmento com 95 pares de bases, com similaridade ao gene de RNAr 5S, e um segmento com 265 pares de bases similar ao NTS da

primeira sonda [3]. A terceira sonda correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene de RNAr 18S, obtido por PCR a partir do DNA nuclear [5].

Procedimento de FISH, detecção seqüencial das Ag-RONs e análises cariotípicas.

Para o processo de hibridização fluorescente *in situ* – FISH [18], foram utilizadas sondas marcadas por nick-translation com biotina-14-dATP (Bionick labeling system - Invitrogen). As lâminas contendo cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/ml) por 1h30 a 37°C. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/2xSSC a 70°C, as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 4 minutos a 70°C. As misturas de hibridização, contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida em um volume final de 30 µl, foram aplicadas sobre as lâminas e a hibridização foi realizada durante 14-18h a 37°C em uma câmara úmida contendo 2xSSC. Estas condições foram previamente descritas para sondas de DNAr 5S e 5S*Hind*III-DNA, com o intuito de se evitar possíveis hibridizações cruzadas [3]. Lavagens pós-hibridização foram realizadas em formamida 50%/2xSSC durante 15 minutos a 37°C, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC por 15 min, e uma última lavagem em 4xSSC por 15 min à temperatura ambiente. A detecção das sondas foi realizada utilizando avidina-FITC 0,07% conjugado (Sigma), em tampão C (0,1M NaHCO₃, 0,15M NaCl) por 1h, seguido de duas rodadas de amplificação do sinal usando anti-avidina-biotina conjugada 2,5% (Sigma), em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1,26%, citrato de sódio, 0,018%, triton 0,0386% e leite em pó 1%) durante 30 min. Cada tratamento com anti-

avidina-biotina conjugada foi seguido por um tratamento com avidina-FITC. Os tratamentos com avidina-FITC e anti-avidina-biotina foram realizadas em uma câmara úmida com 2xSSC a 37°C. Após cada rodada de amplificação, as lâminas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos em cada lavagem, no tampão de bloqueio a 42°C. As lavagens de pós-hibridização foram realizadas em um *shaker* (150 rpm). Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (50 µg/mL) e analisados em um microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As imagens cromossômicas foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics). Lâminas previamente tratadas por FISH foram lavadas com água e desidratadas em uma série alcoólica 75%, 85% e 100%, por 5 minutos em cada concentração. Após secagem ao ar, foram utilizadas para a localização das Ag-RONs [19]. Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas por espécime, para a determinação do número cromossômico diplóide e estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) ou subtelocêntricos (st) de acordo com a relação de braços [20].

Resultados

Os sítios de 5SHindIII-DNA, DNAr 18S e DNAr 5S foram claramente evidenciados pelos procedimentos de FISH, possibilitando sua perfeita identificação e localização nos cromossomos de *H. malabaricus* (**Figuras 1, 2, 3 e 4**). Esses dados foram organizados na forma de idiogramas (**Figura 5**), para facilitar a análise comparativa entre os cariomorfos.

O satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região centromérica de vários pares cromossômicos. Os cariomorfos A e B apresentaram oito pares cromossômicos

(nos. 1, 5, 6, 12, 13, 14, 18 e 19) portadores desses sítios. Adicionalmente, sítios de 5S*Hind*III-DNA foram também evidenciados no par no. 21 do cariomorfo A e nos cromossomos X e Y do cariomorfo B. Por sua vez, os cariomorfos C e D apresentaram 10 pares cromossômicos (nos. 1, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 17 e 19) com sítios compartilhados, além dos sítios localizados no par no. 20 do cariomorfo C e nos cromossomos X₂ e Y do cariomorfo D (**Figuras 1 e 5**).

Os sítios de DNAr 18S foram localizados proximamente ao centrômero ou na região telomérica dos cromossomos. Neste último caso, sítios biteloméricos, ou seja, presentes em ambos os telômeros, puderam também ser evidenciados. Os cariomorfos A e B apresentaram quatro pares de cromossomos portadores desses sítios, três deles (nos. 5, 16 e 18) mostrando uma localização conservada em ambos os cariomorfos. O quarto sítio foi exclusivo do cariomorfo A (par no. 21) ou do cariomorfo B (par no. 4). Além destes, um conspícuo cístron foi evidenciado no cromossomo X do cariomorfo B, ocupando uma grande extensão de seus braços longos. Nos cariomorfos C e D, cinco pares cromossômicos (nos. 5, 11, 13, 15 e 19) apresentaram sítios de DNAr 18S. O cromossomo 11 do cariomorfo C mostrou correspondência com o cromossomo X₁ do cariomorfo D, tanto na forma, tamanho e na localização de um sítio conspícuo de RON nos braços longos, proximal ao centrômero. Por sua vez, o cromossomo Y do cariomorfo D foi também portador de um sítio proximal de DNAr 18S, no braço curto (**Figuras 2, 3 e 5**). Em geral, foi verificada uma perfeita correspondência entre o número e a localização dos sítios de DNAr 18S e de Ag-RONs (**Figura 3**).

O mapeamento citogenético das seqüências de DNAr 5S mostrou marcadores conservados apenas em cromossomos correspondentes dos cariomorfos A e B

(par metacêntrico no. 10) ou dos cariomorfos C e D (par metacêntrico no. 2), ambos com sítios intersticiais nos braços longos. Entretanto, um “cluster” proximal mostrou-se exclusivo nos braços curtos do par submetacêntrico no. 13 do cariomorfo A, e nos braços longos do par submetacêntrico no. 12 do cariomorfo C (**Figuras 4 e 5**).

A figura 6 sintetiza a totalidade dos cromossomos correspondentes nos cariomorfos A-D, nos cariomorfos A-B e nos cariomorfos C-D, assim como os cromossomos que apresentaram sítios exclusivos de cada cariomorfo, considerando o conjunto dos DNAs repetitivos analisados.

Discussão

Apesar das diferenças existentes quanto ao número diplóide e ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados, os quatro cariomorfos analisados possuem uma estrutura cariotípica relativamente homogênea, basicamente formada por cromossomos meta-submetacêntricos, constituindo um grupo evolutivo aparentemente relacionado - Grupo I – em *H. malabaricus* [1]. Os cariomorfos A e B possuem $2n=42$ cromossomos, sendo o cariomorfo B provavelmente derivado pelo surgimento de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY, onde o X corresponde ao único cromossomo subteloicêntrico do cariótipo. Tal relação de proximidade também parece ser válida para os cariomorfos C ($2n=40$) e D ($2n=39$ machos/ $2n=40$ fêmeas), sendo este último também possivelmente derivado pelo surgimento de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ [1].

O mapeamento citogenético de diferentes seqüências de DNAs repetitivos forneceu marcadores cromossômicos resolutivos, que permitiram a determinação de relacionamentos entre os diferentes cariomorfos. A utilização desses mesmos marcadores, em uma análise comparativa entre diferentes populações do cariomorfo A, também demonstrou uma diferenciação genômica contínua nesse grupo, permitindo a detecção de eventos evolutivos recentes, independentemente de grandes variações nos cariótipos [5]. De fato, os DNAs repetitivos apresentam uma alta dinâmica ao longo da evolução, possibilitando o seu emprego em estudos evolutivos. A avaliação de todos os marcadores obtidos mostrou sete pares de cromossomos correspondentes nos quatro cariomorfos, quatro pares correspondentes nos cariomorfos A-B e sete pares correspondentes nos cariomorfos C-D, ao lado de alguns cromossomos exclusivos (**Figura 6**). Além de corroborar a inclusão dos cariomorfos A-D em um mesmo grupo evolutivo maior (Grupo I), estes resultados reforçaram a maior proximidade entre os cariomorfos A-B e os cariomorfos C-D, além de identificar algumas de suas especificidades.

A seqüência repetitiva 5SHindIII-DNA é uma família de DNA organizada em tandem, que compartilha similaridades com as unidades repetidas do DNAr 5S tendo, provavelmente, se originado a partir de segmentos duplicados desta classe de DNA ribossômico [3]. Essa família de DNA satélite mostrou-se relativamente abundante no genoma de *H. malabaricus*, com 18 sítios cromossômicos detectados nos cariomorfos A-B e 22 sítios nos cariomorfos C-D. Apesar de 18 sítios de 5SHindIII-DNA representarem a situação mais freqüente encontrada no cariomorfo A, um estudo comparativo entre diferentes populações deste

cariomorfo evidenciou também 22 sítios em uma delas. Entretanto, tais sítios adicionais não mostraram correspondência com nenhum daqueles presentes nos cromossomos dos cariomorfos C e D [5]. Todos os sítios de 5SHindIII-DNA tiveram uma localização exclusiva na região centromérica dos cromossomos, consistente com dados anteriormente obtidos com outras populações de Erythrinidae [4]. É sabido que as regiões centroméricas são ricas em DNAs repetitivos, a exemplo do que ocorre em vários organismos, incluindo humanos, ratos, milho, moscas de fruta e fungos [21]. Assim sendo, é possível que as seqüências 5SHindIII-DNA possam desempenhar algum papel estrutural ou funcional nos cromossomos de *H. malabaricus*, como componentes do seu DNA centromérico [3].

Nos eucariotos superiores, os genes dos RNAs ribossômicos encontram-se organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S (18S + 5,8S + 28S) e DNAr 5S. Ambas famílias são compostas por unidades repetidas em tandem, com centenas a milhares de cópias. Cópias múltiplas do DNAr 45S correspondem às regiões organizadoras de nucléolos ou RONS [22]. Embora as RONS tenham uma localização freqüente nas regiões teloméricas dos cromossomos de peixes, elas apresentam uma grande variabilidade nesse grupo, tanto em relação à posição, número e tamanho dos cistrons [7, 23]. A análise comparativa entre os sítios de DNAr 18S e as Ag-RONS mostraram uma boa correspondência em *H. malabaricus*. Os eventuais decréscimos no número das Ag-RONS, detectadas em alguns cariomorfos, podem ser atribuídas à uma atividade gênica diferencial entre os sítios de DNAr 18S presentes nas células, visto que as Ag-RONS representam apenas aqueles cistrons que se mostraram

ativos na interfase precedente [24, 25]. Ao lado de alguns cromossomos marcadores exclusivos para cada cariomorfo, cromossomos correspondentes puderam ser também observados, como é o caso do metacêntrico no. 5 (cariomorfos A-D) e dos submetacêntricos nos. 18 (cariomorfos A e B) e 15 (cariomorfos C e D). Estes dois últimos, embora ocupando uma posição cariotípica distinta entre os cariomorfos, devem corresponder ao mesmo cromossomo, não somente pela forma e tamanho que apresentam, mas também pelo compartilhamento de um sítio de 5SHindIII-DNA. Por sua vez, nos cariomorfos C-D, o metacêntrico no. 5 evidenciou um único sítio de DNAr 18S. Nos cariomorfos A-B esse cromossomo apresentou RONS biteloméricas, indicando que eventos adicionais ocorreram possibilitando a aquisição de novos sítios de DNAr (**Figura 5**). É interessante notar que a presença de RONS biteloméricas em *H. malabaricus* é relativamente freqüente nos cariomorfos A e B [6, 26-28].

Quando comparado ao DNAr 18S e 5SHindIII-DNA, o DNAr 5S mostrou-se um marcador mais específico, uma vez que cromossomos correspondentes não foram encontrados nos quatro cariomorfos, além de sítios exclusivos para os cariomorfos A e C. Assim sendo, parece que a diferenciação cariotípica no Grupo I não reteve nenhuma característica basal no tocante a esse marcador cromossômico. Neste contexto, o DNAr 5S parece ter passado por modificações cariotípicas mais acentuadas do que o DNAr 18S e 5SHindIII-DNA, pois apenas os cariomorfos evolutivamente mais relacionados, ou seja, A-B e C-D, evidenciaram cromossomos correspondentes. Coincidentemente, os sítios de DNAr 5S se

mostraram bons marcadores populacionais em *H. malabaricus*, mostrando diferenças significativas mesmo entre populações de um mesmo cariomorfo [5].

Genes de RNAr 5S são geralmente encontrados em uma posição intersticial nos cromossomos da maioria das espécies de peixes [29], bem como em outros vertebrados [30-33], sugerindo que tal padrão de distribuição não deve ser casual. Além disso, a sua localização cromossômica geralmente não é sintênica com os sítios de DNAr 45S. Embora nas populações presentemente analisadas a localização dos sítios de DNAr 18S e 5S foram sempre independentes, a ocorrência de sintenia já foi claramente evidenciada em uma população do cariomorfo A [5], destacando novamente o comportamento dinâmico do DNAr ao longo do processo de evolução cariotípica de *H. malabaricus*. Regiões teloméricas seriam mais propícias à transferência de material genético entre os cromossomos, devido à suas maiores proximidades no interior do núcleo interfásico [34]. Tal fato poderia estar associado à maior conservação numérica dos sítios de DNAr 5S em relação aos sítios de DNAr 18S nos peixes, possivelmente devido de uma localização preferencial nas regiões intersticiais e teloméricas dos cromossomos, respectivamente [29].

No que se refere aos sistemas de cromossomos sexuais, a distribuição do 5S*Hind*III-DNA e do DNAr 18S também indicam uma possível correspondência entre alguns cromossomos dos cariomorfos A e C, com os cromossomos sexuais presentes nos cariomorfos B e D, respectivamente. Tal é o caso do cromossomo no. 21 do cariomorfo A, que compartilha sítios de DNAr 18S e 5S*Hind*III-DNA com os cromossomos X e Y do cariomorfo B, além de mostrar uma acentuada similaridade em relação ao tamanho e a morfologia do cromossomo Y (**Figura 5**).

Da mesma forma, o cromossomo no. 11 do cariomorfo C mostra-se similar ao cromossomo X_1 do cariomorfo D, compartilhando a localização física de um sítio de DNAr 18S, bem como a correspondência entre regiões CMA_3 positivas (dados não mostrados). É provável que a diferenciação do sistema XX/XY do cariomorfo B tenha ocorrido a partir de um processo de heterocromatinização. Este resultou em um grande cromossomo X subtelocêntrico, com um bloco conspícuo de heterocromatina nos braços longos, co-localizado com um sítio de RON apresentando um comportamento polimórfico [26]. Por outro lado, um evidente processo de translocação mostrou-se associado com a origem do sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ do cariomorfo D, resultando no grande cromossomo Y presente apenas nos machos e a conseqüente redução do número diplóide neste sexo [35-36]. Os resultados apresentados sugerem que cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D foram derivados dos cromossomos 21 e 11 dos cariomorfos A e C, respectivamente. Estudos complementares estão em andamento, com a inclusão de outros marcadores cromossômicos, objetivando uma análise conclusiva quanto ao processo de evolução dos sistemas de cromossomos sexuais em *H. malabaricus*.

Conclusão

Os DNAs repetitivos mostraram-se importantes no processo de evolução genômica de *H. malabaricus*, conforme evidenciado pela presença e distribuição destas seqüências nos cromossomos. Os resultados ora obtidos deram suporte adicional à proposta do Grupo I como representativo de cariomorfos proximamente relacionados, e sugeriram uma maior proximidade evolutiva entre

os cariomorfos A-B e os cariomorfos C-D, bem como a provável origem dos sistemas XY e X_1X_2Y dos cariomorfos B e D, respectivamente.

Contribuições dos Autores

MBC realizou as análises citogenéticas e escreveu o manuscrito. CM auxiliou nas análises citogenéticas e escreveu o manuscrito. LACB planejou e coordenou o estudo, escreveu e revisou o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Drs. Liano Centofante e Jorge A. Dergam e ao MSc. Uédson Jacobina, pelo fornecimento de amostras de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - proc. No. 2007/05565-5) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências Bibliográficas

1. Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: **A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.** *Chromosome Res* 2000, **8**:603–613.
2. Dergam JA, Suzuki HI, Shibatta OA, Silva LFD, Júlio HF, Caetano LG, Black WC: **Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus***

- (Erythrinidae, Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná rivers. *Genet Mol Biol* 1998, **21**:493-496.
3. Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: **A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA.** *Genetica* 2006, **127**:133-141.
 4. Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C: **Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus*' species complex.** *Cytogenet Genome Res* 2007, **118**:78-83.
 5. Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: **Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs.** *Cytogenet Genome Res* 2009, **125**:132-141.
 6. Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: **Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins.** *Genet Mol Biol* 2005, **28**:103-110.
 7. Almeida-Toledo LF: **Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes.** In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edited by Malabarba LR, Reis RE, Vari, RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. Porto Alegre: Edipucrs; 1998:583-588.
 8. Jesus CM, Galetti Jr PM, Valentini SR, Moreira-Filho O: **Molecular and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus***

- lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 2003, **118**:25-32.
9. Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: **Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae***. *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**:67–72.
 10. Biemont C, Vieira C: **Junk DNA as an evolutionary force**. *Nature* 2006, **443**: 521–524.
 11. Singer MF: **Highly repetitive sequences in mammalian genomes**. *Int Rev Cytol* 1982, **76**:67-112.
 12. Hummel S, Meyerhohf W, Korge E, Knochel W: **Characterization of highly and moderately repetitive 500 bp EcoRI fragments from *Xenopus laevis* DNA**. *Nucleic Acids Res* 1984, **12**: 4921-4937.
 13. Haaf T, Schmid M: **Chromosome topology in mammalian interphase nuclei**. *Exp Cell Res* 1991, **192**: 325-332.
 14. Larin Z, Fricker MD, Tyler-Smith C: **De novo formation of several features of a centromere following introduction of an Y alphoid YAC into mammalian cells**. *Hum Mol Genet* 1994, **3**: 689-695.
 15. Clabby C, Goswami U, Flavin F, Wilkins NP, Houghton JA, Powell R: **Cloning, characterization and chromosomal location of a satellite DNA from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas***. *Gene* 1996, **168**:205-209.
 16. Oliveira C, Wright JM: **Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)**. *Chromosome Res* 1998, **6**:205-211.

17. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae).** *Brazil J Genet* 1978, **1**:103-120.
18. Pinkel D, Straume T, Gray J: **Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:2934–2938.
19. Howell WM, Black DA: **Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method.** *Experientia* 1980, **36**:1014-1015.
20. Levan A, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, **52**:201-220.
21. Henikoff S, Ahmad K, Malik HS: **The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA.** *Science* 2001, **293**:1098–1102.
22. Long EO, Dawid ID: **Repeated genes in eukaryotes.** *Ann Rev Biochem* 1980, **49**: 727-764.
23. Galetti Jr PM: **Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies.** *Ital J Zool* 1998, **65**(Suppl): 53-65.
24. Hsu TC, Spirito SC, Pardue ML: **Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes.** *Chromosoma* 1975, **53**:25-33.
25. Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller OJ: **Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells.** *Exp Cell Res* 1976, **101**:235-243.
26. Bertollo LAC: **The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*.** *Cytologia* 1996, **61**:75-81.

27. Born GG, Bertollo LAC: **An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome.** *Chromosome Res* 2000, **8**:111-118.
28. Born GG, Bertollo LAC: **Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with 2n = 42 chromosomes.** *Genetica* 2001, **110**:1-9.
29. Martins C, Galetti Jr PM: **Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes).** *Chromosome Res* 1999, **7**:363-367.
30. Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I, Barsacchi-Pilone G: **Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians.** *Chromosoma* 1982, **84**: 475-491.
31. Schmid M, Vitelli L, Batistoni R: **Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae.** *Chromosoma* 1987, **95**:271-284.
32. Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F: **Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians.** *Genome* 1993, **36**:762-773.
33. Mäkinen A, Zijlstra C, de Haan NA, Mellink CHM, Bosma AA: **Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization.** *Cytogenet Cell Genet* 1997, **78**:231-235.
34. Schweizer D, Loidl J: **A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns.** *Chromosomes Tod* 1987, **9**:61-74.

35. Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: **The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding.** *Chromosome Res* 1997a, **5**:493-499.
36. Bertollo LAC, Mestriner CA: **The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses.** *Chromosome Res* 1998, **6**:141-147.

Tabelas

Tabela 1. Cariomorfos previamente identificados em *Hoplias malabaricus*, de acordo com Bertollo et al. (2000).

Cariomorfos	Números Cromossômicos	Cromossomos Sexuais	Ocorrência geográfica
Grupo I: Primeiros pares cromossômicos com tamanhos similares			
Cariomorfo A	2n = 42	-	Nordeste ao Sudeste do Brazil, Uruguai e Nordeste da Argentina
Cariomorfo B	2n = 42	XX/XY	Vale do Rio Doce (estado de Minas Gerais) e rio Iguazú (estado do Paraná, Brasil)
Cariomorfo C	2n = 40	-	Nordeste do Brazil ao Nordeste da Argentina
Cariomorfo D	♀ 2n = 40 / ♂ 2n = 39	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ Y	Bacia hidrográfica do Alto Paraná, Brasil
Grupo II: Primeiros pares cromossômicos com tamanhos distintos			
Cariomorfo E	2n = 42	-	Rio Trombetas (estado do Paraná, Brasil)
Cariomorfo F	2n = 40	-	Do Suriname ao Sudeste do Brasil
Cariomorfo G	♀ 2n = 40 / ♂ 2n = 41	XX/XY ₁ Y ₂	Rios Amazônicos, Brasil

Tabela 2. Espécimes de *Hoplias malabaricus* com os respectivos locais de coletas, cariomorfos e o número de exemplares.

Localidade	Cariomorfo	N
Descalvado (SP) – rio do Pântano	A	8♂ 6♀
Parque Florestal do Rio Doce (MG) – lagoas: rio Doce	B	5♂ 6♀
Poconé (MT) – lagoas: rio Bento Gomes	C	5♂ 8♀
São Carlos (SP) – reservatório da UFSCar: ribeirão Monjolinho	D	10♂ 7♀

SP = São Paulo, MT = Mato Grosso, e MG = Estado de Minas Gerais.

Figuras

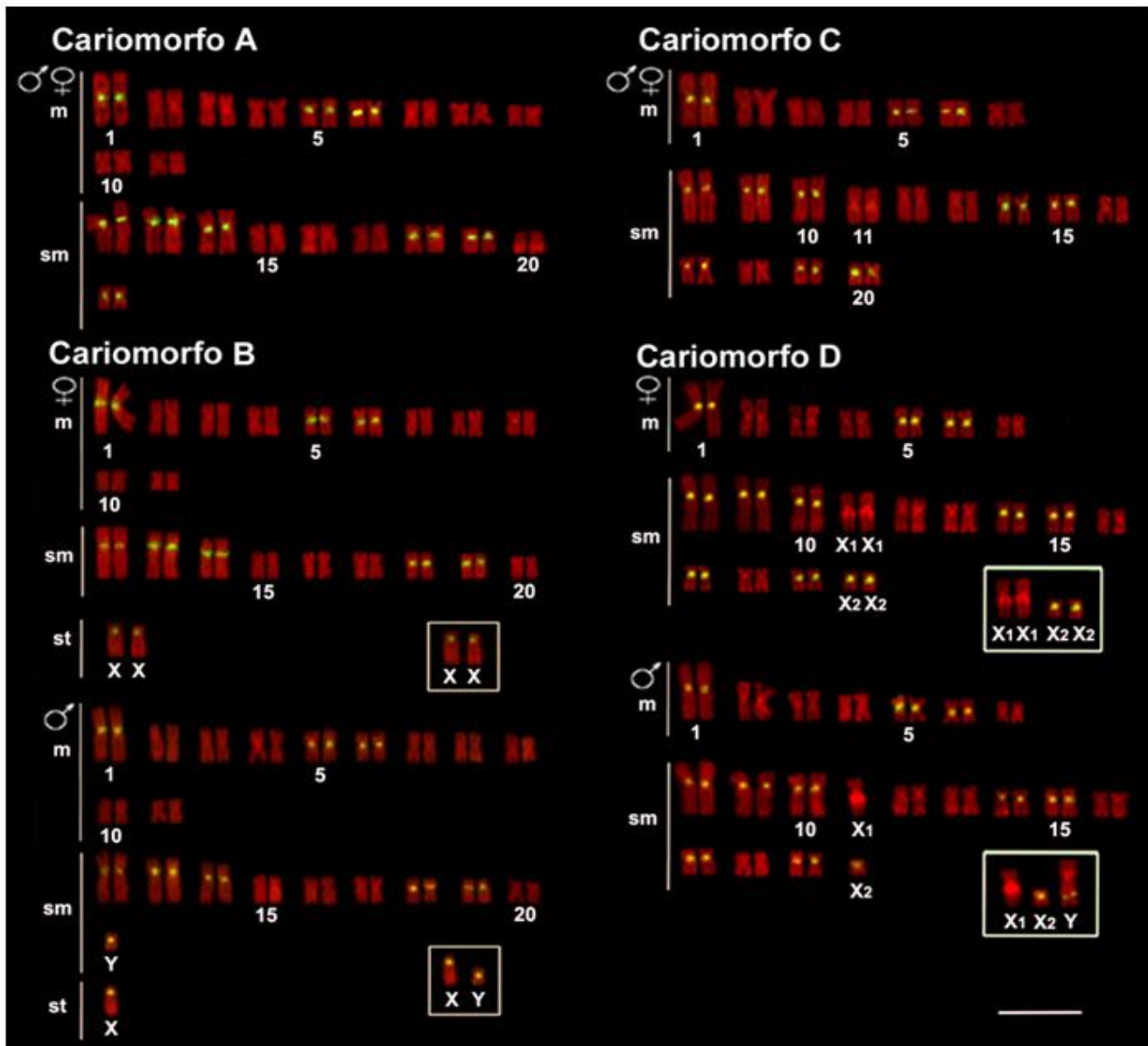


Figura 1 – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNA satélite 5SHindIII nos cromossomos (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 µm.

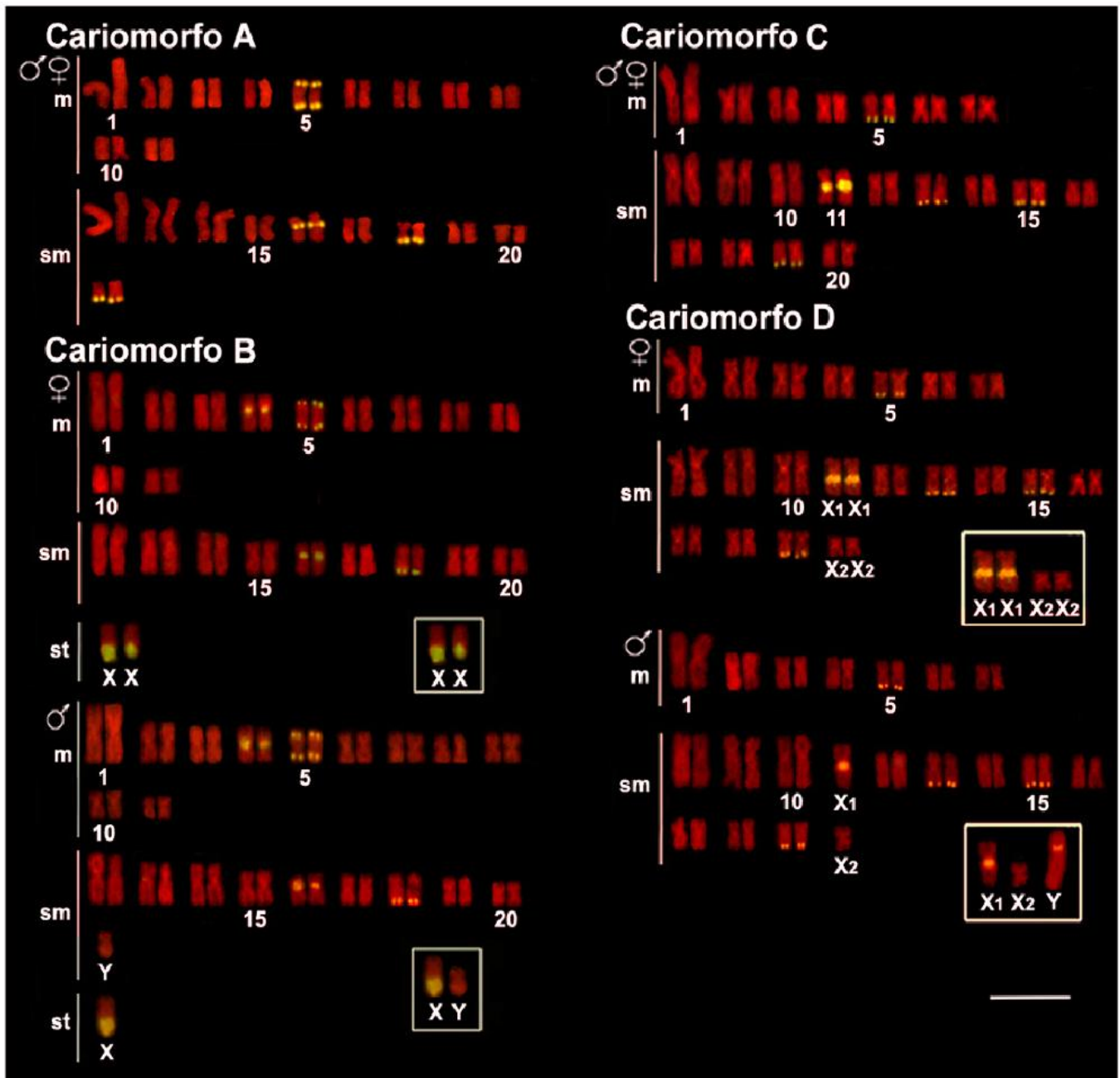


Figura 2 - Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNAr 18S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 μ m.

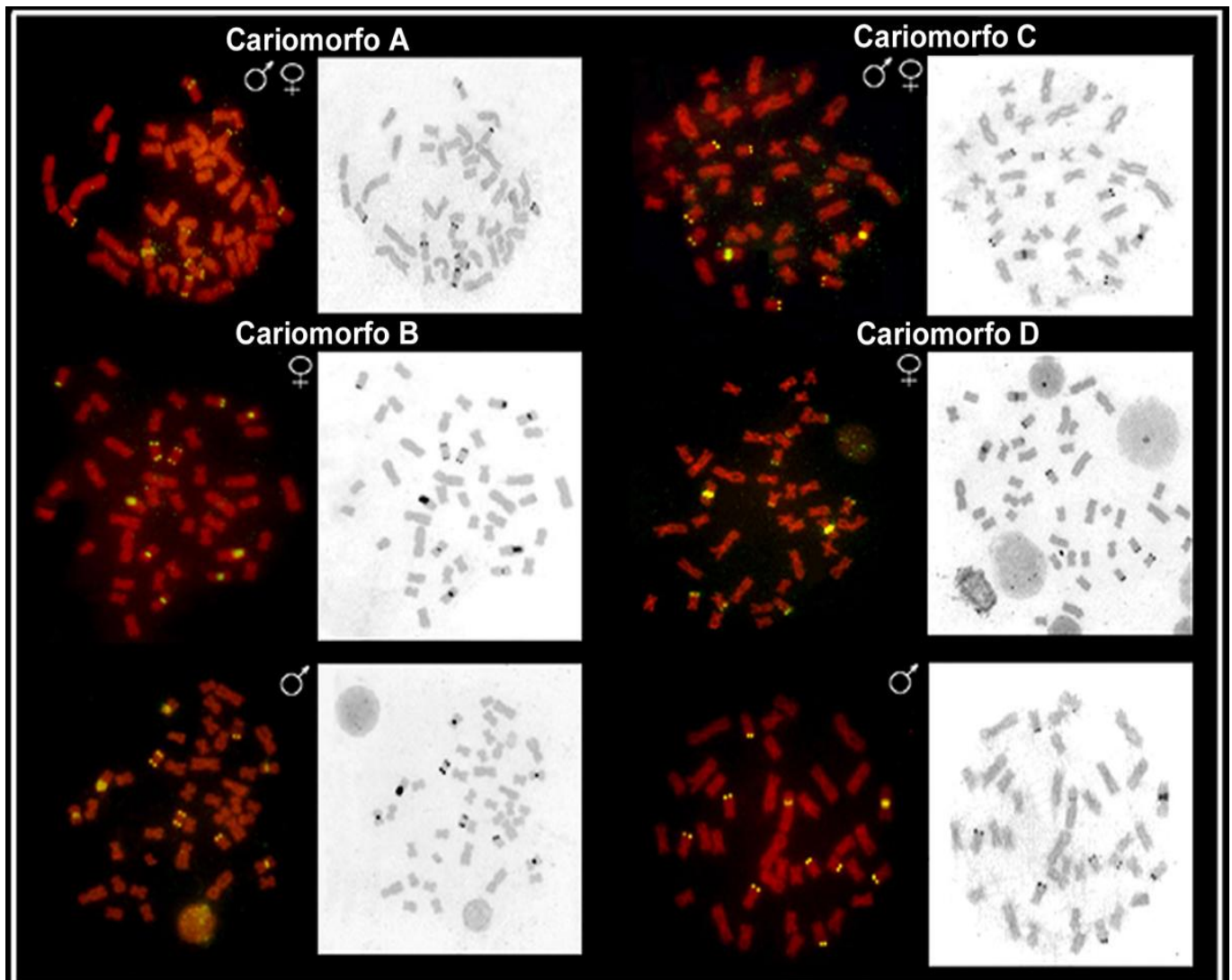


Figura 3 – Cromossomos metafásicos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D), apresentando análise seqüencial dos sítios de DNAr 18S e de Ag-RONs. Observar a correspondência geral entre o número e a localização dos cistrons de DNAr 18S e das Ag-NORs.

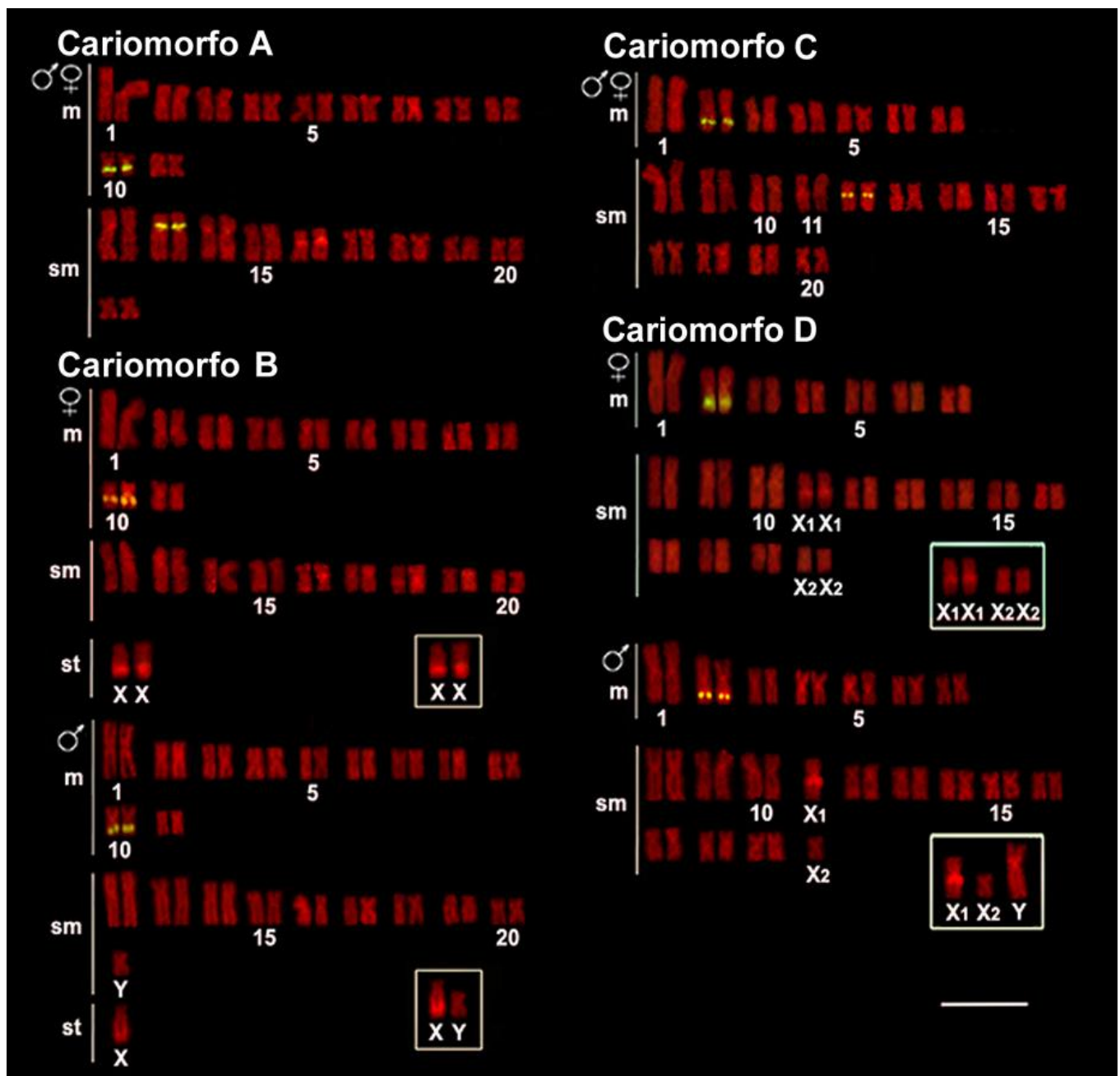


Figura 4: Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfos A-D) apresentando os sítios de DNAr 5S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D estão destacados. Barra = 5 μm.

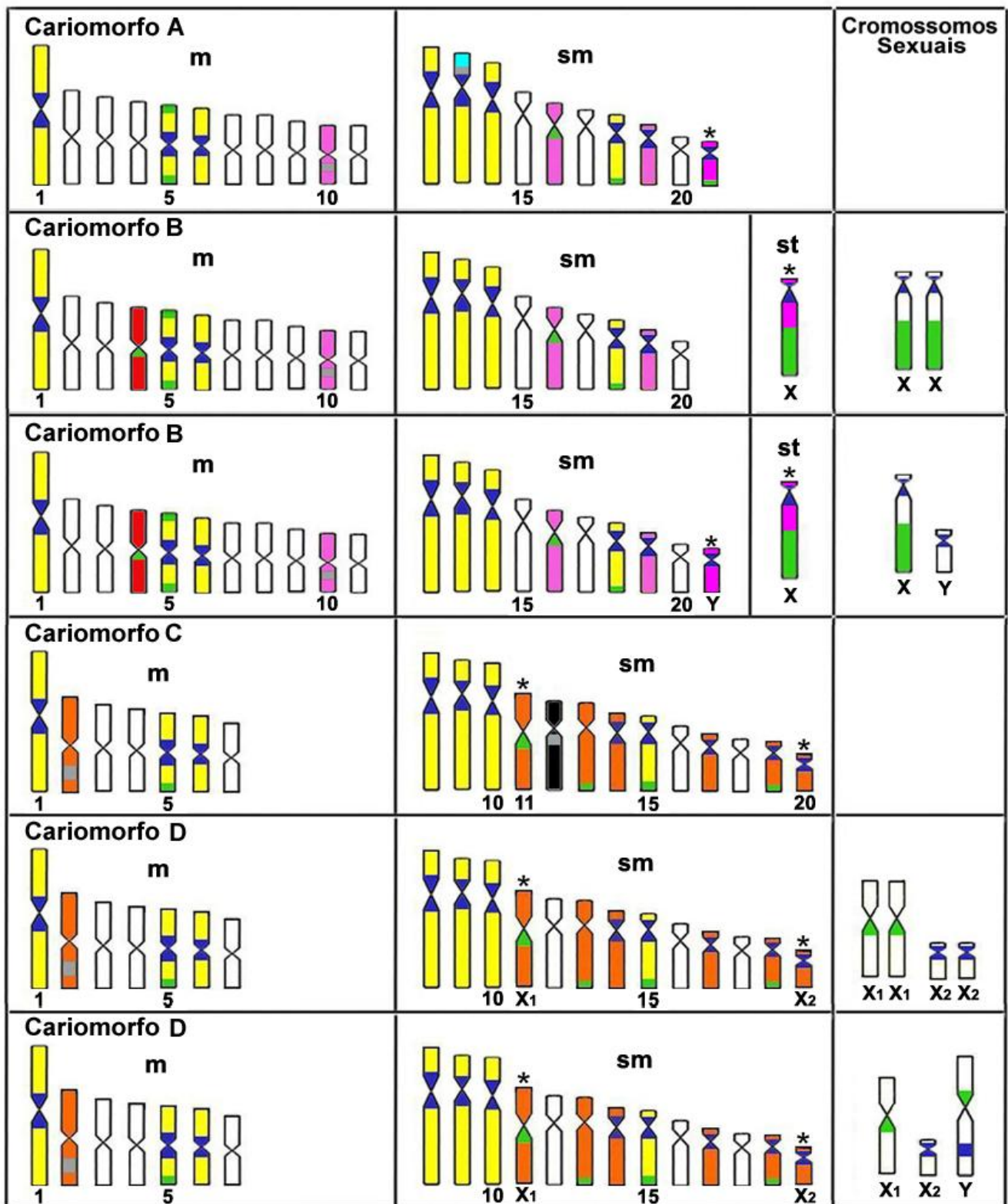


Figura 5 - Idiograma representativo dos cariomorfos A-D de *Hoplias malabaricus*, com base nas seqüências dos DNAs repetitivos analisados. A localização dos sítios de DNA satélite 5SHindIII, DNAr 18S e DNAr 5S nos *(continua na próxima página)*

cromossomos está indicada em azul escuro, verde e cinza, respectivamente. Em amarelo encontram-se indicados os cromossomos correspondentes dos cariomorfos A-B-C-D; em rosa os cromossomos correspondentes apenas para os cariomorfos A-B e em laranja aqueles correspondentes apenas para os cariomorfos C-D. Os cromossomos que são exclusivos dos cariomorfos A, B e C encontram-se indicados em azul claro, vermelho e preto, respectivamente. Os asteriscos indicam prováveis relações entre os cromossomos sexuais dos cariomorfos B e D, com alguns pares autossômicos dos cariomorfos A e C, respectivamente.

Cariomorfos	Cromossomos correspondentes	Cromossomos específicos
A - B - C - D	1 - 5 - 6 $\left\{ \begin{array}{l} 12 - 13 - 14 - 18 \text{ (A - B)} \\ 8 - 9 - 10 - 15 \text{ (C - D)} \end{array} \right\}$	
A - B	10 - 16 - 19 $\left\{ \begin{array}{l} 21 \text{ (A)} \\ X - Y \text{ (B)} \end{array} \right\}$	
C - D	2 - 13 - 14 - 17 - 19 $\left\{ \begin{array}{l} 11 - 20 \text{ (C)} \\ X_1 - X_2 \text{ (D)} \end{array} \right\}$	
A		13(p)
B		4
C		12

Figura 6 - Pares cromossômicos portadores de sítios de DNAs repetitivos com correlações ou especificidades entre os cariomorfos de *Hoplias malabaricus*. Os cromossomos entre chaves são identificados de acordo com suas posições nos cariótipos.

4.2 Capítulo II

Variabilidade cromossômica entre populações alopátricas do peixe eritrínídeo *Hoplias malabaricus*: mapeamento de três classes de DNAs repetitivos.

Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal Variability Among Allopatric Populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of Three Classes of Repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research** 125: 132-141 (2009).

Resumo

O cariótipo e as características cromossômicas de três populações alopátricas de *Hoplias malabaricus*, táxon citogeneticamente mais estudado dentro de Erythrinidae, foram investigados utilizando diferentes métodos de coloração (bandamentos C-, Ag-, e CMA₃) bem como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detectar os sítios de DNAr 18S, DNAr 5S e do DNA satélite 5SHindIII. O isolamento, a clonagem e caracterização de uma sonda de DNAr 18S, a partir do genoma de *H. malabaricus*, também foram realizadas pela primeira vez com o intuito de se desenvolver uma sonda mais específica. As três populações, nomeadas PR, CR, e DR, mostraram cariótipos idênticos, com $2n = 42$ cromossomos compostos por 11 pares m e 10 pares sm, sem cromossomos sexuais heteromórficos, o que caracterizam essas populações como pertencentes ao cariomorfo A. Em todas as populações a heterocromatina C-positiva foi localizada nas regiões centroméricas/pericentroméricas dos cromossomos, bem como na região telomérica de vários pares. Um conspícuo bloco heterocromático proximal, situado nos braços longos do par nº16, foi o único segmento GC-rico nos cariótipos. O satélite 5SHindIII-DNA foi sempre localizado na região centromérica de vários cromossomos. Os sítios de DNAr 18S foram situados nas regiões teloméricas ou centroméricas, enquanto que o DNAr 5S mostrou uma localização intersticial ou proximal em alguns pares. Vários cromossomos portadores destas seqüências de DNA repetitivos foram compartilhados pelas 3 populações, além de alguns cromossomos marcadores exclusivos. Neste sentido, a população CR foi a mais diferenciada, incluindo uma condição sintênica para a

sondas de DNAr 18S e 5S, como confirmado por dupla FISH. Assim, apesar de estarem incluídas em um mesmo grupo cariotípico, as distintas populações não podem ser consideradas uma unidade evolutiva, tendo em vista as diferenciações cromossômicas particulares que já apresentam.

Abstract

Karyotype and chromosomal characteristics from 3 allopatric populations of *Hoplias malabaricus*, cytogenetically most studied Erythrinidae taxon, were investigated using different staining techniques (C-, Ag-, and CMA₃ banding) as well as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to detect 18S rDNA, 5S rDNA, and 5SHindIII satellite DNA sites. The isolation, cloning and characterization of an 18S rDNA probe from *H. malabaricus* genome were also performed for the first time in order to develop a more specific probe. The 3 populations, named PR, CR, and DR, showed identical karyotypes, with $2n = 42$ chromosomes composed of 11 m pairs and 10 sm pairs, without heteromorphic sex chromosomes, which characterize the populations as belonging to karyomorph A. In all populations C-positive heterochromatin was situated in the centromeric/pericentromeric regions of the chromosomes, as well as in the telomeric region of several pairs. A conspicuous proximal heterochromatic block on the long arms of pair No. 16 was the only GC-rich segment in the karyotypes. 5SHindIII satellite DNA was always mapped in the centromeric region of several chromosomes. The 18S rDNA sites were situated on the telomeric or centromeric regions, whereas the 5S rDNA showed an interstitial or proximal location in some pairs. Several chromosomes bearing these repetitive DNA sequences were shared by the three populations, alongside with some exclusive chromosomal markers. In this sense, population CR was the most differentiated one, including a syntenic condition for the 18S and 5S rDNA probes, as confirmed by double FISH. Thus, despite their inclusion in a same major karyotypic group, the distinct populations cannot be considered an

absolute evolutionary unit, as evidenced by their inner chromosomal differentiations.

Introdução

Os peixes eritrínídeos (Characiformes) possuem uma ampla distribuição geográfica em toda a América do Sul, e são encontrados nas principais bacias hidrográficas do Brasil. Três gêneros, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, são reconhecidos nesta família. O gênero *Hoplias* é o mais amplamente distribuído, ocorrendo em uma variedade de latitudes, incluindo Suriname, Argentina, e o Uruguai. *H. malabaricus*, táxon citogeneticamente mais estudado, mostra uma conspícua diversificação cariotípica, com sete cariomorfos (A-G) identificados, que são facilmente distinguíveis no que se refere à forma, tamanho, ou número cromossômico e a presença de sistemas de cromossomos sexuais, sugerindo a ocorrência de distintas espécies [Bertollo et al., 1986, 2000].

O cariomorfo A é caracterizado por um $2n=42$ com cromossomos meta-submetacêntricos sem cromossomos sexuais heteromórficos, sendo distribuído do nordeste ao sudeste do Brasil, atingindo o Uruguai e a Argentina [Bertollo et al., 2000]. Dois estudos prévios mostraram que algumas populações desse cariomorfo podem diferir em relação à distribuição da heterocromatina e dos sítios de RON (regiões organizadoras de nucléolos), provavelmente devido aos seus isolamentos geográficos [Born & Bertollo, 2001; Vicari et al., 2003].

Este estudo apresenta uma análise cromossômica comparativa entre três populações alopátricas pertencentes ao cariomorfo A, utilizando distintos métodos de coloração (bandamento C, $AgNO_3$ e Cromomicina A_3) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAs repetitivos (DNAr 5S, DNAr 18S e o satélite 5SHindIII-DNA). Esta abordagem possibilitou uma caracterização

cariotípica mais detalhada entre as populações, evidenciada pela distribuição das seqüências de DNAs repetitivos nos cromossomos.

Material e Métodos

Espécimes e Preparação Cromossômica

Amostras de *Hoplias malabaricus* foram obtidas a partir de distintas bacias hidrográficas brasileiras. Três populações foram analisadas, nomeadas PR (rio do Pântano), CR (rio Cuiabá) e DR (rio Doce), como especificado na tabela 1 e figura 1. Os espécimes foram previamente depositados na coleção de peixes do laboratório de Citogenética, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de uma suspensão celular do rim anterior, utilizando o método convencional de *air-drying* [Bertollo et al., 1978].

Coloração Cromossômica

Adicionalmente à coloração Giemsa convencional, os cromossomos foram analisados após a impregnação com o nitrato de Prata [Howell & Black, 1980], para visualizar as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs). O bandamento C foi também aplicado para a detecção das heterocromatinas C-positivas [Sumner, 1972] e a coloração com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃) foi utilizado para a identificação das regiões GC-ricas nos cromossomos [Sola et al., 1992].

Sondas

Três seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus*, foram utilizadas. A primeira sonda incluiu cópias repetidas de DNAr 5S, contendo 120 pares de bases (pb) do gene codificante (DNAr 5S) e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS). A segunda sonda incluiu cópias da seqüência de DNA satélite 5SHindIII-DNA com 360 pb, contendo um segmento com 95 pb, com similaridade ao gene de RNAr 5S, e um segmento com 265 pb similar ao NTS da primeira sonda. As sondas de DNAr 5S e o satélite 5SHindIII-DNA foram previamente clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em *Escherichia coli* DH5 α [Martins et al. 2006]. A terceira sonda incluiu um segmento de 1.400 pb do gene de RNAr 18S, obtido por PCR a partir do DNA nuclear de *H. malabaricus* usando os primers 18SF (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3') e 18SR (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3'), construídos a partir do gene completo de RNAr 18S do peixe *Ictalurus punctatus* (número de acesso ao GenBank AF021880). Os produtos de PCR (aproximadamente 1.400 pb) foram visualizados em um gel de agarose 1%.

A banda de DNA foi isolada a partir do gel, purificada com o kit Sephaglas Band Prep (Pharmacia Biotech), ligada com o plasmídio pGEM-T (Promega), o qual foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen). Os clones obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer), com o kit de reação ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Perkin-Elmer). As seqüências nucleotídicas foram submetidas ao Blastn [Altschul et al. 1990] e encaminhadas ao National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),

para a identificação de similaridades da seqüência isolada com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank.

Hibridização Cromossômica e Análises Cariotípicas

O processo de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizado de acordo com Pinkel et al. [1986]. As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por nick translation, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labeling System, Invitrogen). A detecção e amplificação dos sinais de hibridização foram realizadas utilizando avidina-FITC conjugada e anti-avidina-biotina conjugada (Sigma). Os cromossomos foram contracorados com iodeto de propídio (50µg/mL) e analisados em um microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As imagens foram capturadas utilizando o programa CoolSNAP-Pro (Media Cybernetic). Para a dupla FISH, a sonda de DNAr 18S foi marcada com biotina, como descrito previamente, enquanto que a sonda de DNAr 5S foi marcada com FluoRed dUTP-rhodamina conjugada (Roche), de acordo com especificações do fabricante. Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0.3 µg/ml).

Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas por espécime para a determinação do número cromossômico diplóide e a estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm) de acordo com a relação de braços [Levan et al., 1964].

Resultados

Cariótipos, Bandeamento-C e Coloração com Cromomicina A₃

As 3 populações apresentaram cariótipos idênticos, invariavelmente compostos por $2n=42$ cromossomos em ambos os sexos, com 11 pares m e 10 pares sm, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (**fig. 2**). Bandas heterocromáticas C-positivas foram observadas na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos, assim como na região telomérica de vários pares do cariótipo (**fig. 2**). Em todas as populações, um bloco heterocromático proximal mais conspícuo, situado nos braços longos do par No. 16, foi o único segmento GC-rico observado (**fig. 3**).

Seqüência Nucleotídica

A seqüência de nucleotídeos foi determinada para os clones de DNAr obtidos de *H. malabaricus*, que confirmou que o fragmento de DNA isolado por PCR corresponde a cópias do gene de RNAr 18S. Essa seqüência foi depositada no GenBank com o número de acesso FJ577367.

Mapeamento Cromossômico das Seqüências de 5SHindIII-DNA, DNAr 5S e DNAr 18S, e Coloração Ag-RON.

As seqüências de 5SHindIII-DNA foram mapeadas na região centromérica de vários cromossomos. Espécimes das populações PR e DR apresentaram 18 sítios distribuídos em três pares m (n^{os}. 1, 5, e 6) e em 6 pares sm (n^{os}. 12, 13, 14, 18, 19, e 21). Os espécimes de população CR apresentaram um total de 22 sítios, 18 deles coincidentes com a distribuição observada nas populações PR e DR,

enquanto que os 4 sítios restantes foram localizados no par m nº.10 e no par sm nº. 20 (**figs. 4, 6**).

FISH utilizando a sonda de DNAr 5S demonstrou que o par m nº 10 possui um sítio intersticial nos braços longos, que é compartilhado entre as populações PR e DR. No entanto, um “cluster” exclusivo, mostrou-se presente na população PR, com uma localização proximal, nos braços curtos do par sm nº 13, assim como na população CR, com uma localização intersticial nos braços longos do cromossomo nº 16 (**figs. 4, 6**).

Sítios de DNAr 18S foram localizados nas regiões centroméricas e teloméricas ou em ambos os telômeros (sítios biteloméricos). As três populações compartilharam o par m nº 5 com sítios biteloméricos, e o par sm nº 16 com sítios proximais nos braços longos. Por outro lado, os pares sm nºs. 18 e 21, com sinais nos telômeros dos braços longos, foram apenas compartilhados pelas populações PR e CR, e pelas populações PR e DR, respectivamente (**figs. 5, 6**). Além disso, análises de dupla FISH demonstraram que a população CR apresentou uma sintenia exclusiva para os loci de DNAr 18S e 5S no cromossomo sm nº 16 (**fig. 3**). Todas as Ag-RONs detectadas foram coincidentes com os sítios de DNAr 18S (**fig. 5**).

Discussão

Várias populações de *H. malabaricus* têm sido analisadas citogeneticamente ao longo de toda distribuição geográfica da espécie. Até agora, sete cariomorfos (A-G) foram facilmente discriminados, três deles (B, D e G) com distintos sistemas de cromossomos sexuais [Bertollo et al, 1983; Dergam e Bertollo, 1990; Bertollo

et al., 1997a, b; Bertollo e Mestriner, 1998; Born e Bertollo, 2000], aparentando caracterizar cariótipos espécie-específicos.

As três populações analisadas pertencem ao cariomorfo A, apresentando um número diplóide $2n=42$ e um cariótipo com 22 m e 20 sm, sem cromossomos sexuais heteromórficos. Esta composição cariotípica semelhante indica uma estreita relação entre as populações, o que é também reforçado por uma distribuição semelhante das regiões heterocromáticas nos cromossomos, sem diferenças conspícuas. De fato, bandas heterocromáticas C-positivas foram sempre localizadas na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos e na região telomérica de alguns pares, além da presença de Ag-RONs múltiplas. Estas características se enquadram nos padrões gerais de distribuição desses marcadores, já documentados para outras populações ou cariomorfos de *H. malabaricus* [Dergam & Bertollo, 1990; Haaf et al., 1993; Bertollo, 1996; Bertollo et al., 1997 a,b; Born & Bertollo, 2000, Vicari et al., 2003, 2005]. O conjunto das similaridades encontradas indica que as três populações possuem uma estreita relação de proximidade, pertencendo a um mesmo cariomorfo, apesar das diferentes bacias hidrográficas de origem.

Entre os peixes Eritrinídeos, uma classe de DNA repetitivo nomeada 5S*Hind*III-DNA, que compartilha similaridades com repetições de DNAr 5S, foi previamente isolada e caracterizada a partir do genoma da *H. malabaricus* [Martins et al., 2006]. Essa seqüência está localizada na região centromérica de vários cromossomos e não é compartilhada por outros gêneros de Erythrinidae, sendo exclusiva desta espécie [Ferreira et al., 2007]. Neste estudo, o mapeamento físico desta seqüência repetitiva demonstrou que três pares m e seis pares sm

foram compartilhados entre as populações, reforçando suas relações cariotípicas. No entanto, a população CR foi diferenciada das populações PR e DR pela presença de dois sítios adicionais, um localizado em um par m e o outro em um par sm. Estes sítios exclusivos na população CR são de especial importância no que se refere à diferenciação cariotípica, considerando que as três populações pertencem a um mesmo cariomorfo e este DNA satélite é específico para *H. malabaricus*. Assim, diferenciações cromossômicas relacionadas a este DNA altamente específico já foram fixadas entre estas populações.

H. malabaricus possui regiões organizadoras de nucléolos múltiplas, frequentemente localizadas nas regiões teloméricas. Tal fato foi também observado nas populações agora analisadas, com exceção do par cromossômico nº16, onde as RONS apresentam uma localização proximal nos braços longos. Nos peixes e anfíbios os clusters de DNAr 18S podem ser também identificados pelos fluorocromos GC específicos, como a CMA₃ ou a mitramicina, os quais se ligam à cromatina GC-rica associada ao DNAr desses grupos [Mayr et al., 1985; Amemiya & Gold, 1986; Schmid & Guttenbach, 1988]. Coincidentemente, o par cromossômico nº16 foi o único a exibir uma região de DNA GC-rica no cariótipo, coincidindo com um sítio de RON e uma conspícua banda heterocromática C-positiva. Esse par cromossômico parece ser uma característica fixada em *H. malabaricus*, sendo que já foi caracterizado como polimórfico em algumas outras populações do cariomorfo A devido às variações na quantidade de heterocromatina GC-rica e na quantidade de clusters de DNAr 18S [Vicari et al., 2005]. Além da seqüência 5SHindIII-DNA, as seqüências de DNAr 18S reforçaram as relações cariotípicas as entre as populações PR, CR e DR. A maioria dos

cromossomos que possuem estes sítios foi compartilhada entre as populações, destacando o par m nº 5, que possui RONS biteloméricas. No entanto, cromossomos parcialmente compartilhados também foram identificados, uma vez que os pares marcadores sm nºs. 18 e 21 foram identificados apenas nas populações PR e CR, e nas populações PR e DR, respectivamente. A análise comparativa seqüencial revelou que, em geral, houve uma perfeita correlação entre o número e localização dos sítios de DNAr 18S e Ag-RONS, exceto para a população DR, indicando que alguns sítios de DNAr 18S provavelmente não estavam ativos na intérfase precedente [Miller et al., 1976].

Os genes de RNAr 5S ocorrem tipicamente na região intersticial dos cromossomos na maioria das espécies de peixes, bem como de mamíferos e anfíbios [Vitelli et al., 1982; Schmid et al., 1987; Lucchini et al., 1993; Mellink et al., 1996; Mäkinen et al., 1997], indicando ser uma característica relativamente conservada e sugerindo alguma vantagem relacionada à organização desses genes no genoma dos vertebrados [Martins e Galetti Jr., 1999]. Do mesmo modo, todos os sítios de DNAr 5S foram localizados intersticialmente nas populações PR, CR e DR, embora evidenciando diferenças no que diz respeito ao número e localização destes sítios. De fato, apenas população PR apresentou dois pares cromossômicos portadores dos genes DNAr 5S, compartilhando um par com população DR. Os outros sítios foram exclusivos para cada população.

Martins e Galetti Jr. [2000], propuseram que a localização dos sítios de DNAr 18S e 5S em cromossomos diferentes, como observado para a maioria dos vertebrados, poderia permitir uma evolução independente para esses locos, uma vez que as suas dinâmicas funcionais divergentes exigem uma distância física

entre eles. A localização divergente dos locos de DNAr 5S e das RONS parece ser, de fato, a situação mais comumente observada nos peixes, bem como em outros vertebrados [Lucchini et al., 1993; Suzuki et al., 1996]. No entanto, a dupla FISH com sondas de DNAr 18S e 5S evidenciou uma condição sintênica para estes “clusters” na população CR, com localização proximal e adjacente nos braços longos do par sm nº 16. Apesar da co-localização de ambos os genes de RNAr já ter sido encontrada em alguns grupos de peixes, como Siluriformes [Pendás et al., 1994; Mórán et al., 1996; Rossi & Gornung, 2005], Cypriniformes [Inafuku et al., 2000; Borón et al., 2006], e Characiformes [Jesus et al., 2003; Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Mantovani et al., 2005; Diniz et al., 2008], a população CR é a primeira a apresentar esta sintenia em *H. malabaricus*. Assim sendo, esta característica representa outra significativa diferenciação entre as três populações analisadas. Entretanto, esta condição não pode ser por ora considerada como um marcador cromossômico exclusivo para a população da bacia do rio Cuiabá (população CR), uma vez que poderia estar sendo também compartilhada com outras populações do mesmo ou de outros cariomorfos.

Os resultados obtidos com os diferentes DNAs repetitivos marcadores (5S*Hind*III-DNA, DNAr 18S e DNAr 5S) corroboraram as semelhanças entre as três populações analisadas, reforçando suas similaridades. No entanto, apesar do mapeamento físico dessas seqüências evidenciar vários cromossomos compartilhados, outros foram exclusivos para uma população específica, provavelmente em consequência de um fluxo gênico restrito entre elas. Essas populações pertencem a bacias hidrográficas distintas, isoladas por centenas de quilômetros (**fig. 1**), o que provavelmente contribuiu para a fixação das

diferenciações cromossômicas observadas. Neste sentido, a população CR emerge como a mais diferenciada das três populações, com quatro marcadores cromossômicos exclusivos nos pares n^{os}. 10, 16, 20, e 21. Völker et al. (2007), mostraram que a espécie *Chromaphyosemion bivittatum* (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), apresenta um baixo grau de diferenciações haplotípicas interpopulacionais, o que vai de acordo com a sua baixa divergência morfológica. No entanto, uma variabilidade cariotípica é observada dentro e entre as populações, que poderia indicar uma rápida evolução cromossômica. Também parece ser também o caso de *H. malabaricus*. Embora preservando um padrão cariotípico similar, é evidente que as distintas populações do cariomorfo A apresentam diferenciações cromossômicas particulares. Conforme indicado anteriormente, essas divergências podem se manifestar em termos estruturais, pelos padrões de bandas C e de RONS, bem como em termos funcionais, pela expressão diferencial das RONS [Vicari et al., 2005]. As evidências agora observadas, considerando os DNAs repetitivos, reforçam a proposta de que as distintas populações do cariomorfo A não podem ser consideradas como uma unidade evolutiva, apesar de estarem incluídas em um mesmo grupo cariotípico.

DNAs repetitivos, tais como o satélite 5S*Hind*III-DNA, foram por muito tempo considerados “DNA-lixo”, com nenhuma função claramente identificada, fato este reforçado pelas indicações de que estas seqüências não são transcritas nos eucariotos [Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980]. No entanto, dados acumulados em eucariotos de diversas origens taxonômicas, têm contestado esta visão ao longo dos últimos anos [Bonaccorsi & Lohe, 1991], suportando um importante papel dos DNAs repetitivos na evolução funcional e estrutural de

genes e de genomas, em uma variedade de organismos [Biémont & Vieira, 2006]. Embora mecanismos evolutivos tenham evitado grandes mudanças nos cariótipos de diferentes populações de um determinado cariomorfo de *H. malabaricus*, estes genomas estão em constante evolução, como demonstrado pelas variações cromossômicas observadas. Desta forma, a fração repetitiva do genoma (aqui exemplificada pelos DNA ribossomais e pelo satélite 5SHindIII-DNA) parece escapar da pressão seletiva que age nos segmentos não-repetitivos, representando bons marcadores evolutivos para detecção de eventos evolutivos recentes. Além disso, o acúmulo de seqüências repetitivas em áreas específicas do genoma pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos através de quebras, deleções, inversões e ampliações [Lim & Simmons, 1994; Maria et al., 1997]. A investigação de outras famílias de DNAs repetitivos nos Erythrinidae poderá propiciar uma maior compreensão dos mecanismos evolutivos basais, envolvidos na geração da complexa estrutura genômica dos peixes.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - proc. n. 2007/05565-5) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Os autores agradecem ao Drs. Roberto Ferreira Artoni e Marcelo Ricardo Vicari pela colaboração com o método de dupla FISH, e ao Dr. Jorge Dergam pelo fornecimento de espécimes.

Referências Bibliográficas

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410 (1990).
- Amemiya T, Gold JR: Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1986:226–231 (1986).
- Bertollo LAC: The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* 61:75-81 (1996).
- Bertollo LAC, Mestriner CA: The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Res* 6:141-147 (1998).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103-120 (1978).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia* 48:1-12 (1983).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM: Cytogenetics and taxonomy considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 28:153–159 (1986).
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* 5:493-499 (1997a).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS: Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n = 40 chromosomes. *Brazil J Genet* 20:237-242 (1997b).

- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613 (2000).
- Biémont C, Vieira C: Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521-524 (2006).
- Bonaccorsi S, Lohe A: Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: relationships between the satellite sequences and fertility factors. *Genetics* 129:177–189 (1991).
- Born GG, Bertollo LAC: An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* 8: 111-118 (2000).
- Born GC, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n = 42$ chromosomes. *Genetica* 110:1-9 (2001).
- Borón A, Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, Woroniecka K: Gene mapping of 28S and 5S rDNA sites in the spined loach *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from a diploid population and a diploid-tetraploid population. *Genetica* 128:71–79 (2006).
- Dergam JA, Bertollo LAC: Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *Brazil J Genet* 4:755-766 (1990).

- Dimitri P, Arca B, Berghella L, Mei E: High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like *I* factor in *Drosophila melanogaster*. Proc Nat Acad Sci USA 94:8052–8057 (1997).
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). Genetica 133:85-91 (2008).
- Doolittle WF, Sapienza C: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284:601-603 (1980).
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C: Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus*' species complex. Cytogenet Genome Res 118:78–83 (2007)
- Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti Jr PM, Willard HF: Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Chromosome Res 1:77-86 (1993).
- Hatanaka T, Galetti Jr PM: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122:239–244 (2004).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. Experientia 36:1014-1015 (1980).

- Inafuku J, Nabeyama M, Kikuma Y, Saitoh J, Kubota S, Kohno S: Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). *Chromosome Res* 8:193–199 (2000).
- Jesus CM, Galetti Jr PM, Valentini SR, Moreira-Filho O: Molecular and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118:25-32 (2003).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220 (1964).
- Lim JK, Simmons MJ: Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. [Bioessays](#) 16:269-275 (1994).
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F: Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36:762-773 (1993).
- Mäkinen A, Zijlstra C, de Haan NA, Mellink CHM, Bosma AA: Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 78:231-235 (1997).
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O: Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123:211-216 (2005).
- Martins C, Galetti Jr PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363–367 (1999).

- Martins C, Galetti Jr. PM: Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Res* 8:353-355 (2000).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141 (2006).
- Mayr B, Ráb P, Kalat M: Localizaton of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica* 67:51–56 (1985).
- Mellink CHM, Bosma AA, Haan NA, Zijlstra C: Physical localization of 5S rRNA genes in the pig by fluorescence in situ hybridization. *Hereditas* 124:95-97 (1996).
- Miller DA, Devi VG, Tantravahi R, Miller OJ: Supression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp Cell Res* 101:235-243 (1976).
- Móran P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E, Pendás AM: Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet* 75:145-150 (1996).
- Orgel LE, Crick FHC: Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604 - 607 (1980).
- Pendás AM, Móran P, Freije JP, Garcia-Vásquez E: Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet* 67:31-36 (1994).

- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83:2934–2938 (1986).
- Rossi AR, Gorning E: Cytogenetic analysis of three Italian populations of *Coregonus lavaretus* (Pisces, Salmoniformes) with chromosomal location of major and minor ribosomal genes, and telomeric repeats. Hereditas 142:15–21 (2005).
- Schmid M, Guttenbach M: Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent bands in vertebrates. Chromosoma 97:327–344 (1988).
- Schmid M, Vitelli L, Batistoni R: Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma 95:271-284 (1987).
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ: Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. Cytogenet Cell Genet 60:229–235 (1992).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75:304-306 (1972).
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y: Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. Cytogenet Cell Genet 72:1-4 (1996).

- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among the fish *Hoplias malabaricus* from Southern Brazil. *Cytogenet Genome Res* 101:24-28 (2003).
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet Mol Biol* 28:103-110 (2005).
- Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I, Barsacchi-Pilone G: Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. *Chromosoma* 84: 475-491 (1982).
- Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H: Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III: Extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenet Genome Res* 116:116-126 (2007).

Tabelas

Tabela 1. Espécimes de *Hoplias malabaricus* pertencentes ao cariomorfo A.

Localidade	População	m	f
Descalvado (SP) – rio do Pântano	PR	8	6
Santo Antônio do Leverger (MT) – bacia do rio Cuiabá	CR	5	6
Parque Florestal do Rio Doce (MG) – bacia do rio Doce	DR	2	1

Abreviações: m e f = número de machos e fêmeas analisados respectivamente; SP = Estado de São Paulo, MT = Estado de Mato Grosso, MG = Estado de Minas Gerais.

Figuras

Figura 1: Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta dos espécimes de *Hoplias malabaricus* pertencentes ao cariomorfo A. 1 = rio do Pântano (população PR), Estado de São Paulo; 2 = bacia do rio Cuiabá (população CR), Estado do Mato Grosso; 3 = bacia do rio Doce (população DR), Estado de Minas Gerais.

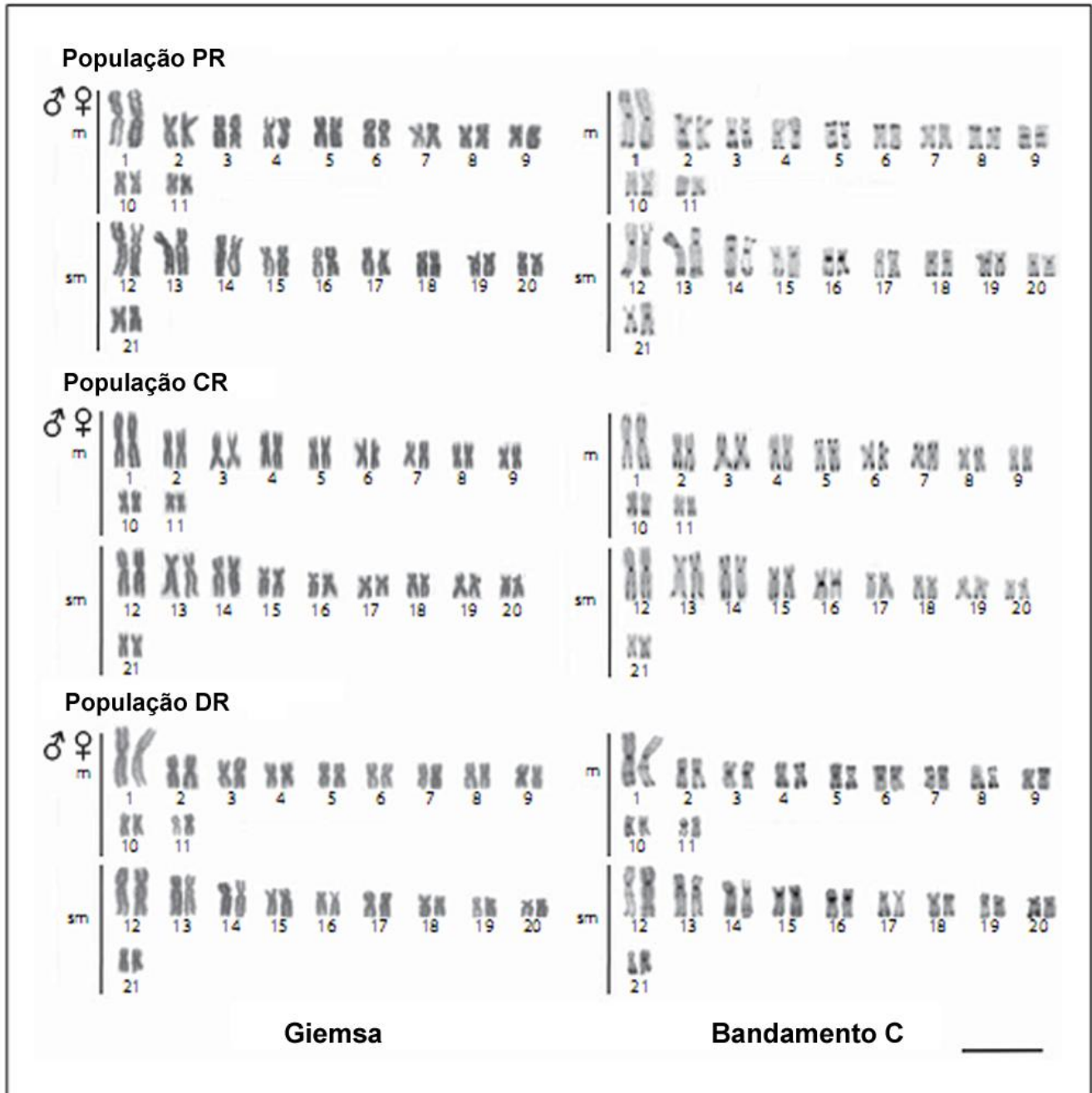


Figura 2: Cariótipos das populações PR, CR, e DR de *Hoplias malabaricus*, organizados a partir de coloração seqüencial dos cromossomos com Giemsa (esquerda) e bandamento C (direita). Barra = 5 μm.

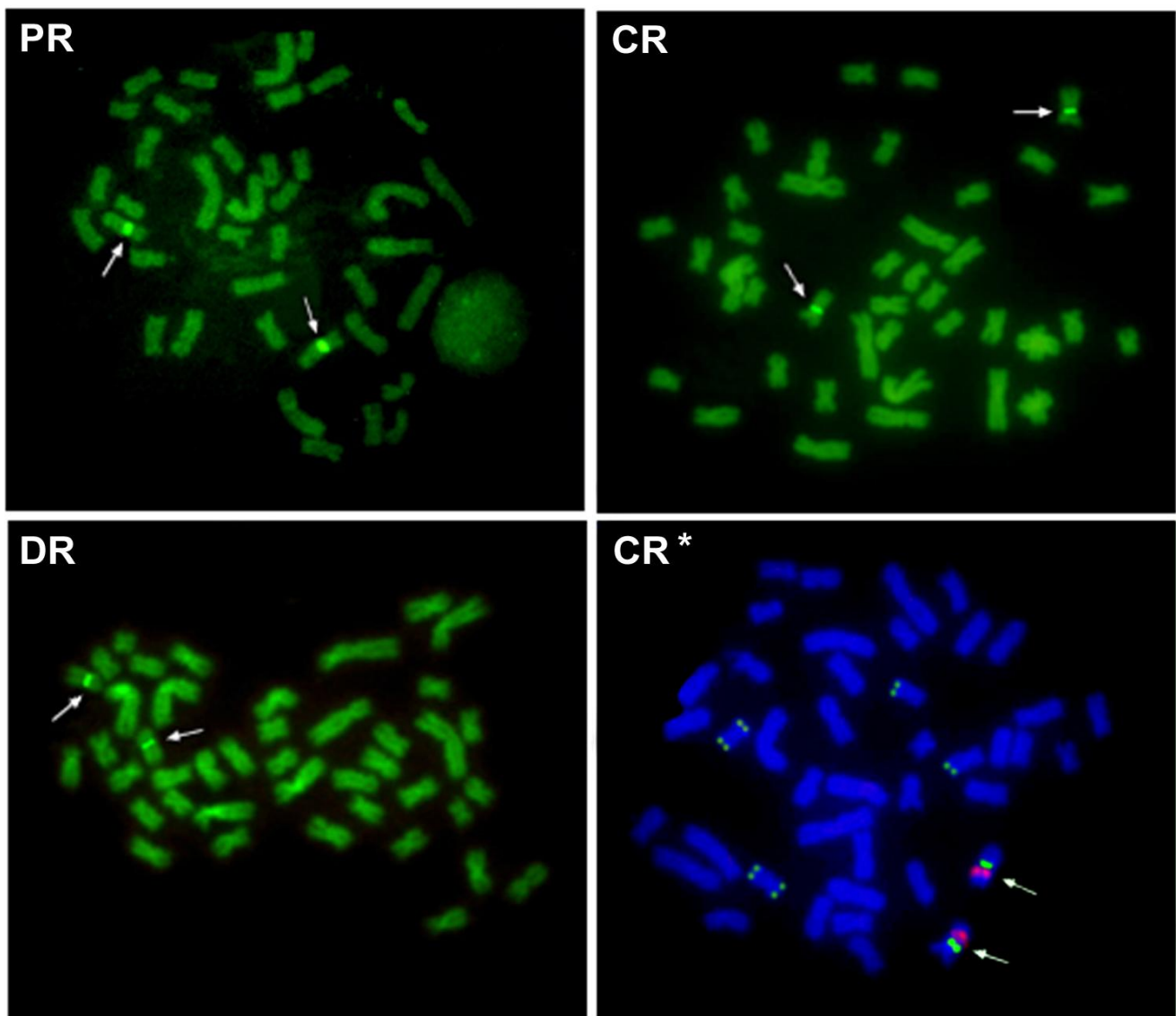


Figura 3: Metáfases de *Hoplias malabaricus* das populações PR, CR e DR após a coloração com Cromomicina A₃. As setas indicam as bandas fluorescentes brilhantes que correspondem aos segmentos de DNA GC-ricos, localizados no par cromossômico nº 16. CR* se refere à população CR após dupla FISH, mostrando a localização sintênica dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e de DNAr 18S (verdes) no par cromossômico nº 16 (setas).

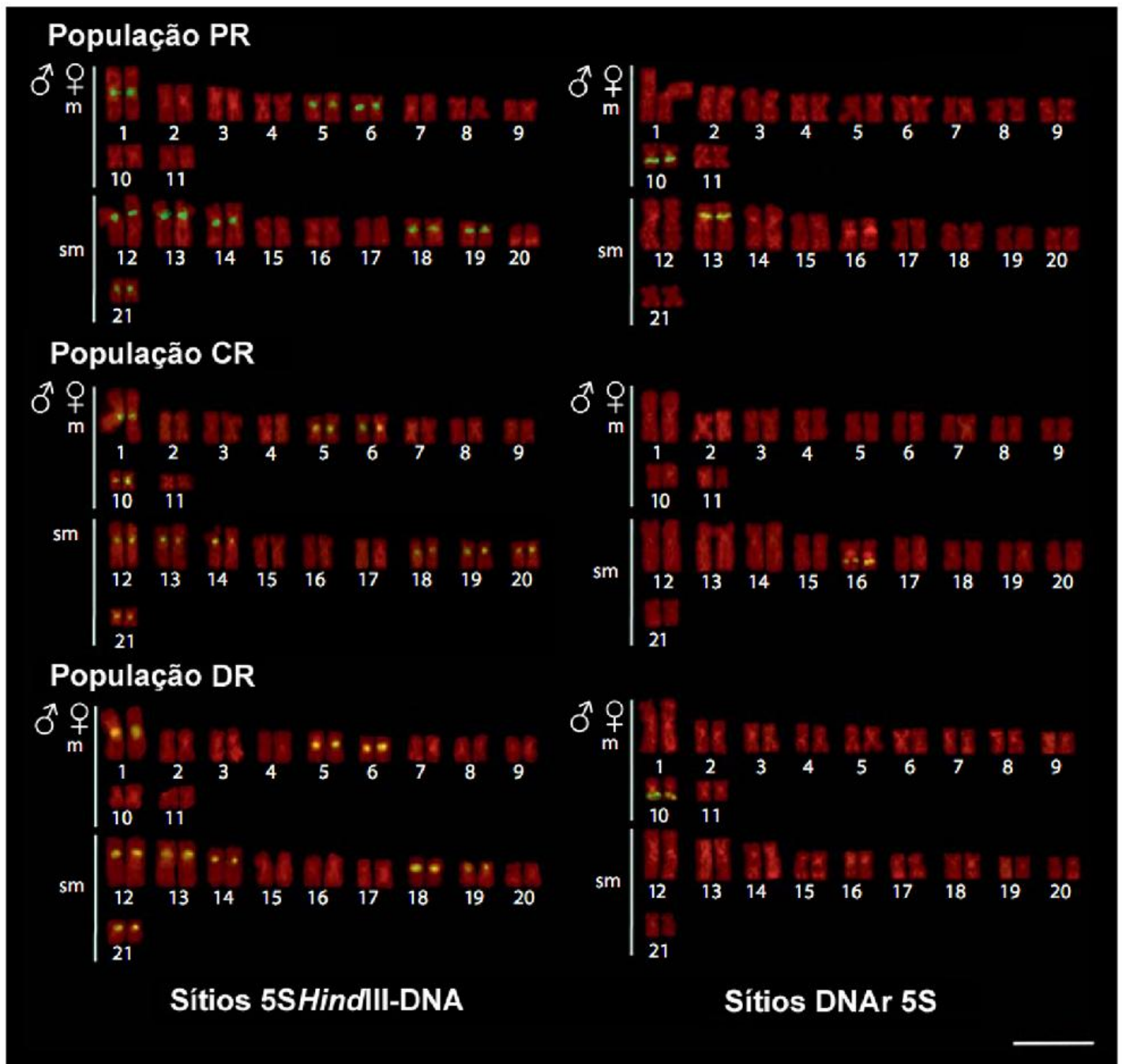


Figura 4: Cariótipos de *Hoplias malabaricus* das populações PR, CR e DR, apresentando os sítios de 5SHindIII-DNA e do DNAr 5S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio. Barra = 5 µm.

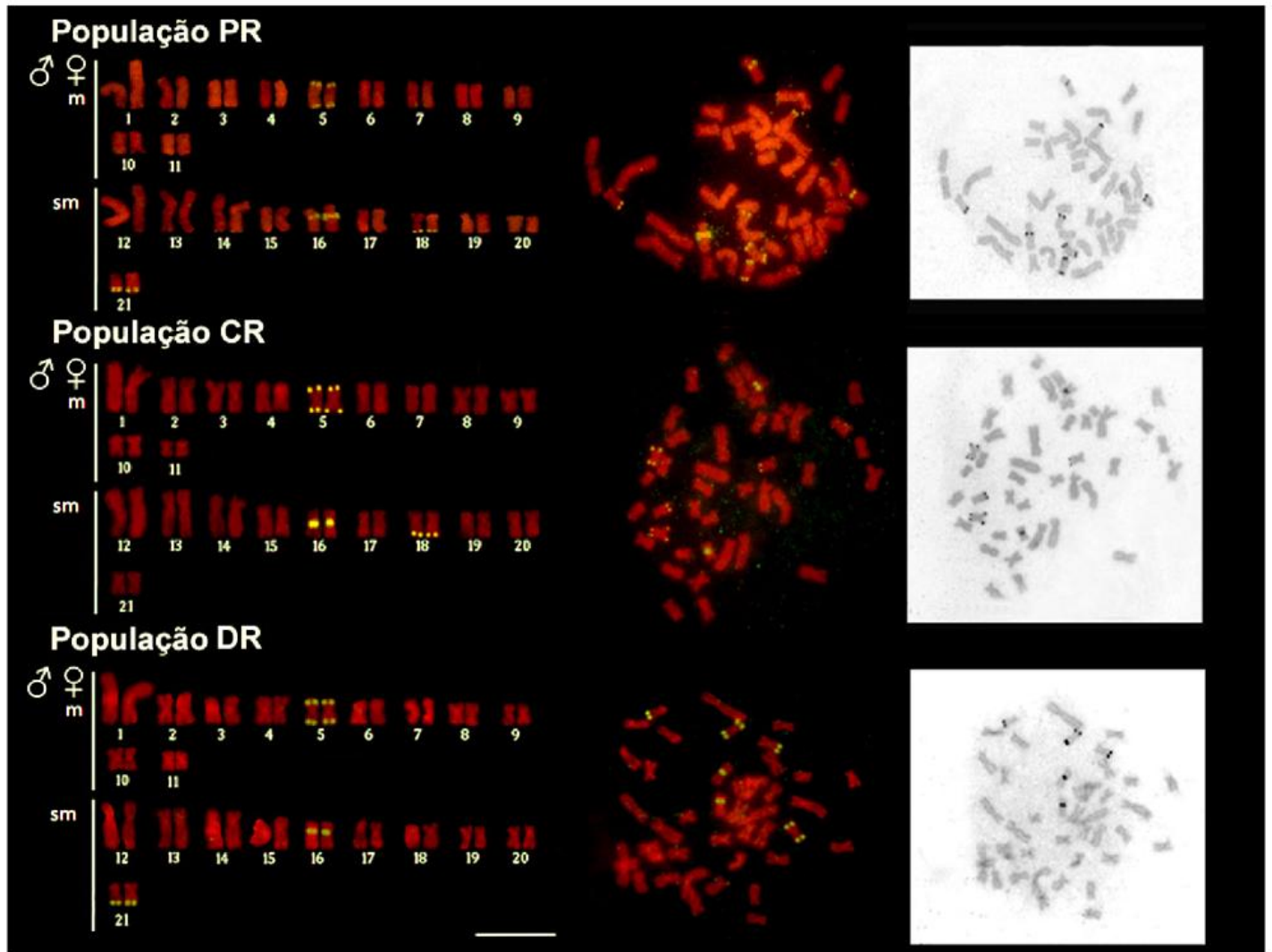


Figura 5: Cariótipos de *Hoplias malabaricus* das populações PR, CR e DR, apresentando os sítios de DNAr 18S (sinais amarelos), com contra-coloração pelo iodeto de propídio e as Ag-RONs sequencialmente analisadas. Observar a correspondência geral entre o número e a localização dos cistrons de DNAr e das Ag-NORs. Barra = 5 μ m.

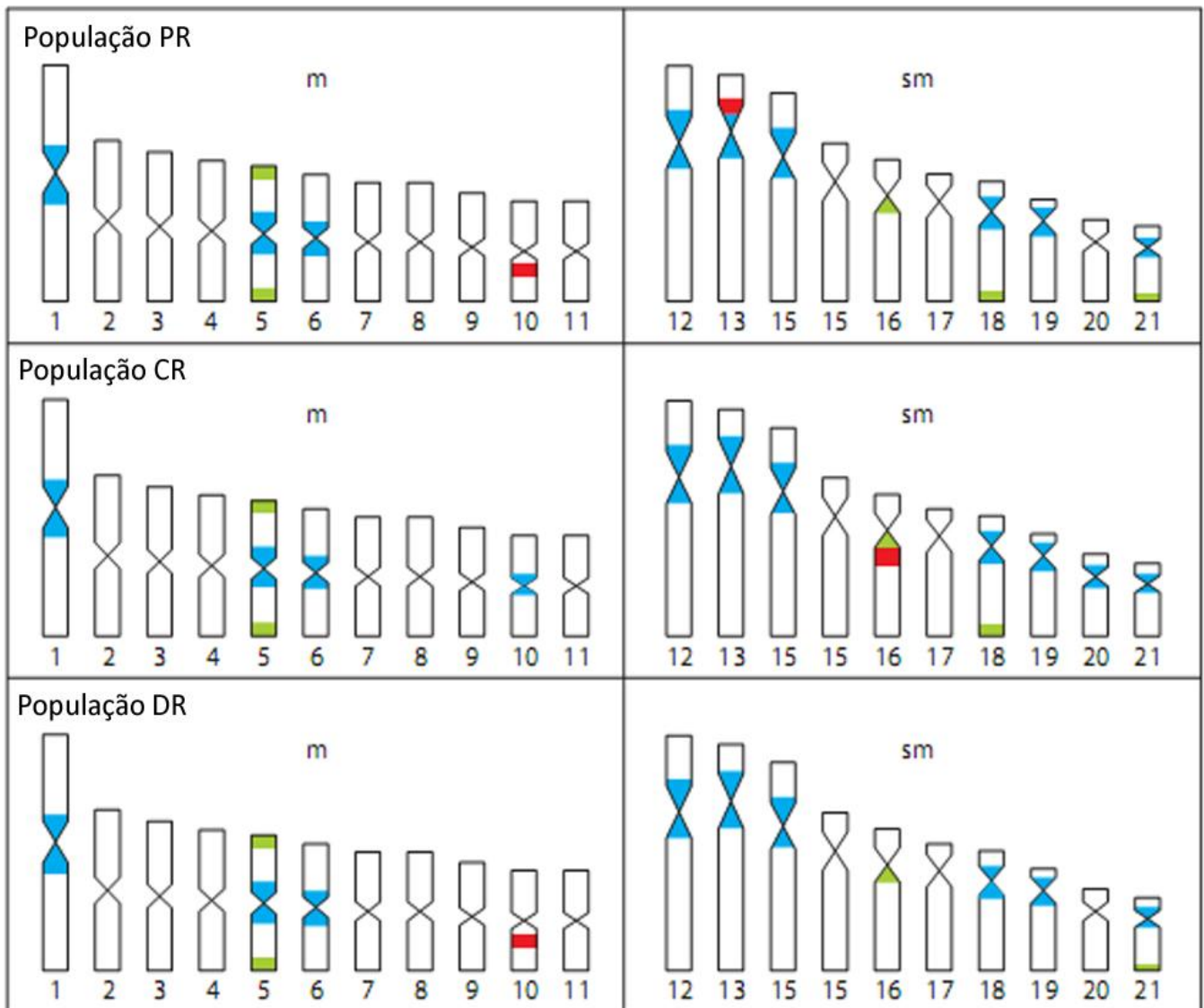


Figura 6: Idiograma representativo dos marcadores cromossômicos observados nas populações PR, CR e DR de *Hoplias malabaricus*. Os sítios de 5SHindIII-DNA, DNAr 18S e DNAr 5S estão indicados em azul, verde e vermelho, respectivamente.

4.3 Capítulo III

Diferenciação inicial de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em *Hoplias malabaricus*. Correlação com a origem do sistema X_1X_2Y neste grupo de peixes.

Cioffi MB, Bertollo LAC: Initial steps in XY sex chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X_1X_2Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity** (aceito).

Resumo

O peixe eritrínídeo *Hoplias malabaricus* é caracterizado por uma ampla diversidade cariotípica, incluindo distintos sistemas de cromossomos sexuais. Sete cariomorfos (A-G) já foram descritos, com os sistemas XY, X_1X_2Y e XY_1Y_2 , encontrados nos cariomorfos B, D e G, respectivamente. Neste estudo, os padrões cromossômicos dos cariomorfos C e D foram analisados e comparados, utilizando o bandamento C, colorações diferenciais com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, e o mapeamento de DNAs repetitivos [18S rDNA, 5SHindIII-DNA e (TTAGGG)_n]. Foi verificado que os cariomorfos C e D apresentam cariótipos bastante conservados. Entretanto, um sistema XX/XY críptico foi identificado no cariomorfo C, onde ampliações de s114eqüências repetitivas no cromossomo X conduziram à uma condição homomórfica e heteromórfica nas fêmeas e nos machos, respectivamente. Entretanto, os cromossomos X e Y diferem apenas levemente caracterizando assim um estágio inicial de diferenciação. Este sistema XY se mostrou correlacionado com a evolução do sistema X_1X_2Y , característico do cariomorfo D. Foi evidenciado que os cromossomos X e nº 20 do cariomorfo C apresentam padrões similares aos dos cromossomos X₁ e X₂ do cariomorfo D, respectivamente, sendo portanto homólogos. Adicionalmente, o cromossomo neo-Y do cariomorfo D compartilha padrões similares ao dos cromossomos Y e 20 do cariomorfo C, tendo se diferenciado por uma fusão em tandem Ypter/20pter. Foi também evidenciada uma condição dicêntrica para o cromossomo neo-Y, onde o centrômero adicional provavelmente se encontra inativo.

Abstract

The Neotropical fish *Hoplias malabaricus* is well known for its population specific karyotypic diversity, as well as population specific variations in sex chromosomes. Seven karyomorphs (A-G) have already been described, with XY, X_1X_2Y and XY_1Y_2 sex chromosome systems found in karyomorphs B, D and G, respectively. Using differential banding (C) and staining (CMA₃ and DAPI) and mapping of repetitive DNA sequences [18S rDNA, 5S *Hind*III-DNA, (TTAGGG)_n], the chromosomal patterns of karyomorphs C and D were compared to analyze their karyological relationships. It was found that karyomorphs C and D have highly conserved karyotypes, with cryptic differentiated XY sex chromosomes occurring in karyomorph C, which is correlated with the evolution of the X_1X_2Y sex chromosome system of karyomorph D. Amplifications of repetitive sequences occurred on the X chromosomes, characterizing a homomorphic and heteromorphic condition in females and males, respectively. However, the X and the Y chromosomes differ only slightly, thus characterizing an early stage of sex chromosomes differentiation. It was highlighted that chromosomes X and No. 20 of karyomorph C have similar patterns to those of chromosomes X_1 and X_2 of karyomorph D, respectively, thus homologous. In addition, the neo-Y chromosome of karyomorph D shares similar patterns to those of chromosomes Y and 20 of karyomorph C, and has evolved via the tandem fusion Ypter/20pter. The dicentric condition of the neo-Y chromosome was also evidenced, being the additional centromere most likely in an inactive state.

Introdução

Cromossomos sexuais citologicamente diferenciados foram descritos em apenas algumas espécies de peixes Neotropicais de água-doce. Distintos padrões de heterocromatina entre os cromossomos sexuais XY e ZW foram bem documentados em alguns casos. Por exemplo, o cromossomo W mostra-se altamente heterocromatinizado em espécies de *Triportheus* (Bertollo and Cavallaro, 1992; Artoni et al. 1998), bem como em algumas espécies de *Leporinus*, *Semaprochilodus*, *Microlepidogaster* e *Parodon* (Galetti and Foresti 1986; Feldberg et al. 1987; Andreatta et al. 1993; Moreira-Filho et al. 1993). Adição de heterocromatina também ocorreu no cromossomo X de *Hoplias malabaricus* (Born and Bertollo 2000) e de *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo et al. 2001), ou no cromossomo Y de *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta et al. 1992). Mesmo em sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, normalmente derivados de rearranjos cromossômicos, a heterocromatina pode desempenhar um papel na diferenciação desses cromossomos, como documentado para *Eigenmannia* sp. 2 (Almeida-Toledo et al. 2000).

Recentemente, a presença de elementos transponíveis e outras seqüências de DNAs repetitivos têm sido extensivamente estudada em peixes (Martins et al. 2007), fornecendo informações importantes em relação à diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais (Volf et al. 2003; Nanda et al. 1990, 2000, 2002; Stein et al. 2001; Parise-Maltempi et al. 2007). Tais seqüências podem modificar a composição molecular do par sexual, bem como reduzir a sua taxa de recombinação (Liu et al. 2004), constituindo passos fundamentais na diferenciação dos cromossomos sexuais (Charlesworth et al. 2005).

Hoplias malabaricus, um peixe eritrínídeo Neotropical de ampla distribuição, apresenta uma conspícua diversificação cariotípica, com sete cariomorfos (A-G) atualmente identificados. Estes cariomorfos são facilmente distinguíveis em relação ao número diplóide, forma e tamanho dos cromossomos e sistemas de cromossomos sexuais, indicando um provável grupo de espécies (Bertollo et al. 1986, 2000). Três distintos sistemas de cromossomos sexuais já foram encontrados entre os cariomorfos, ou seja, XX/XY no cariomorfo B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no cariomorfo D e XX/ XY_1Y_2 no cariomorfo G (Bertollo et al. 2000).

Análise meióticas, juntamente com padrões de bandamentos G-, C- e de replicação, aprimoraram a identificação dos cromossomos sexuais no cariomorfo D e evidenciaram que, nos machos, ocorreu a fusão de um cromossomo submetacêntrico pequeno, semelhante ao X_2 , com o braço curto de um cromossomo submetacêntrico maior, semelhante ao X_1 , originando um cromossomo neo-Y relativamente grande no cariótipo (Bertollo et al. 1997). O completo pareamento do trivalente sexual foi freqüentemente observado entre as células em paquíteno, indicando um processo de ajuste sináptico na meiose (Bertollo e Mestriner 1998).

Uma análise comparativa entre os cariomorfos, utilizando diferentes marcadores, mostrou que o cariomorfo D - $2n=40$ fêmeas / $2n=39$ machos - possui um cariótipo bastante relacionado ao do cariomorfo C - $2n=40$ em ambos os sexos (Cioffi et al. 2009). A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com distintas seqüências de DNA têm contribuído grandemente para o estudo dos cromossomos sexuais em peixes, não somente porque este método fornece

informações adicionais sobre a estrutura destes cromossomos, mas também porque possibilita a comparação de genoma de diferentes espécies (Nanda et al. 2000). Neste sentido, sondas de DNAs repetitivos podem ser úteis para a análise da diferenciação de cromossomos sexuais, possibilitando evidenciar o acúmulo de seqüências de DNAs repetitivos em um ou ambos os homólogos, à partir de uma condição ancestral homomórfica (Kejnovsky et al. 2009).

Assim sendo, a ocorrência de marcadores cromossômicos específicos foi investigada nos cariomorfos C e D, com o intuito de aprimorar a análise da evolução do sistema sexual X_1X_2Y . Foi realizada uma análise comparativa com diferentes métodos de coloração (bandamento C e fluorocromos DAPI e Cromomicina A_3) e o mapeamento citogenético por FISH das repetições teloméricas, de DNAr 18S e do satélite 5SHindIII-DNA. Esta abordagem permitiu a identificação de um sistema XX/XY em estágio inicial de diferenciação no cariomorfo C, bem como sua correlação com a diferenciação do sistema X_1X_2Y do cariomorfo D.

Material e Métodos

Espécimes, preparação dos cromossomos mitóticos, coloração cromossômica e cariotipagem

Nove fêmeas e onze machos de *H. malabaricus*, pertencentes ao cariomorfo C, e sete fêmeas e dez machos, pertencentes ao cariomorfo D, foram coletados no rio Bento Gomes (Poconé, Estado do Mato Grosso, Brasil) e no córrego Monjolinho (Reservatório da UFSCar, Estado de São Paulo, Brasil), respectivamente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensão celular do rim

anterior, utilizando o método convencional de “air-drying” (Bertollo et al. 1978). Os cromossomos foram analisados seqüencialmente pela coloração convencional com Giemsa e pelo bandamento C, utilizando o hidróxido de bário (Sumner 1972) para detectar as regiões heterocromáticas C-positivas. Colorações com os fluorocromos GC-específico (Cromomicina A3) e AT-específico (DAPI) foram realizadas de acordo com Sola et al. (1992). As imagens foram capturadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX50 com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics). Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas por espécime para a determinação do número cromossômico diplóide e a estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm), de acordo com a relação de braços (Levan et al. 1964).

Análise dos cromossomos meióticos

Cromossomos meióticos foram obtidos de acordo com Kligerman & Bloom (1977), como descrito em Bertollo & Mestriner (1998). Os testículos foram seccionados em pequenos fragmentos e submetidos a um tratamento hipotônico. Depois de fixados, os fragmentos foram tratados com solução de ácido acético glacial 50% e fragmentados até que uma suspensão celular homogênea fosse obtida. Gotas desta suspensão foram pingadas sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida (30°C), com uma pipeta Pasteur, formando um anel celular com aproximadamente 1 cm em diâmetro na lâmina. Os cromossomos foram corados com Giemsa 5% em tampão fosfato, pH 6,8 durante 5-6 minutos.

Sondas para FISH

Foram utilizadas duas seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus*. A primeira sonda conteve uma cópia da seqüência do DNA satélite 5SHindIII com 360 pares de bases, composta de um segmento com 95 pares de bases com similaridade ao gene do RNAr 5S, e um segmento com 265 pares de bases também similar ao NTS desse mesmo gene (Martins et al. 2006). A segunda sonda correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene do RNAr 18S, obtido por PCR a partir do DNA nuclear (Cioffi et al. 2009). A sonda de 5SHindIII-DNA foi marcada com biotina-14-dATP, de acordo com especificações do fabricante (Bionick Labeling System, Invitrogen), enquanto que a sonda de DNAr 18S foi marcada com DIG-11-dUTP, de acordo com especificações do fabricante (Roche). Seqüências de DNA telomérico (TTAGGG)_n também foram utilizadas como sonda, gerada por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche) na ausência de um DNA molde, utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ de acordo com Ijdo et al. (1991).

Hibridização Cromossômica

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada em cromossomos mitóticos e meióticos de acordo com Pinkel et al. (1986). Os cromossomos foram incubadas com RNase (40 µg/ml) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/ 2xSSC à 70°C, as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 4 minutos, à 70°C. As misturas de hibridização contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida, em um volume final de 30µl, foram

aquecidas a 100°C por 10 minutos e então aplicadas sobre as lâminas. A hibridização foi realizada por um período de 16 a 18 horas em câmara úmida, a 37°C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em 2xSSC à 37°C durante 5 minutos, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC de 15 min e uma última lavagem em 4xSSC por 15 min, em temperatura ambiente. A detecção dos sinais foi realizada com avidina-FITC conjugada (Sigma) para a sonda de 5SHindIII-DNA e com anti-digoxigenina-rodamina (Roche) para as sondas de DNAr 18S e (TTAGGG)_n. As lavagens pós hibridização foram realizadas em um “shaker”, a 150 rpm. Os cromossomos foram contracorados com iodeto de propídio (50 µg/mL) ou com DAPI (1,2 µg/ml) e as lâminas foram montadas em solução antifading (Vector Laboratories). As análises de FISH foram realizadas utilizando um microscópio de epifluorescência (Olympus BX50).

Resultados

Cariótipos, bandamento C e coloração com fluorocromos

Todos os espécimes do cariomorfo C apresentaram 2n=40 cromossomos para ambos os sexos, com 14 m e 26 sm (**Fig. 1**). No cariomorfo D, todas as fêmeas apresentaram 2n=40 cromossomos (14 m + 26 sm) e todos os machos apresentaram 2n=39 (14m + 25sm). A composição do cariótipo das fêmeas é a mesma encontrada para o cariomorfo C. O cariótipo específico dos machos é devido à presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos característico deste cariomorfo, com fêmeas X₁X₁X₂X₂ e machos X₁X₂Y, onde o neo-Y corresponde a um grande cromossomo submetacêntrico (**Fig. 1**).

Em ambos os cariomorfos, bandas heterocromáticas C-positivas foram observadas na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos, bem como na região telomérica de vários pares (**Fig. 1**). O bandamento C não identificou cromossomos sexuais heteromórficos no cariomorfo C, apesar de que em algumas metáfases de machos as bandas C positivas proximais, nos braços curtos do par cromossômico nº 11, apresentaram tamanhos relativamente distintos. Entretanto, o padrão heterocromático dos pares cromossômicos nºs. 11 e 20 dos machos e das fêmeas do cariomorfo C foram os mesmos observados nos cromossomos X₁ e X₂ do cariomorfo D, sugerindo a homologia entre esses cromossomos. O bloco heterocromático bem evidente, encontrado na região proximal dos braços longos do par nº 11 do cariomorfo C, foi observado ocupando a mesma região do braço longo do cromossomo X₁, assim como do braço curto do cromossomo neo-Y (**Fig. 1**).

Estas bandas C conspícuas foram as únicas heterocromatinas GC-ricas encontradas em ambos o cariomorfos (**Fig. 2**). Em todos os espécimes machos do cariomorfo C os cromossomos do par nº 11 mostraram sítios CMA₃⁺ claramente heteromórficos, com um homólogo apresentando um sítio maior que o outro. Coincidentemente, em todos os machos do cariomorfo D os cromossomos neo-Y e X₁ apresentaram um sítio CMA₃⁺ menor e um outro maior, respectivamente (**Figs. 2 e 3**). Estes resultados foram também reforçados pela coloração com DAPI, mostrando que os sítios CMA₃⁺ eram DAPI negativos e portadores do mesmo heteromorfismo de tamanho (**Figs. 2 e 3**). Desta forma, o par nº 11 dos machos do cariomorfo C é heteromórfico com base nas evidências obtidas com os fluorocromos, permitindo a identificação de um sistema XX/XY críptico neste

cariomorfo. Entretanto, estas diferenças não causaram alterações na macroestrutura deste par cromossômico, uma vez que foi mantida a mesma morfologia e tamanho geral entre os homólogos.

5SHindIII-DNA, DNAr 18S e repetições (TTAGGG)_n

O satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região centromérica de vários pares cromossômicos dos cariomorfos C e D, com um total de 22 sítios correspondentes. Entre estes pares, são de especial interesse os sítios localizados no par cromossômico nº 20 do cariomorfo C e nos cromossomos X₂ do cariomorfo D. Por sua vez, o cromossomo neo-Y do cariomorfo D exibiu um sítio intersticial característico no braço longo, o único localizado em uma posição não-centromérica no cariótipo **(Figs. 2 e 3)**.

Cinco pares cromossômicos foram portadores de sítios de DNAr 18S em ambos os cariomorfos, principalmente nas regiões teloméricas. Entretanto, os cromossomos X e Y (par nº 11) do cariomorfo C e os cromossomos X₁ e neo-Y do cariomorfo D compartilharam um conspícuo sítio proximal, localizado nos braços longos dos cromossomos X, Y e X₁ e no braço curto do cromossomo neo-Y. Novamente, como caracterizado pelos fluorocromos DAPI e CMA₃, os cromossomos XY do cariomorfo C e os cromossomos X₁ e neo-Y do cariomorfo D também apresentam destacáveis sítios heteromórficos, reforçando a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais XY no cariomorfo C **(Figs. 2 e 3)**.

FISH utilizando a sonda com as repetições (TTAGGG)_n mostrou sinais teloméricos típicos em todos os cromossomos. Adicionalmente, um exclusivo sítio

intersticial (ITS) foi evidenciado no braço longo do cromossomo neo-Y (**Figs. 3a and b**).

Análises meióticas

Cromossomos meióticos foram analisados por FISH, com sonda de DNAr 18S, em espécimes de machos do cariomorfo D. As células espermatogoniais apresentaram 39 cromossomos e 10 sítios de DNAr 18S conforme o esperado, considerando os resultados anteriores em metáfases mitóticas (**Fig. 4a**). Células em fases iniciais da prófase I apresentaram cinco sítios de DNAr 18S, devido ao pareamento dos homólogos durante a fase de zigóteno (**Fig. 4b**). Dezoito bivalentes e um trivalente característico foram encontrados durante os estágios de diplóteno-diacinese, correspondendo à sinapse dos 18 pares de autossomos e dos cromossomos sexuais X_1 , X_2 e neo-Y, respectivamente (**Figs. 4c e d**). Concordantemente, cinco sítios de DNAr 18S foram bem caracterizados, incluindo o localizado no trivalente sexual. Espermatócitos em metáfase II apresentaram 19 ou 20 cromossomos, como esperado a partir de células espermatogoniais com $2n=39$ cromossomos. Células com $n=19$ (18 autossomos + cromossomo neo-Y), assim como as com $n=20$ (18 autossomos + cromossomos X_1 e X_2) apresentaram cinco sítios de DNAr 18S. Apesar da condensação mais acentuada dos cromossomos meióticos, sítios heteromórficos também puderam ser detectados entre os cromossomos neo-Y e X_1 (**Figs. 4e e f**).

Discussão

O mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA pôde evidenciar que os cariomorfos C e D apresentam cariótipos bastante conservados e que um sistema de cromossomos sexuais XY ocorre no cariomorfo C, o qual está correlacionado com a origem do sistema X_1X_2Y presente no cariomorfo D.

Entretanto, os cromossomos X e Y ainda conservam uma grande similaridade quanto ao tamanho e morfologia caracterizando, desta forma, um estágio inicial de diferenciação desses cromossomos. Embora diferenças entre esses cromossomos não tenham sido claramente detectadas com base no padrão das bandas C-positivas, variações em relação às seqüências de DNAr 18S e da heterocromatina GC-rica foram bem evidenciadas, indicando que essas duas classes de DNAs repetitivos estão associadas ao processo de diferenciação desses cromossomos. As mesmas condições heteromórficas evidenciadas para os sítios $CMA_3^+/DAPI$ e de DNAr 18S poderiam ser explicadas se os genes ribossomais estiverem intercalados por seqüências heterocromáticas GC-ricas ou se o DNAr constituir, por si mesmo, estas seqüências. Entretanto, a primeira consideração parece ser a mais provável, considerando que no salmão do Atlântico, e provavelmente também em outros peixes, os genes de RNAr estão intercalados com regiões heterocromáticas (Pendás et al. 1993), e que a CMA_3^+ se liga principalmente à heterocromatina que flanqueia as RONS (Philips & Hartley 1988). É sabido que sistemas de cromossomos sexuais recentes mantêm uma grande extensão de homologia, onde só algumas áreas mais restritas e diferenciadas são associadas com a determinação do sexo (Charlesworth 2004; Charlesworth et al. 2005). A redundância das seqüências de DNAr, bem como a da

heterocromatina GC-rica a ele associada, poderia tornar estas regiões mais suscetíveis para a ocorrência de “crossing-over” desiguais, de tal modo que essas seqüências repetitivas poderiam ser modificadas por duplicações e deleções durante o processo evolutivo.

Estágios iniciais da evolução dos cromossomos sexuais, onde seqüências de DNAs repetitivos também mostraram-se associadas com a diferenciação dos cromossomos sexuais, foram também observados em algumas espécies de peixes, como em Poeciliidae e Sternopygidae (Haaf & Schmid 1984; Nanda et al. 1990; 1992; Almeida-Todelo et al. 2001). Em *Xiphophorus maculatus* os cromossomos sexuais não se apresentam heteromórficos, podendo ser considerados em um estágio inicial de diferenciação. Expansões do elemento repetitivo *XIR* foram consideradas como um dos eventos iniciais na divergência do cromossomo Y e no isolamento da recombinação do locus sexo-determinante, uma vez que a amplificação deste elemento não foi observada no cromossomo X (Nanda et al. 2000). *Eigenmannia virescens* também caracteriza um outro exemplo de diferenciação inicial dos cromossomos sexuais, onde o cromossomo X mostra um bloco heterocromático na região distal, positivo para a coloração com Cromomicina A₃ e Mitramicina, provavelmente devido a ampliações de DNA, sem correspondência no cromossomo Y (Almeida-Todelo et al. 2001).

Os padrões cromossômicos dos cariomorfos C e D foram comparados, com o intuito de analisar suas relações cariotípicas, bem como a origem do sistema de cromossomos sexuais X₁X₂Y. Uma perfeita correspondência foi encontrada entre os cromossomos X e Y e os cromossomos X₁ e neo-Y, respectivamente. O mesmo heteromorfismo de tamanho relativo aos sítios cromossômicos DAPI⁻/CMA₃⁺ e de

DNAr 18S foi encontrado para esses cromossomos, indicando que eles são, de fato, correlacionados. A análise dos cromossomos meióticos no cariomorfo D corroborou os resultados mitóticos. Além de confirmar o número esperado de sítios de DNAr 18S em células espermatogoniais, da prófase I e metáfase II, um único sítio conspícuo foi observado no trivalente meiótico, resultante do pareamento dos cromossomos X_1 e neo-Y. Além disso, em células espermatogoniais e em metáfase II, um sítio menos discreto de DNAr 18S foi evidente no cromossomo neo-Y, quando comparado com o sítio conspícuo presente no cromossomo X_1 .

O mapeamento cromossômico das seqüências de 5*SHindIII*-DNA também reforçou as relações evolutivas entre os cromossomos sexuais de ambos os cariomorfos. A família de DNA satélite 5*SHindIII* é específica do genoma de *H. malabaricus*, localizada somente na região centromérica de alguns pares cromossômicos (Martins et al. 2006). Tais seqüências não foram encontradas nos centrômeros dos cromossomos X e Y do cariomorfo C e, conseqüentemente, também se mostraram ausentes nos centrômeros dos cromossomos X_1 e neo-Y do cariomorfo D. Entretanto, o par cromossômico nº 20 do cariomorfo C e o seu correspondente no cariomorfo D (cromossomo X_2) exibiram sítios centroméricos de 5*SHindIII*-DNA, além de um sítio intersticial exclusivo no braço longo do cromossomo neo-Y. Estes resultados permitiram concluir que este sítio intersticial corresponde ao centrômero do cromossomo nº 20, fusionado sobre o cromossomo Y ancestral, dando origem a um cromossomo neo-Y dicêntrico. Foi proposto que o cromossomo neo-Y possa ser de fato um cromossomo dicêntrico (Bertollo et al. 1997; Martins et al. 2006) e com um comportamento estável no

cariótipo (Bertollo e Mestriner 1998), sugerindo assim que o centrômero adicional esteja sendo mantido sob forma inativa.

Um sítio telomérico intersticial (ITS), mapeado no braço longo do cromossomo neo-Y, também dá um forte suporte para a hipótese de origem do sistema X_1X_2Y do cariomorfo D. Como esperado, sítios fluorescentes foram tipicamente encontrados em ambas as regiões teloméricas de todos os cromossomos do cariótipo, enquanto que o cromossomo neo-Y apresentou um ITS incomum no braço longo. Sítios teloméricos intersticiais têm sido mapeados em diversas espécies de vertebrados, sugerindo que rearranjos cromossômicos podem ocorrer sem a perda de seqüências teloméricas (Meyne et al. 1989). Na realidade, a hipótese de que os ITS podem ser remanescentes de rearranjos cromossômicos que aconteceram durante evolução do genoma tem um amplo suporte (Ijdo et al. 1991). No caso de *H. malabaricus*, o sítio telomérico intersticial foi mapeado somente na região do cromossomo neo-Y onde provavelmente ocorreu a fusão entre o cromossomo Y ancestral e o cromossomo nº 20. Assim, os dados indicam a manutenção de algumas seqüências teloméricas pertencentes aos cromossomos rearranjados e dão suporte para a origem do cromossomo neo-Y como proposto por outros marcadores cromossômicos (Bertollo et al. 1997). Um idiograma resumindo a evolução do sistema X_1X_2Y do cariomorfo D, à partir de um sistema XX/XY críptico encontrado no cariomorfo C, esta sendo mostrado na figura 5. A distribuição dos marcadores cromossômicos evidenciam a fusão em tandem $Y_{pter}/20_{pter}$ que resultou na formação do cromossomo neo-Y.

A diversidade de mecanismos de determinação sexual em peixes, bem como com a ausência de cromossomos sexuais diferenciados na maioria das espécies,

faz deste grupo um modelo interessante para estudos evolutivos e a caracterização de estágios iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais. Em geral, esta análise não é possível em vertebrados superiores, considerando que estes possuem sistemas estáveis de determinação sexual (Dettai et al. 2007). Entre os peixes Gasterosteidae, o uso de FISH com sondas de cromossomos artificiais de bactérias (BACs) demonstrou que *Gasterosteus aculeatus* possui um cromossomo Y heteromórfico, em contraste com estudos citogenéticos prévios. De fato, este cromossomo, além de ter acumulado seqüências repetitivas de DNA em sua região não-recombinante, também sofreu inversões e deleções quando comparado com o cromossomo X (Ross & Peichel, 2008). Além disso, uma diversidade de cromossomos sexuais ocorre entre espécies relacionadas, evidenciando rápidas mudanças quanto aos sistemas de cromossomos sexuais neste grupo de peixes. Adicionalmente, foi também verificado que o cromossomo Y de *G. wheatlandi* foi originado pela fusão de dois cromossomos Y distintos de duas espécies relacionadas, representando uma condição incomum na evolução do sistema X_1X_2Y de cromossomos sexuais múltiplos (Ross et al. 2009).

H. malabaricus também tem mostrado ser um excelente modelo para estudos de diferenciação e evolução de cromossomos sexuais. Além dos sistemas XY, X_1X_2Y e XY_1Y_2 previamente identificados, um novo caso foi agora caracterizado, onde os cromossomos XY são vistos em um estágio inicial de diferenciação, com base nas evidências obtidas a partir de seqüências repetitivas de DNA. Embora os resultados ora obtidos tenham evidenciado uma estreita correlação entre os sistemas XY e X_1X_2Y dos cariomorfos C e D, respectivamente, tal correlação não foi encontrada para o sistema XY do cariomorfo B, o qual parece ter uma origem

independente (Cioffi et al. *submetido*). Assim sendo, *H. malabaricus* tem provavelmente percorrido caminhos evolutivos distintos em relação aos cromossomos sexuais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Liano Centofante pelo auxílio na obtenção de espécimes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - proc. n. 2007/05565-5), pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - proc. n. 083/2007).

Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA (2000). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes) *Chromosoma* **109**:197-200
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Pequignot EV, Daniel-Silva MF (2001). XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenet Cell Genet* **95**:73–78
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1992). Chromosome studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes,

Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* **57**:369-372

Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1993). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW Sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet Cell Genet* **63**:215-220

Artoni RF, Venere PC, Bertollo LAC (1998). A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* **63**: 421-425

Bertollo LAC, Cavallaro ZI (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cytogenet Cell Genet* **60**:60-63

Bertollo LAC, Mestriner CA (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Res* **6**:141-147

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* **1**:103-120

Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM (1986). Cytogenetics and taxonomy considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* **28**:153-159

- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997). The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* **5**:493-499
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000). A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* **8**:603–613
- Born GG, Bertollo LAC (2000). An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* **8**: 111-118
- Charlesworth B (2004). Sex determination: primitive Y chromosomes in fish. *Curr Biol* **14**:R745–747
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* **95**:118–128.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics* **10**:34. Doi: 10.1186/1471-2156-10-34
- Dettai A, Bouneau L, Fischer C et al (2007). FISH analysis of fish transposable elements: tracking down mobile DNA in teleost genomes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish cytogenetics*, Enfield, pp 361-383

- Feldberg E, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Moreira-Filho O, Santos AF (1987). Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* **29**: 1-4
- Galetti Jr. PM, Foresti F (1986). Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) *Cytogenet Cell Genet* **43**:43-46
- Graves JAM (2008). Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* **42**: 565-586
- Haaf T, Schmid M (1984). An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* **89**: 37-41
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* **19**:4780
- Ross JA, Peichel CL (2008) Molecular cytogenetic evidence of rearrangements on the Y chromosome of the threespine stickleback fish. *Genetics* **179**: 2173–2182
- Kejnovsky E, Hobza R, Cermák T, Kubát Z, Vyskot B (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* **102**: 533-541
- Kligerman, AD, Bloom SE (1977). Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J Fish Res Board Can* **34**:266–269

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**:201-220
- Liu ZY, Moore PH, Ma H et al (2004). A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* **427**:348–352
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr. PM (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* **127**:133–141.
- Martins C (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, pp 421–453
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 7049–7053
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1993). Distribution of Sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* **46**: 115-125
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC (1990). Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* **30**: 456–462

- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, Eppel JT, Schmid M (1992). Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* **101**: 301–310
- Nanda I, Volff JN, Weis S et al (2000). Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* **109**:173-180
- Nanda I, Kondo M, Hornung U et al (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11778–11783
- Parise – Maltempo PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res* **116**:218–223
- Pendás AM, Morán P, Garcia-Vázquez E (1993). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet* **63**:128-130
- Philips RB, Hartley SE (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome* **30**:193-197
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:2934–2938

- Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapiro MD, Peichel CL (2009) Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genet* **5(2)**: e1000391. doi:10.1371 /journal.pgen.1000391
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ (1992). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenet Cell Genet* **60**:229–235
- Stein J, Phillips RB, Devlin RH (2001). Identification of the Y chromosome in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet* **92**:108-110
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* **75**:304-306
- Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends Genet* **19**:674–678

Figuras

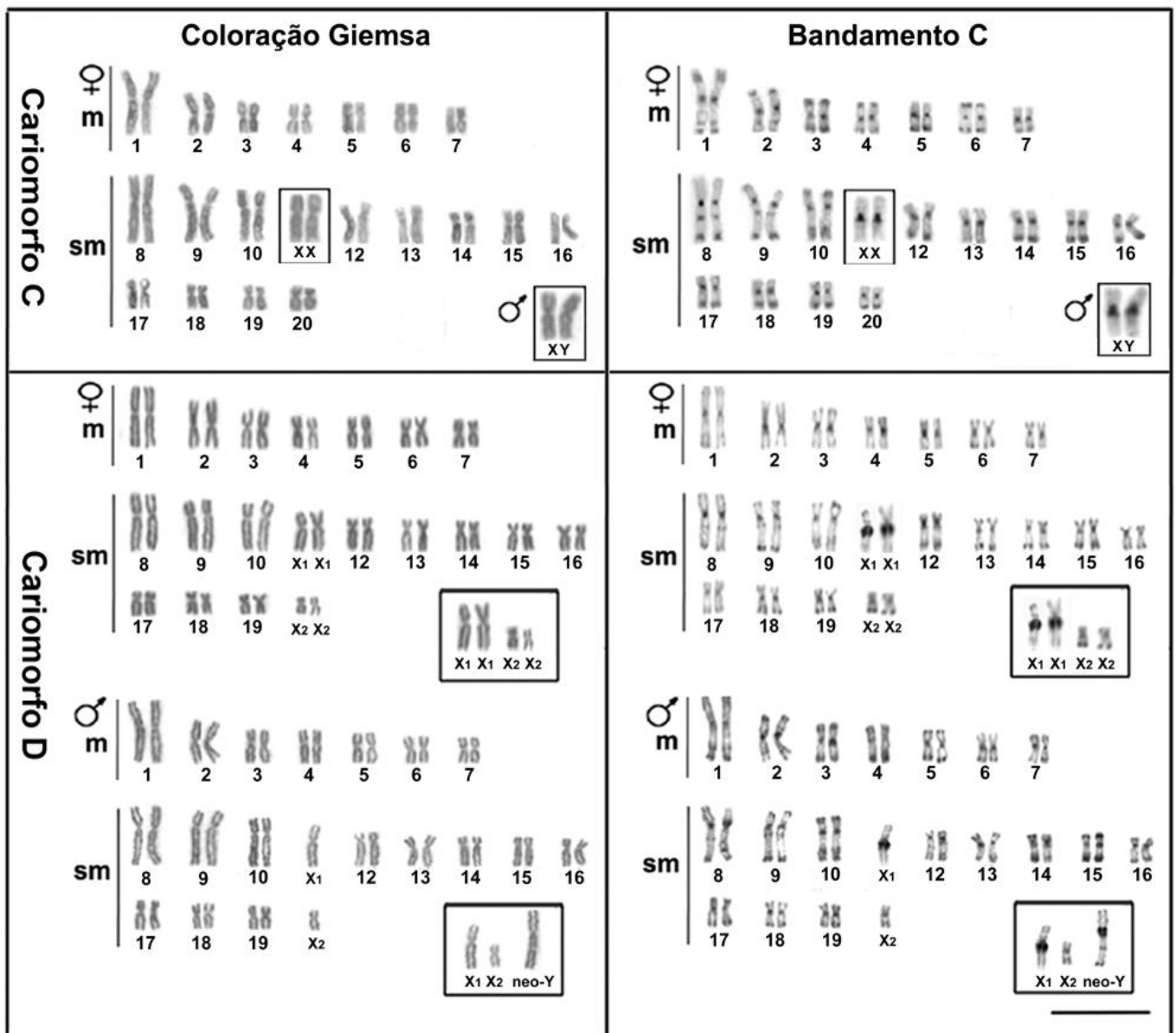


Figura 1: Cariótipos dos cariomorfos C e D (macho/fêmea) de *Hoplias malabaricus* organizados a partir de coloração sequencial dos cromossomos com Giemsa (esquerda) e bandamento C (direita). No cariomorfo C, machos e fêmeas apresentam praticamente o mesmo padrão cariotípico geral. Os cromossomos X e Y do cariomorfo C (par No. 11) e os cromossomos X₁, X₂ e neo-Y do cariomorfo D estão destacados. Note a conspícua banda heterocromática proximal nos braços longos dos cromossomos X, Y and X₁ e no braço curto do cromossomo neo-Y. Barra = 5 µm.

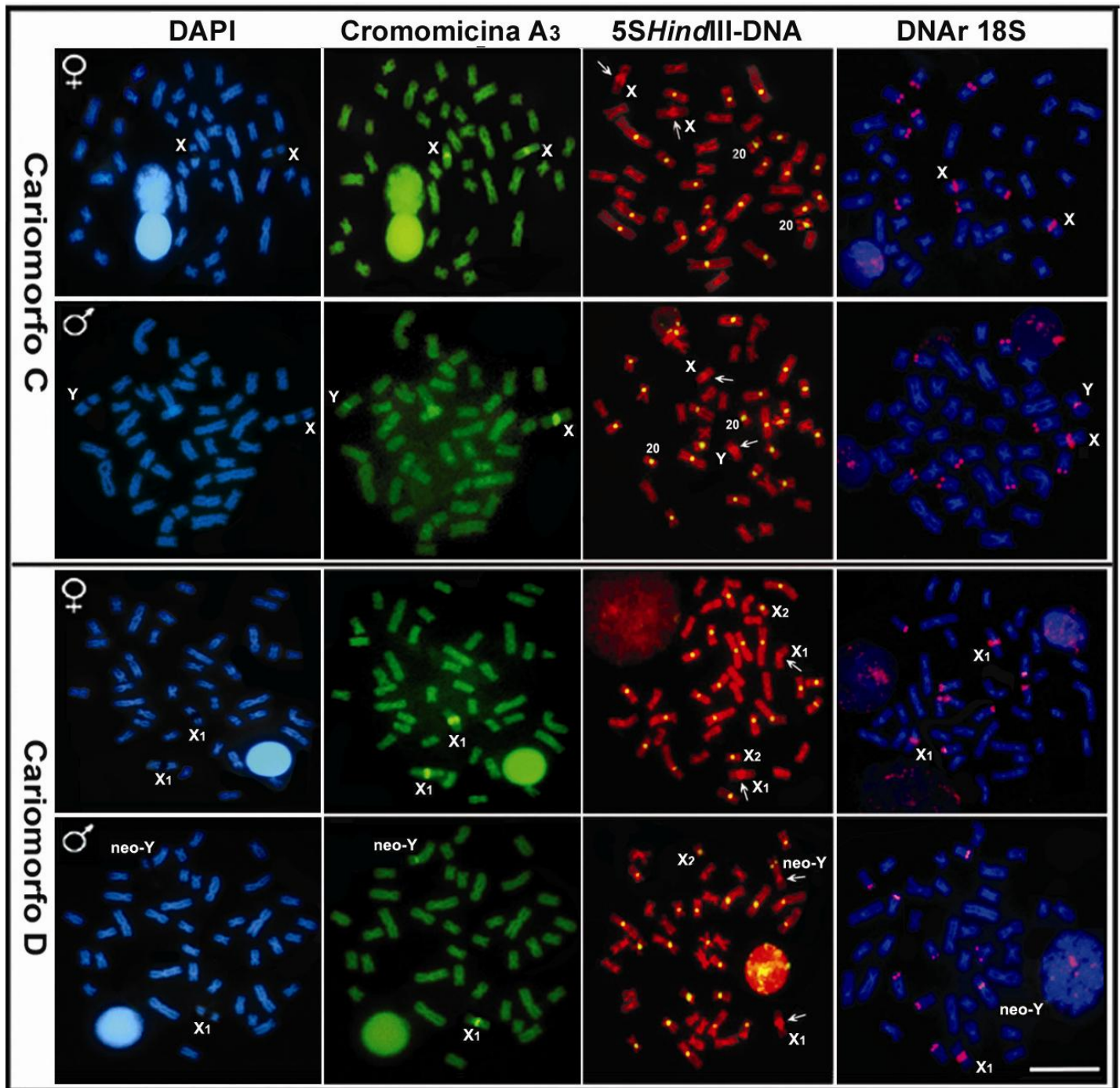


Figura 2: Cromossomos metafásicos dos cariomorfos C e D de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização dos sítios DAPI-, CMA₃⁺, 5SHindIII-DNA e DNAr 18S nos cromossomos. As seqüências DAPI-, CMA₃⁺ e de DNAr 18S, ocorrem como sítios homomórficos e heteromórficos em fêmeas e machos, respectivamente, e evidenciam a correspondência entre os cromossomos X e Y
(continua na próxima página)

(cariomorfo C) e X₁ e neo-Y (cariomorfo D). Sítios centroméricos de 5SHindIII-DNA estão sendo evidenciados nos cromossomos correspondentes nº 20 (cariomorfo C) e X₂ (cariomorfo D), bem como intersticialmente no braço longo do cromossomo neo-Y. As setas indicam o conspícuo bloco heterocromático proximal localizado nos cromossomos X, Y, X₁ e neo-Y evidenciados pela contra-coloração com o iodeto de propídio.

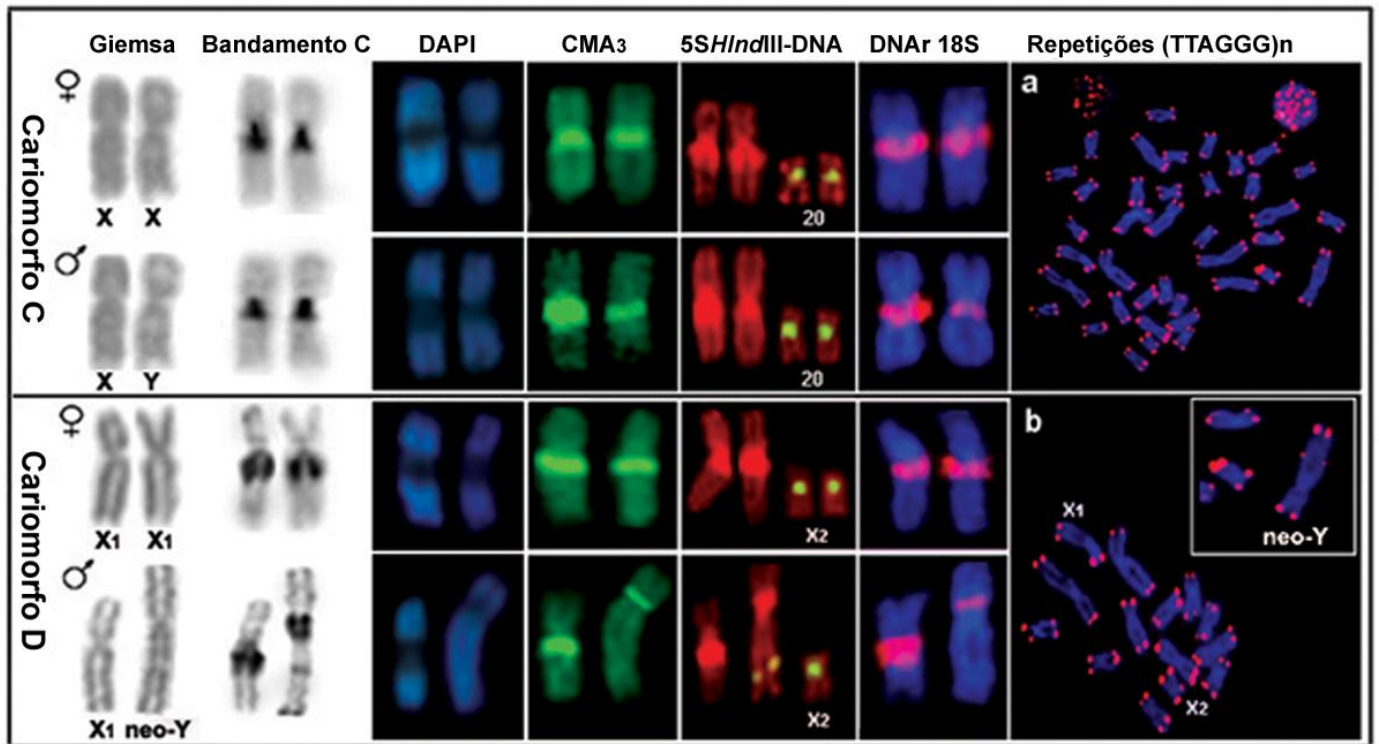


Figura 3: Cromossomos X e Y (cariomorfo C) e X₁ e neo-Y (cariomorfo D) evidenciando bandas C positivas, DAPI-, CMA₃⁺ e sítios de 5SHindIII-DNA e DNAr 18S. Os cromossomos X e Y mostram-se claramente relacionados aos cromossomos X₁ e neo-Y, respectivamente, considerando os sítios DAPI-, CMA₃⁺ e de DNAr 18S homomórficos e heteromórficos. A correspondência entre o sítio intersticial de 5SHindIII-DNA, localizado no braço longo do cromossomo neo-Y, e o sítio centromérico nos cromossomos X₂ e nº 20 do cariomorfo C, está sendo também evidenciada. Os cromossomos X, Y, X₁ e neo-Y são desprovidos de sítios centroméricos de 5SHindIII-DNA, mas evidenciam conspícuos blocos heterocromáticos proximais após a contra-coloração com o iodeto de propídio. (a) cromossomos metafásicos de machos do cariomorfo D evidenciando claros sinais teloméricos hibridizados em ambos os telômeros de todos os cromossomos; (b) detalhe dos cromossomos sexuais, destacando o sítio telomérico intersticial (ITS) exclusivo no braço longo do cromossomo neo-Y.

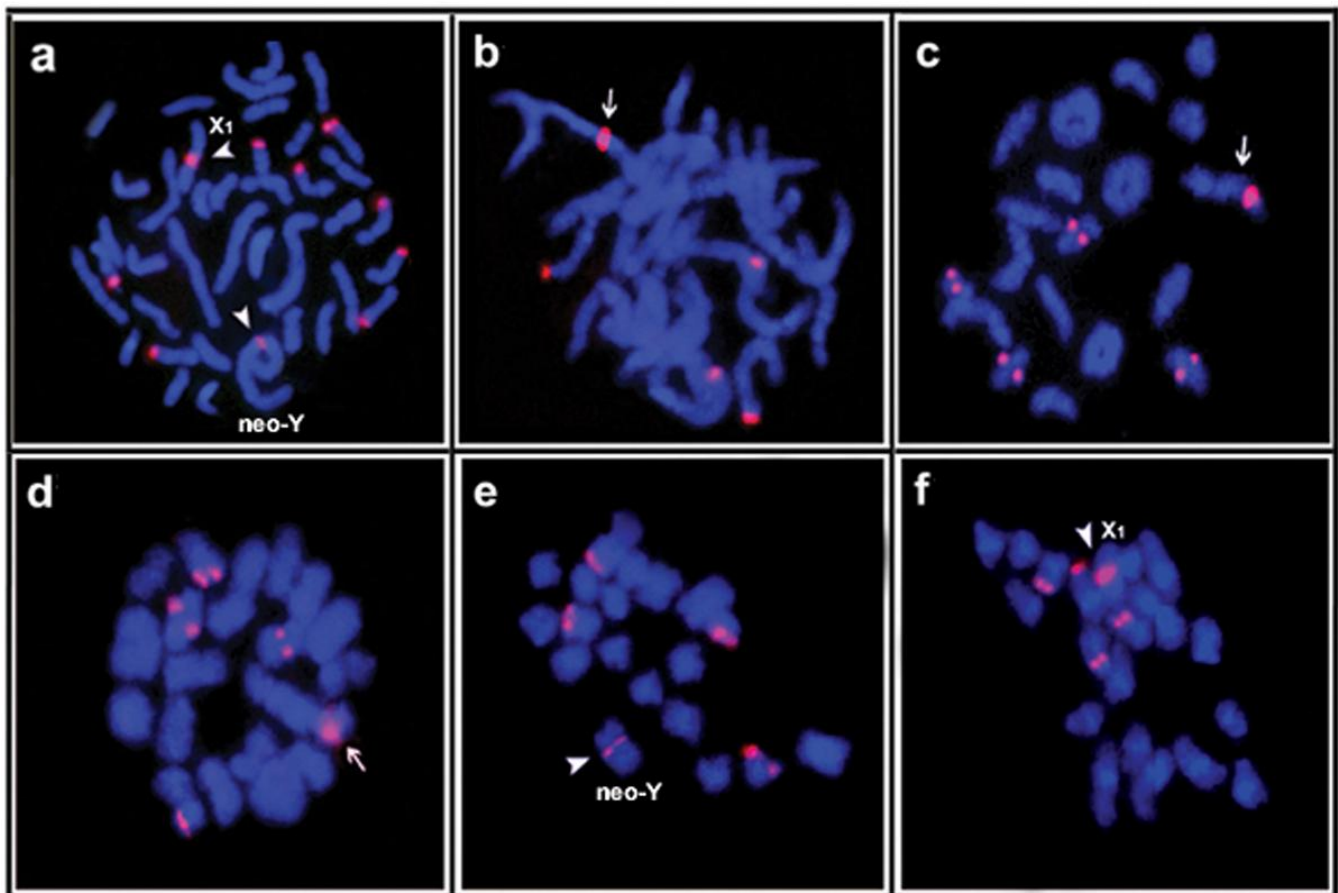


Figura 4: Cromossomos meióticos de machos pertencentes ao cariomorfo D de *Hoplias malabaricus* analisados com a sonda de DNAr 18S. (a) células espermatogoniais mostrando $2n=39$ cromossomos e dez sítios de DNAr 18S; (b) metáfases em zigóteno/paquítenu e (c-d) diacinese/ metáfase I, exibindo cinco sítios de DNAr 18S nos cromossomos emparelhados; (e-f) células em metáfase II com 19 e 20 cromossomos, respectivamente, mostrando cinco sítios de DNAr 18S. As setas indicam o sítio ribossomal conspícuo presente no trivalente sexual; as cabeças de seta indicam os sítios heteromórficos de DNAr 18S associados com os cromossomos neo-Y e X_1 .

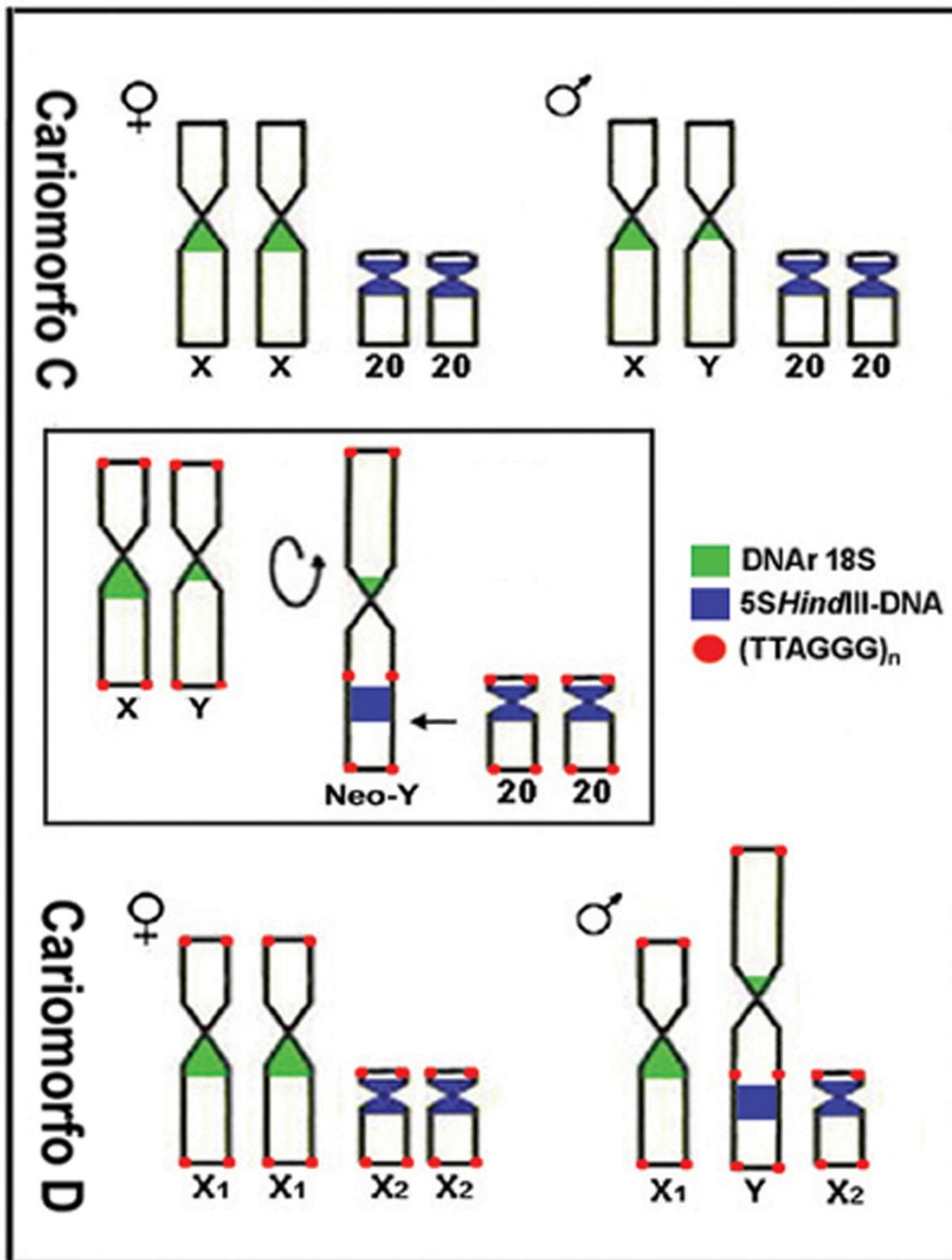


Figura 5: Idiograma representativo da evolução do sistema X_1X_2Y presente no cariomorfo D, a partir de um sistema XX/XY críptico encontrado no cariomorfo C, evidenciado pelo mapeamento de seqüências de DNAs repetitivos nos cromossomos. O destaque central ilustra a fusão em tandem $Y_{pter}/20_{pter}$ que originou o cromossomo neo-Y. A seta curvada indica a orientação invertida do cromossomo Y.

4.4 Capítulo IV

Diferenciação de um sistema de cromossomos sexuais XY no peixe *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Acúmulo incomum de seqüências repetitivas no cromossomo X.

Cioffi MB, Martins C, Rebordinos L, Vicari MR, Bertollo LAC: Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development** (aceito).

Resumo

O peixe eritrínídeo *Hoplias malabaricus* apresenta uma alta diversidade cariotípica, com sete cariomorfos identificados. O cariomorfo A é caracterizado por $2n=42$ cromossomos, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. O cariomorfo B também possui $2n=42$ cromossomos em ambos os sexos, mas difere pela presença de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY. O mapeamento citogenético de cinco classes de DNAs repetitivos indicaram similaridades entre ambos os cariomorfos e a provável derivação dos cromossomos XY a partir do par nº 21 do cariomorfo A. De fato, estes cromossomos mostram-se bem relacionados com base na distribuição das seqüências (GATA)_n e dos sítios de DNAr 18S e 5SHindIII-DNA. Os dados obtidos indicaram que a diferenciação do braço longo do cromossomo X ocorreu por um acúmulo de heterocromatina e das seqüências de DNAr 18S, a partir de um par ancestral homomórfico como o nº 21 encontrado no cariomorfo A. Estes achados foram reforçados pela distribuição da fração C₀t-1 DNA. Em adição, o sítio de DNAr 18S presente no par 21 foi perdido no cromossomo Y, provavelmente devido à ausência de recombinação entre os cromossomos X e Y, com a rápida degeneração dessas seqüências pelo acúmulo de mutações. O cromossomo X mostrou-se claramente como um local de acúmulo de repetições de DNA, representando um exemplo incomum de cromossomo X acumulando mais seqüências repetitivas do que o Y entre os peixes.

Abstract

The Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus* presents a high karyotypic diversity, with seven karyomorphs identified. Karyomorph A is characterized by $2n=42$ chromosomes, without morphologically differentiated sex chromosomes. Karyomorph B also has $2n=42$ chromosomes for both sexes, but differs by an exclusive heteromorphic XX/XY sex chromosome system. The cytogenetic mapping of five classes of repetitive DNAs indicated similarities between both karyomorphs and the probable derivation of the XY chromosomes from pair No. 21 of karyomorph A. These chromosomes appear to be homeologous since the distribution of the (GATA) sequences, the 18S rDNA and the 5S*Hind*III-DNA sites reinforces their relatedness. Our data indicated that the differentiation of the long arms of the X chromosome occurred by increasing the amount of heterochromatin and the 18S rDNA cistrons from an ancestral homomorphic pair, such as No. 21 found in karyomorph A. These findings were reinforced by the distribution of the C₀t-1 DNA fraction. In addition, the 18S rDNA site on the Y chromosome was lost, probably due the absence of recombination between the X and Y chromosomes, which could make these sequences degenerate rapidly by accumulating mutations. The X chromosome was a clearly preferred site for the accumulation of DNA repeats, representing an unusual example of X accumulating more repetitive sequences than Y in fish.

Introdução

O peixe eritrínídeo *Hoplias malabaricus* apresenta uma diversidade de constituições cariotípicas, com sete cariomorfos (A-G) já identificados e diferenciados em relação ao número diplóide, forma e tamanho dos cromossomos e sistemas de cromossomo sexuais, indicando um provável grupo de espécies (Bertollo et al. 1986, 2000). Quatro sistemas de cromossomos sexuais já foram previamente identificados, ou seja, XX/XY no cariomorfo B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no cariomorfo D e XX/XY_1Y_2 no cariomorfo G (Bertollo et al. 2000), além de um sistema XX/XY, em estágio inicial de diferenciação, descrito para o cariomorfo C (Cioffi et al. *in press*).

O cariomorfo B é caracterizado por $2n=42$ cromossomos (40 meta-submetacêntricos + 2 subtelocêntricos nas fêmeas e 41 meta-submetacêntricos + 1 subtelocêntrico nos machos). Este cariomorfo apresenta uma distribuição geográfica relativamente restrita em relação aos demais, sendo até agora identificado apenas no sistema de lagos do Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais, Brasil (Bertollo et al. 2000) e no primeiro planalto do rio Iguazu, Estado do Paraná, Brasil (Lemos et al. 2002). Esta forma cariotípica foi provavelmente derivada do cariomorfo A ($2n=42$ cromossomos, todos meta-submetacêntricos), pela diferenciação de um sistema de cromossomos XX/XY heteromórficos. Neste caso, o cromossomo de X apresenta um tamanho mediano, o único subtelocêntrico presente no cariótipo, enquanto que o cromossomo Y é o menor tamanho e submetacêntrico. Um sítio de RON, associado à uma região heterocromática GC-rica, ocupa uma grande extensão do braço longo do cromossomo X, sugerindo a provável implicação destes DNAs repetitivos na

diferenciação deste sistema de cromossomos sexuais (Born & Bertollo, 2000; Vicari et al. 2003).

DNAs repetitivos constituem uma grande porção do genoma dos eucariotos (Jurka et al. 2005), e uma vez que os cromossomos sexuais de peixes mostram-se enriquecidos por DNAs repetitivos (Martins, 2007), a investigação da organização cromossômica destas seqüências pode fornecer dados informativos sobre a origem e a evolução de cromossomos sexuais no genoma dos peixes. Desta forma, foi realizado o mapeamento cromossômico de cinco classes de DNAs repetitivos (DNAr 18S, DNAr 5S, (GATA)_n, (TTAGGG)_n e da família de DNA satélite 5SHindIII) nos cariomorfos A e B de *H. malabaricus*, por meio de hibridização fluorescente *in situ* (FISH simples e dupla-FISH). Igualmente, a fração C₀t-1DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas de DNA) foi isolada e utilizada como sonda. A localização cromossômica destas seqüências repetitivas expandiu os conhecimentos sobre o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais no cariomorfo B. O cromossomo X foi caracterizado como um local preferencial para o acúmulo de seqüências repetitivas, representando um exemplo incomum do cromossomo X acumulando mais DNAs repetitivos que o cromossomo Y em peixes. Os dados obtidos também reforçaram as evidências quanto à origem independente dos sistemas de cromossomos sexuais entre os cariomorfos de *H. malabaricus*.

Material e Métodos

Espécimes e preparação dos cromossomos mitóticos

Foram analisados nove fêmeas e dez machos de *H. malabaricus* pertencentes ao cariomorfo B e oito fêmeas e sete machos pertencentes ao cariomorfo A, provenientes da bacia do rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce, Estado do Minas Gerais, Brasil) e do rio do Pântano (município de Descalvado, Estado de São Paulo, Brasil), respectivamente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensão celular do rim anterior, utilizando o método convencional de “air-drying” (Bertollo et al. 1978). Os cromossomos foram analisados sequencialmente utilizando a coloração Giemsa convencional e o bandamento C com hidróxido de bário (Sumner, 1972) para detectar as regiões heterocromáticas C-positivas.

Sondas para hibridização cromossômica

Foram utilizadas três seqüências de DNAs repetitivos, isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus*. A primeira sonda consistiu de cópias repetidas de DNAr 5S, incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS) (Martins et al. 2006). A segunda sonda consistiu de uma cópia da seqüência de DNA satélite 5SHindIII-DNA com 360 pares de bases, composta de um segmento com 95 pares de bases com similaridade ao gene de RNAr 5S, e um segmento com 265 pares de bases similar ao NTS da primeira sonda (Martins et al. 2006). A terceira sonda consistiu de um segmento de 1.400 pares de bases do gene de RNAr 18S, obtido por PCR a

partir do DNA nuclear (Cioffi et al. 2009a). A sonda de DNAr 18S foi marcada por nick-translation com DIG-11-dUTP, de acordo com orientações do fabricante (Roche). As sondas de DNAr 5S e 5S*Hind*III-DNA foram marcadas com biotina-14-dATP por nick-translation, também de acordo com orientações do fabricante (Bionick Labelling System, Invitrogen).

O DNA genômico de *H. malabaricus* (cariomorfo B) foi extraído utilizando o procedimento de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001). Uma biblioteca enriquecida com seqüências repetitivas foi construída com base na cinética de renaturação de *C₀t*-1DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas de DNA) (Zwick et al. 1997). Amostras de DNA (200 µl de 100–500ng µl⁻¹ de DNA genômico em 0.3M NaCl) foram autoclavados por 10 minutos a 1,4 atmosferas de pressão e 120°C e o DNA fragmentado foi separado por eletroforese em um gel a 1%. Os fragmentos de DNA obtidos variaram em tamanho de 100 a 100 pares de bases. Amostras de 50µl do DNA fragmentados foram desnaturadas a 95°C durante 10 minutos, colocadas em gelo por 10 segundos e transferidas para um banho de água a 65°C, para o reanelamento do DNA. Após 1 minuto de reanelamento, as amostras foram incubadas a 37°C, por 8 minutos, com 1U da enzima S1 nuclease, permitindo a digestão das fitas simples de DNA. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio. A fração *C₀t*-1DNA foi marcada por nick-translation utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche), e utilizada como sonda para análises de FISH.

Adicionalmente, seqüências (TTAGGG)_n e (GATA)_n foram também utilizadas como sondas. Estas sondas foram geradas por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit,

Roche), na ausência de um DNA molde, utilizando os primers (TTAGGG)₅ / (CCCTAA)₅ e (GATA)₇ / (TATC)₇, respectivamente (Ijdo et al. 1991).

Hibridização fluorescente “in situ” (FISH) e análises cariotípicas

O procedimento de FISH foi realizado conforme Pinkel et al. (1986). As lâminas contendo os cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/ml) por 1,5h a 37°C. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/2xSSC a 70°C, as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 4 minutos a 70°C. As misturas de hibridização, contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida em um volume final de 30 µl, foram aplicadas sobre as lâminas e a hibridização foi realizada por 16 horas a 37°C, em uma câmara úmida contendo 2xSSC. A primeira lavagem pós-hibridação foi realizada em formamida 50%/2xSSC durante 15 minutos a 37°C, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC de 15 minutos, e uma última lavagem em 4xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente. A detecção das sondas foi realizada utilizando avidina-FITC conjugada (Sigma) para as sondas de DNAr 5S e 5SHindIII-DNA, e com anti-digoxigenina-rhodamina (Roche) para as sondas de DNAr 18S, (GATA)_n, (TTAGGG)_n e a fração C_{0t}-1 DNA. As sondas de 5SHindIII-DNA, (GATA)_n, (TTAGGG)_n, e da fração C_{0t}-1 DNA foram detectadas por FISH simples, enquanto as sondas de DNAr 5S e 18S foram detectadas por dupla-FISH. As lavagens de pós-hibridização foram realizados em um *shaker* (150 rpm). Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (50 µg/mL) ou DAPI (1.2 µg/ml). As análises de FISH foram conduzidas em um microscópio

de epifluorescência (Olympus BX50), e as metáfases foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas por espécime para a determinação do número cromossômico diplóide e estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) ou subtelocêntrico (st) de acordo com a relação de braços (Levan et al. 1964).

Resultados e Discussão

Os cariomorfos A e B de *H. malabaricus* apresentam formas cariotípicas semelhantes (Bertollo et al. 2000), sugerindo que o cariomorfo B foi provavelmente derivado do cariomorfo A pelo surgimento de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY. Os espécimes do cariomorfo A possuem $2n=42$ cromossomos e os cariótipos compostos por 11 pares m e 10 pares de sm, sem cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. Por sua vez, embora o cariomorfo B também apresente $2n=42$ cromossomos e uma estrutura cariotípica geral semelhante à encontrada no cariomorfo A, ele difere pela presença de um sistema de cromossomos sexuais XY heteromórficos. Neste caso, as fêmeas se caracterizam por dois cromossomos X subtelocêntricos, enquanto que os machos apresentam apenas um desses cromossomos e um pequeno cromossomo Y submetacêntrico (**fig. 1**). Bandas heterocromáticas C-positivas foram observadas na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos, assim como na região telomérica de vários pares cromossômicos de ambos os cariomorfos (**fig. 1**). Particularmente no cariomorfo B, um conspícuo bloco heterocromático

encontra-se presente no cromossomo X, ocupando uma grande extensão do braço longo.

Estudos anteriores mostraram que os DNAs repetitivos desempenharam um papel importante no processo de evolução genômica de *H. malabaricus*. A ocorrência e a distribuição destas seqüências de DNA nos cromossomos possibilitaram não só uma boa caracterização dos distintos cariomorfos de *H. malabaricus*, como também reforçaram as similaridades entre os cariomorfos A e B (Cioffi et al. 2009b). Os DNAs repetitivos foram considerados, por muito tempo, sem nenhuma função claramente identificada no genoma (Doolittle & Sapienza 1980). Entretanto, papéis funcionais e estruturais importantes têm sido apontados para estas seqüências durante a evolução genômica de uma variedade de organismos (Biemont & Vieira, 2006). Diferentes classes de DNAs repetitivos estão associadas com regiões heterocromáticas dos genomas de muitos eucariotos filogeneticamente distantes, como moscas-de-fruta (Pimpinelli et al. 1995) e plantas (Presting et al. 1998), dando suporte a um papel estrutural destas seqüências na evolução genômica (Dimitri & Junakovic, 1999). Estudos recentes tem também indicado que o acúmulo de DNAs repetitivos podem iniciar o processo de evolução dos cromossomos sexuais (Kejnovsky et al. 2009). De fato, o acúmulo destas seqüências pode gerar diferenças tanto na morfologia como no tamanho entre os cromossomos sexuais (Charlesworth, 1978).

5SHindIII-DNA é um DNA satélite previamente isolado do genoma de *H. malabaricus*, que compartilha semelhanças com o DNAr 5S. Essa classe de DNA foi provavelmente originada de segmentos duplicados de DNAr 5S, mostrando localização exclusiva na região de centromérica dos cromossomos (Martins et al.

2006). Este padrão de distribuição foi o mesmo encontrado para todos os cariomorfos analisados até o momento e sugere um envolvimento desta classe de DNA repetitivo nas funções centroméricas de *H. malabaricus* (Martins et al. 2006; Cioffi et al. 2009b). Os cariomorfos A e B compartilharam oito pares cromossômicos portadores destes sítios, além do sítio presente no menor par submetacêntrico (nº 21) do cariomorfo A e nos cromossomos X e Y do cariomorfo B (**fig. 2 A2, B2, B4**).

Seqüências teloméricas (TTAGGG)_n estão presentes nos telômeros dos cromossomos de todos os vertebrados. Análises destas seqüências podem evidenciar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, como fusões Robertsonianas ou inversões, envolvidas na evolução cariotípica (Meyne et al. 1989). FISH com sondas de seqüências (TTAGGG)_n mostrou sinais de hibridização nos telômeros de todos os cromossomos. Sinais intersticiais (ITS) não foram detectados em ambos os cariomorfos, inclusive nos cromossomos sexuais, indicando que fusões Robertsonianas ou translocações cromossômicas provavelmente não estiveram envolvidas na diferenciação do sistema XY do cariomorfo B (**fig. 3 A1, B1, B3**).

As repetições (GATA) são o principal componente de um DNA satélite denominado Bkm (“banded krait minor satellite DNA”), isolado do cromossomo W de cobras da espécie *Elaphe radiata* (Epplen et al. 1982; Jones and Singh, 1985). Estas repetições têm se mostrado associadas com os cromossomos sexuais de vários eucariotos e podem desempenhar um papel importante na evolução destes cromossomos e na organização dos genomas (Singh & Jones 1982; Epplen et al. 1982; Singh et al. 1984; Jones & Singh, 1985). Além disso, um papel funcional das

seqüências (GATA) na regulação gênica do cromossomo Y foi também proposto (Subramanian et al. 2003). Entre os peixes, estas repetições permitiram a detecção de diferenças moleculares e estruturais até mesmo entre cromossomos sexuais aparentemente homomórficos de “guppy” (Nanda et al. 1990). Em *Halobatrachus didactylus*, foi evidenciada, pela primeira vez, uma concentração específica das seqüências (GATA) nos cromossomos desta espécie (Merlo et al. 2007). Em *H. malabaricus*, os cariomorfos A e B mostraram uma distribuição dispersa destas seqüências no genoma, com um acúmulo preferencial na região distal de alguns cromossomos. Entretanto, foi evidente uma concentração destas seqüências no menor par submetacêntrico do cariomorfo A (par nº 21) (**fig. 3 A2**), e nos braços longos dos cromossomos X e Y do cariomorfo B (**fig. 3 B2, B4**).

Experimentos de dupla-FISH com sondas de DNAr 5S e 18S mostraram que estas seqüências não apresentam uma condição sintênica em ambos os cariomorfos. As seqüências de DNAr 5S foram localizadas em um pequeno par de cromossomos metacêntricos, compartilhado pelos cariomorfos A e B, além de um exclusivo sítio proximal localizado nos braços curtos de um par submetacêntrico grande, no cariomorfo A (**fig. 2 A1, B1, B3**). Por sua vez, os sítios de DNAr 18S mostraram uma localização proximal ou na região telomérica dos cromossomos. No último caso, sítios biteloméricos (presentes em ambos os telômeros), puderam ser também observados. Os cariomorfos A e B apresentaram quatro pares de cromossomos portadores de tais sítios, três deles compartilhados por ambos os cariomorfos. O quarto sítio mostrou uma localização exclusiva no cariomorfo A, na região telomérica do menor par submetacêntrico, ou no cariomorfo B, na região intersticial de um par metacêntrico. Além disso, um sítio

conspícuo foi também localizado no cromossomo X do cariomorfo B, ocupando uma grande extensão do braço longo (**fig. 2 A1, B1, B3**). Estudos prévios evidenciaram uma condição polimórfica para o cromossomo X em relação à quantidade de heterocromatina C-positiva e ao segmento de NOR a ela associado (Born & Bertollo, 2000). Entretanto, este polimorfismo não foi caracterizado em relação aos espécimes agora analisados.

Poucos exemplos de cromossomos de X portadores de NORs são conhecidos em vertebrados, como no morcego *Carollia perspicillata* (Goodpasture & Bloom, 1975; Morielle & Varella-Garcia, 1988), no roedor *Akodon arviculoides* (Yonenaga-Yassuda et al. 1983) e no anfíbio *Gastrotheca riobambae* (Schmid et al. 1983). NORs localizadas nos cromossomos sexuais de peixes já foram encontradas em algumas espécies, como em *Fundulus diaphanus* (Howell & Black, 1979), em *Salvelinus alpinus* (Reed & Phillips, 1997) e em *Triportheus*. Neste último caso, todas as espécies analisadas apresentaram cistrons de DNAr no cromossomo W, fato este que indica uma provável condição basal neste gênero de peixes (Artoni & Bertollo, 2002, Diniz et al. 2008). Em *H. malabaricus*, além do cariomorfo B, ora analisado, a associação NOR/cromossomos sexuais também ocorre no cariomorfo D (Cioffi et al. *in press*), portador de um sistema X_1X_2Y de cromossomos sexuais.

Mudanças estruturais devem ter ocorrido durante o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais para a supressão parcial ou completa do crossing-over entre os dois cromossomos inicialmente homomórficos no sexo heterogamético (Ohno, 1967; Charlesworth, 1978). Os cromossomos sexuais são locais favorecidos no tocante ao acúmulo de várias repetições simples, e o

heteromorfismo desses cromossomos evoluiu independentemente em diferentes grupos, usando vários tipos de mecanismos moleculares para acumular elementos repetitivos (Bull, 1983). Acredita-se que o acúmulo destas seqüências, resultado de processos de transposição e amplificação, ocorra primeiramente na região adjacente à região sexo-determinante do cromossomo Y, favorecido pela ausência ou baixa freqüência de eventos de recombinação nesta área (Nanda et al. 2000). Após a supressão do processo de crossing-over, o par sexual evolui para o heteromorfismo, conduzindo o isolamento crescente do cromossomo Y e criando a possibilidade para diferenciações adicionais (Bull, 1983; Charlesworth, 1991).

O mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos permitiu verificar que estas seqüências tiveram um papel importante no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais em *H. malabaricus*, como comprovado seu pelo padrão de distribuição nos cromossomos XY. A Figura 4 resume essa distribuição, destacando o menor par submetacêntrico do cariomorfo A (nº 21) e os cromossomos X e Y do cariomorfo B. O cromossomo X apresenta um conspícuo sítio de DNAr 18S na região distal do braço longo e ambos os cromossomos X e Y possuem um sítio de 5SHindIII-DNA na região centromérica, bem como uma concentração de sequencias (GATA) nos braços longos. Estes cromossomos e o par nº 21 mostram-se bem relacionados, uma vez que a distribuição das seqüências (GATA) e dos sítios de DNAr 18S e de 5SHindIII-DNA nesses cromossomos reforçam suas similaridades, indicando assim a provável derivação do par sexual do cariomorfo B a partir do par nº 21 do cariomorfo A. Enquanto as seqüências (GATA) aparentemente não apresentam grandes diferenças quantitativas entre os cromossomos X e Y, o DNAr 18S passou por um processo

claro de acúmulo nos braços longos do cromossomo X, diferindo-o grandemente do cromossomo Y (**fig. 4C**).

Entre os peixes Salmonídeos, foi proposto um importante papel para os locos de DNAr 18S nos prováveis cromossomos sexuais destas espécies, os quais poderiam limitar a possibilidade de recombinações adicionais próximas de um loco sexo-determinante (Reed & Phillips, 1997). De modo semelhante, não se pode descartar um possível papel para os DNAs repetitivos associados com as NORs, ou até mesmo para as próprias multicópias de DNAr, na diferenciação do sistema XX/XY do cariomorfo B de *H. malabaricus*.

Na maioria dos casos conhecidos, o cromossomo Y, em sistemas XY, ou o cromossomo W, em sistemas ZW, apresentam sinais de degeneração e/ou mostram uma clara tendência para acumular seqüências repetitivas, sendo parciais ou completamente heterocromáticos (Devlin & Nagahama, 2002; Graves et al. 2008). Em diferentes taxa, o acúmulo de seqüências especificamente nos cromossomos Y sugere que estes cromossomos são enriquecidos com seqüências altas, baixas e moderadamente repetitivas e contêm somente alguns genes funcionais (Steinmann & Steinmann, 1992; Shibata et al. 1999; Ishizaki et al. 2002; Mariotti et al. 2009). No presente caso, entretanto, uma grande parte do cromossomo X é heterocromática e está claramente acumulando mais seqüências repetitivas do que o cromossomo Y. A hibridização da fração C_{0t-1} DNA também corroborou o padrão de distribuição de heterocromatina, mostrando o acúmulo de seqüências alta-e moderadamente repetitivas no cromossomo X, em contraste com o cromossomo Y (**fig. 4D, E**). Assim sendo, os resultados ora obtidos indicam que o cromossomo X foi o local preferencial para o acúmulo de repetições,

representando um exemplo incomum de cromossomo X acumulando mais DNAs repetitivos que o cromossomo Y em peixes. Contudo, é notável que os sítios de DNAr 18S, presentes no par ancestral nº 21, foi perdido no cromossomo Y. A falta de recombinação entre os cromossomos X e Y poderia fazer com que estas seqüências de DNA se degenerassem rapidamente devido ao acúmulo de mutações, explicando, desta forma, sua ausência no cromossomo Y atual.

Vem se tornando evidente que a diferenciação dos cromossomos sexuais provavelmente ocorreu de forma independente entre as diferentes linhagens de peixes, resultando em uma grande variedade de diferentes sistemas (Almeida-Toledo et al. 1993; Graves, 2008). No caso de *H. malabaricus*, resultados prévios de bandamentos C e G mostraram que o sistema X_1X_2Y encontrado no cariomorfo D se originou por rearranjos cromossômicos (Bertollo et al. 1997a, 1997b; Cioffi et al. *in press*). Heterocromatinização vs. rearranjos cromossômicos apontam para origens independentes dos cromossomos sexuais presentes nos cariomorfos B e D, respectivamente, confirmando uma provável origem polifilética para estes cromossomos em *H. malabaricus*. Uma análise comparativa utilizando sondas obtidas por microdissecção está sendo prevista em estudos futuros, para confirmação da presente proposta.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. Indrajit Nanda pelos comentários e sugestões pertinentes no manuscrito e ao Dr. Jorge A. Dergam e MSc. Uedson Jacobina pela colaboração na obtenção de espécimes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - proc. n. 2007/05565-

5), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- proc. n. 083/2007).

Referências

- Almeida-Todelo LF, Foresti F, Oliveira C: A citogenética de peixes no Brasil. In: Anais do X Encontro Brasileiro de Ictiologia. Instituto Oceanográfico, São Paulo, pp. 347-376 (1993).
- Artoni RF, Bertollo LAC: 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 (2002).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103-120 (1978).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM: Cytogenetics and taxonomy considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 28:153-159 (1986).
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J: The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* 5:493-499 (1997a).
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS: Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with 2n = 40 chromosomes. *Brazil J Genet* 20:237-242 (1997b).
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O: A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey,

- geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chromosome Res 8:603–613 (2000).
- Biémont C, Vieira C: Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. Nature 443:521-524 (2006).
- Born GG, Bertollo LAC: An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. Chromosome Res 8: 111-118 (2000).
- Bull JJ: Evolution of Sex Determination Mechanisms. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1983).
- Charlesworth B: A model for the evolution of Y chromosomes and dosage compensation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 5618-5622 (1978).
- Charlesworth B: Transposable elements in natural populations with a mixture of selected and neutral insertion sites. Genet Res 57: 127-134 (1991).
- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. Cytogenet Gen Res 125:132-141 (2009a).
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. BMC Genetics 10:34 (2009b).
- Devlin RH, Nagahama T: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208:191-364 (2002).

- Dimitri P, Junakovic N: Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet* 15:123–124 (1999).
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC: Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Tripottheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 122: 163-168 (2008).
- Doolittle WF, Sapienza C: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603 (1980).
- Eppelen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S: Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3798–3802 (1982).
- Graves JAM: Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 42: 565-586 (2008).
- Goodpasture C, Bloom SE: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37–50 (1975).
- Howell WM, Black DA: Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. *Copeia* 3:544–546 (1979).
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780 (1991).

Jones KW, Singh L: Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends Genet* 1: 55–61 (1985).

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110:462–467 (2005).

Kejnovsky E, Hobza R, Cermák T, Kubát Z, Vyskot B: The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102: 533-541 (2009).

Lemos PMM, Fenocchio AS, Bertollo LAC, Cestari MM: Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau or the Iguaçú river basin (Paraná state, Brazil). *Caryologia* 55: 193-198 (2002).

Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220 (1964).

Mariotti B, Manzano S, Kejnovsky E, Vyskotc B, Jamilena M: Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. *Molecular Genet and Genomics* 281:249-259 (2009).

Martins C: Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, pp 421–453 (2007).

Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141 (2006).

- Merlo A, Cross I, Palazon JL, Sarasquete C, Rebordinos L: Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and (TTAGGG)_n by one-color and double-color FISH in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Teleostei: Batrachoididae). *Genetica* 131: 195-200 (2007).
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7049–7053 (1989).
- Morielle E, Varella-Garcia M: Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Brazil J Genet* 11: 853–871(1988).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JC: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30: 456–462 (1990).
- Nanda I, Volff JN, Weis S, Körting C, Froschauer A, Schmid M, Scharl M²: Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 109 :173-180 (2000).
- Ohno S: Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin Heidelberg New York (1967).
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R: Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3804–3808 (1995).
- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938 (1986).

- Presting GG, Malysheva L, Fuchs J, Schubert I: A Ty3/gypsy retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *Plant J* 6:721–728 (1998).
- Reed KM, Phillips RB: Polymorphism of the nucleolar organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chrom Res.* 5: 221–227 (1997).
- Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, third edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NewYork (2001).
- Schmid M, Haaf T, Geile B, Sims S: Chromosome banding in Amphibia. VIII. An Unusual XY/XX- sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 88:69-82 (1983).
- Singh L, Jones KW: Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome. *Cell* 28:205–216 (1982).
- Singh L, Phillips C, Jones KW: The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. *Cell* 36:111–120 (1984).
- Steinemann M, Steinemann S: Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7591- 7595 (1992).
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L: Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): Predominant association with sex chromosomes and potencial role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19 :681-685 (2003).

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.

Exp Cell Res 75:304-306 (1972).

Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC: Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. Cytogenet Genome Res 101:24-28 (2003).

Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'Abbate M, Souza MJ: Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. Cytogenet Cell Genet 35: 143-147 (1983).

Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Nurul-Islam-Faridi M, Stelly DM: A rapid procedure for the isolation of C0t-1DNA from plants. Genome 40:138-142 (1997).

Figuras

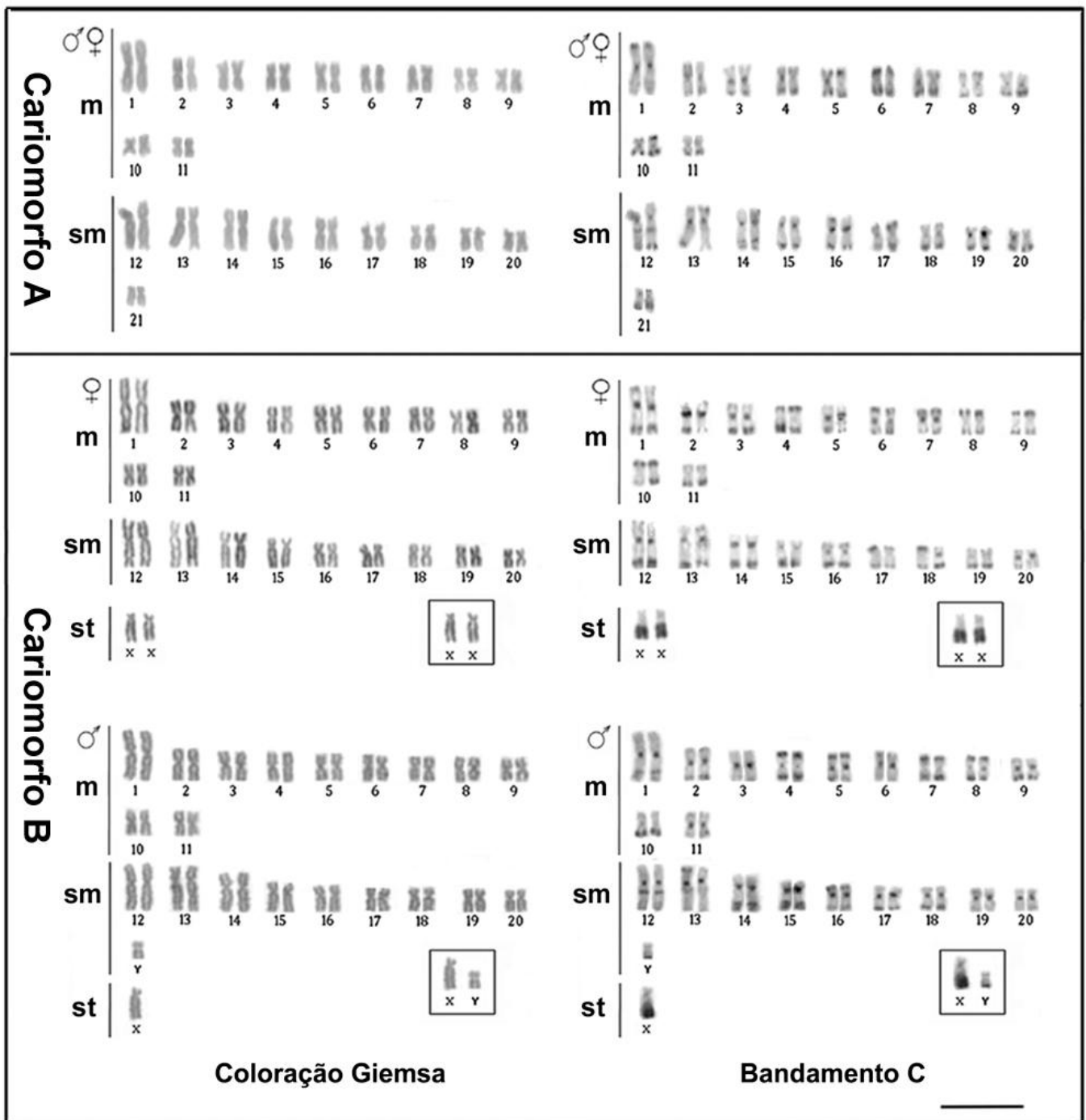


Figura 1. Cariótipos dos cariomorfos A e B de *Hoplias malabaricus*, analisados seqüencialmente pela coloração Giemsa convencional (esquerda) e bandamento C (direita). Os cromossomos sexuais dos cariomorfos B estão destacados. Note as conspícuas bandas heterocromáticas C positivas no braço longo do cromossomo X. Barra = 5 μm

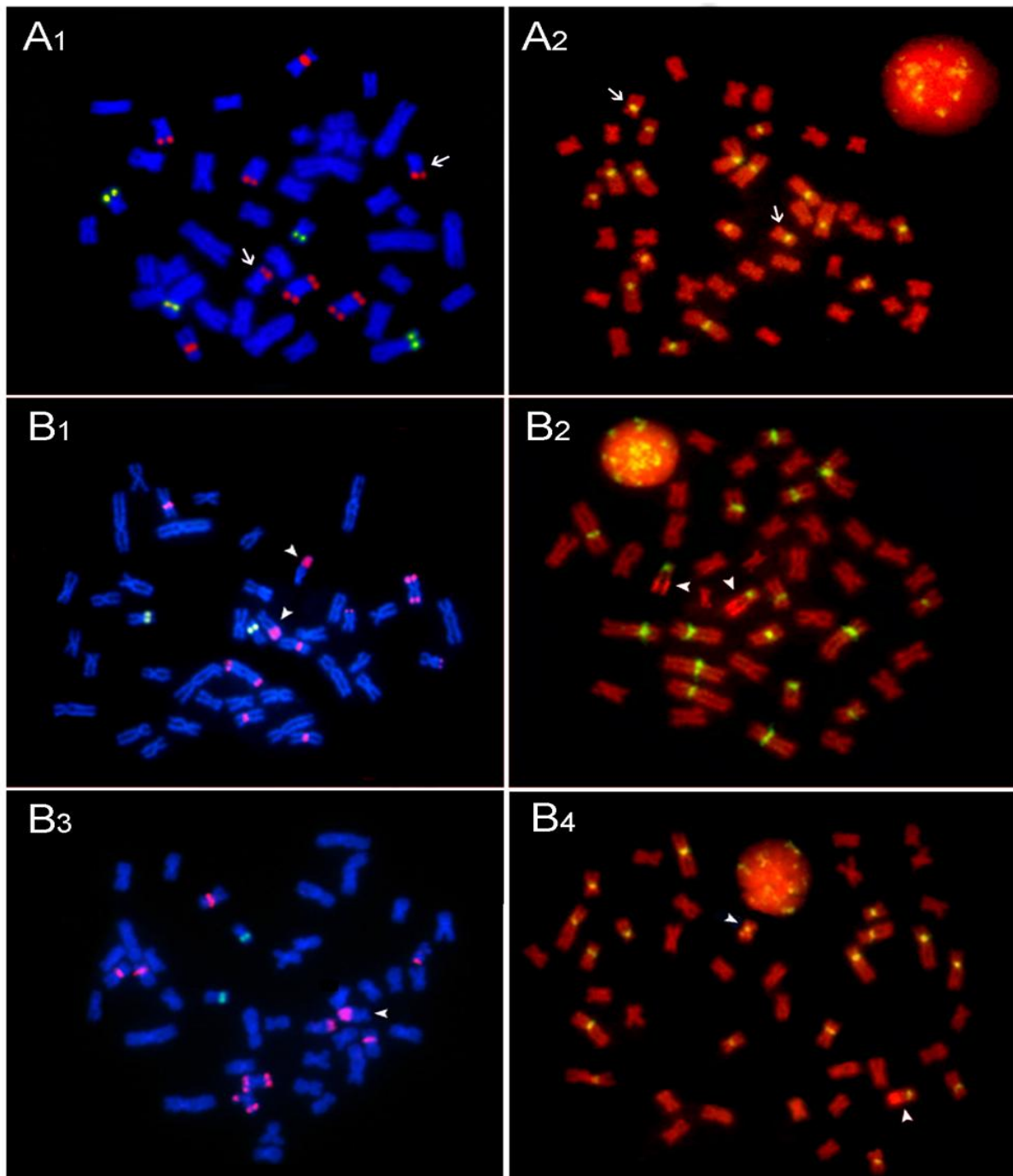


Figura 2. Metáfases de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização cromossômica dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) após dupla-FISH (A1, B1 e B3) e os sítios de 5SHindIII-DNA (A2, B2 e B4). A se refere aos machos e às fêmeas do cariomorfo A; B1 e B2 se referem às fêmeas e B3 e B4 se referem aos machos do cariomorfo B. As setas indicam o menor par submetacêntrico do cariótipo (n° 21) do cariomorfo A e as cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais do cariomorfo B.

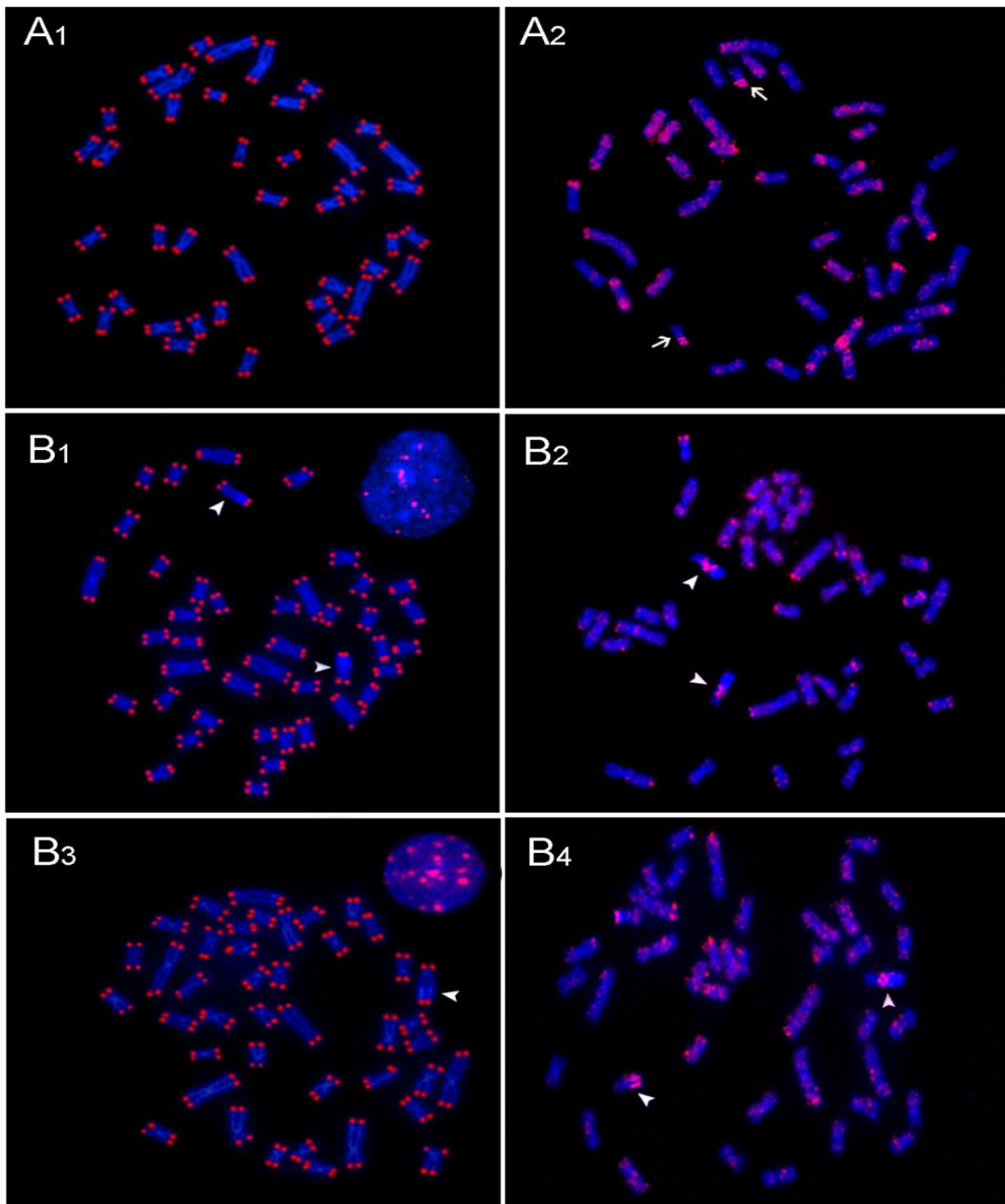


Figura 3. Metáfases de *Hoplias malabaricus* mostrando a localização das sequencias $(TTAGGG)_n$ (A1, B1 and B3) e $(GATA)_n$ (A2, B2 and B4) nos cromossomos. A se refere aos machos e às fêmeas do cariomorfo A; B1 e B2 se referem às fêmeas e B3 e B4 se referem aos machos do cariomorfo B. As setas indicam o menor par submetacêntrico do cariótipo (n° 21) do cariomorfo A e as cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais do cariomorfo B.

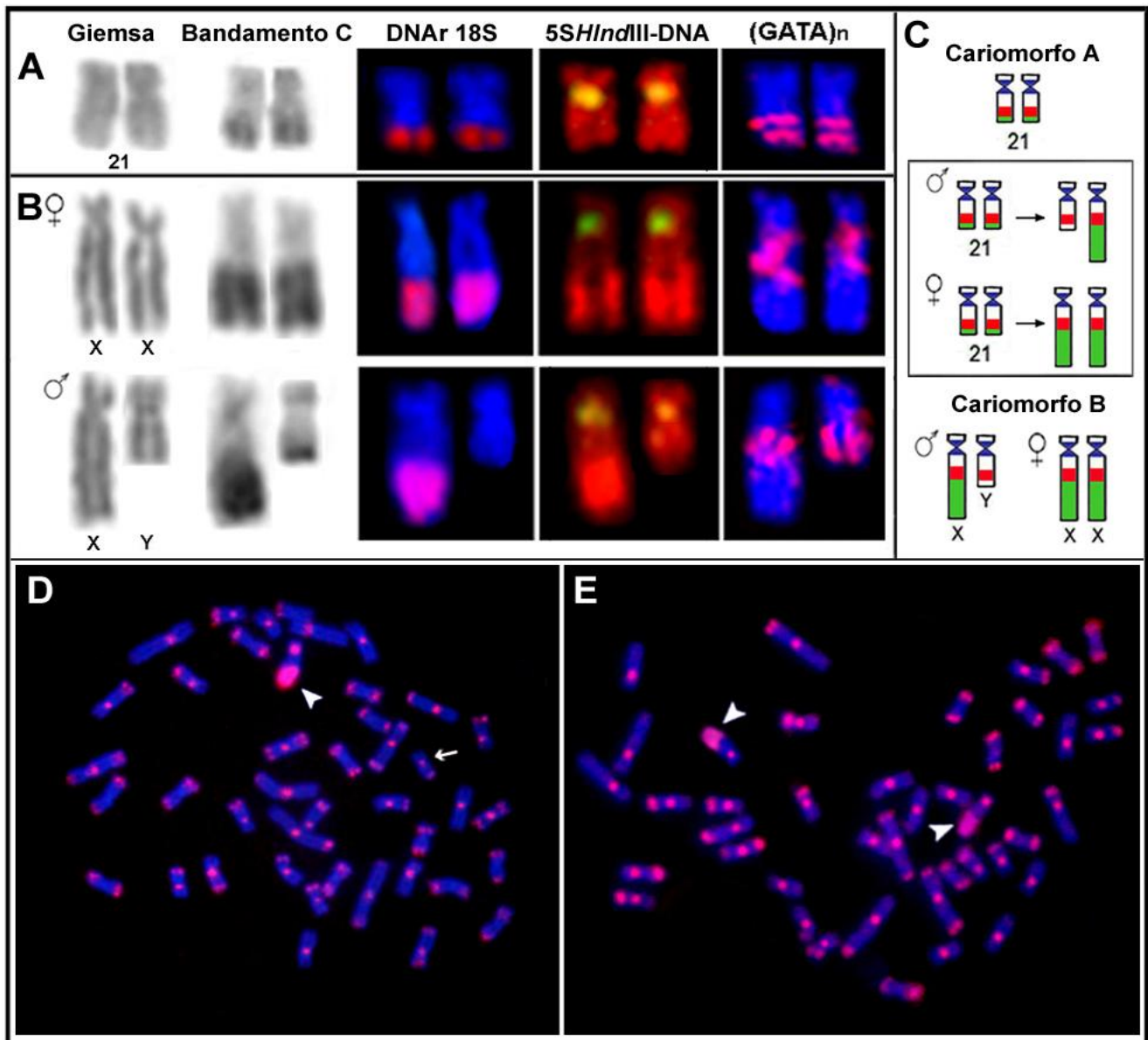


Figura 4. Par cromossômico nº 21 do cariomorfo A, e os cromossomos X e Y do cariomorfo B, evidenciando as bandas C e os sítios de DNAr 18S, 5SHindIII-DNA e (GATA)_n. C mostra um idiograma representativo dos cromossomos X e Y indicando a diferenciação do braço longo do cromossomo X pelo acúmulo de heterocromatina e de seqüências de DNAr 18S, a partir de um par ancestral homomórfico semelhante ao par cromossômico No. 21 encontrado no cariomorfo A. Em azul está representado o satélite 5SHindIII-DNA, em vermelho as repetições (GATA)_n e em verde as seqüências repetitivas (heterocromatina e DNAr 18S) no
(continua na próxima página)

cromossomo X. D e E mostram a hibridização da fração C_{0t-1} DNA nos cromossomos de machos e fêmeas do cariomorfo B, respectivamente. As cabeças de seta evidenciam a acumulação de seqüências alta e moderadamente repetitivas nos cromossomos X. A seta indica o provável cromossomo Y.

5- Conclusões Gerais

Os DNAs repetitivos apresentam uma alta dinâmica evolutiva, parecendo escapar da pressão seletiva que age nos segmentos não-repetitivos e representando bons marcadores para detecção de eventos evolutivos recentes. Esta fração repetitiva se mostrou importante no processo de evolução genômica do peixe *H. malabaricus*, conforme evidenciado pela presença e distribuição destas seqüências nos cromossomos.

Apesar das diferenças existentes quanto ao número diplóide e ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados, os quatro cariomorfos analisados – A, B, C e D - apresentaram uma estrutura cariotípica relacionada entre si, basicamente formada por cromossomos meta-submetacêntricos. O mapeamento citogenético de diferentes classes de DNAs repetitivos forneceu marcadores cromossômicos resolutivos, permitindo evidenciar relacionamentos próximos entre os quatro cariomorfos, dando assim suporte adicional à proposta de que os mesmos constituem um grupo evolutivo bem aparentado - Grupo I - em *H. malabaricus*. Além disso, os dados obtidos também possibilitaram evidenciar a maior proximidade evolutiva entre os cariomorfos A-B e os cariomorfos C-D, com base nas especificidades por eles compartilhadas.

Especificamente em relação ao cariomorfo A, três populações alopátricas foram também analisadas. Todas apresentaram a composição cariotípica característica desse cariomorfo, também suportada pela distribuição semelhante das regiões heterocromáticas C-positivas nos cariótipos, sem diferenças conspícuas. O mapeamento de três classes de seqüências repetitivas de DNA

evidenciou vários cromossomos compartilhados pelas três populações, reforçando o relacionamento entre elas. Entretanto, foram também detectados sítios exclusivos, provavelmente em consequência de um fluxo gênico restrito entre as populações, isoladas em bacias hidrográficas distintas. Em duas destas populações, bem como nas demais até então analisadas, os sítios de DNAr 18S e 5S sempre foram localizados em cromossomos independentes. Entretanto, a ocorrência de sintenia entre esses sítios foi claramente evidenciada em uma das populações ora analisadas, representando o primeiro caso descrito para *H. malabaricus*.

Dentre todos os marcadores utilizados, o DNAr 5S se mostrou um bom marcador populacional, mostrando diferenças mais significativas não só entre os diferentes cariomorfos, como também entre as três populações do cariomorfo A analisadas. Assim sendo, independentemente de grandes variações nos cariótipos, o mapeamento de DNAs repetitivos permitiu a detecção de eventos evolutivos recentes, informativos para a caracterização adicional da diversidade cromossômica presente em *H. malabaricus*.

Este grupo de peixes também provou ser um excelente modelo para estudos de diferenciação e evolução de cromossomos sexuais. Além dos sistemas XY, X_1X_2Y e XY_1Y_2 previamente identificados, um novo registro foi agora caracterizado, onde um sistema críptico de cromossomos sexuais XY mostrou-se presente no cariomorfo C, onde os cromossomos X e Y diferiram apenas ligeiramente entre si, caracterizando um estágio inicial de diferenciação dos cromossomos sexuais. Embora estas diferenças não foram claramente detectadas com base no padrão de bandas C-positivas, diferenças em relação ao tamanho dos

sítios das seqüências de DNAr 18S e da heterocromatina GC-rica foram detectadas, caracterizando uma condição homomórfica nas fêmeas e heteromórfica nos machos, mostrando que estas duas classes de DNAs repetitivos estão envolvidas neste estágio de diferenciação dos cromossomos sexuais.

Esse sistema XY mostrou-se claramente correlacionado com a origem do sistema X_1X_2Y de cromossomos sexuais encontrado no cariomorfo D. De fato, uma perfeita correspondência foi encontrada entre os cromossomos X e Y (cariomorfo C) e os cromossomos X_1 e neo-Y (cariomorfo D), respectivamente, apresentando o mesmo heteromorfismo de tamanho relativo aos sítios $CMA_3^+/DAPI^-$ e aos sítios de DNAr 18S. A análise dos cromossomos meióticos no cariomorfo D reforçaram os resultados mitóticos, confirmando o número esperado de sítios de DNAr 18S em células espermatogoniais, de prófase e metáfase II, assim como o conspicuo sítio observado no trivalente meiótico resultante do pareamento dos cromossomos X_1 e neo-Y.

O par cromossômico nº 20 do cariomorfo C e o cromossomo X_2 do cariomorfo D, também mostraram-se relacionados com base nos marcadores utilizados, ambos exibindo sítios centroméricos de 5SHindIII-DNA. Já o cromossomo neo-Y apresentou um sítio intersticial exclusivo no braço longo, ao que tudo indica correspondente ao centrômero do cromossomo nº 20 fusionado sobre o Y ancestral, dando origem a um neo-Y dicêntrico, onde o centrômero adicional, deve estar sendo mantido sob forma inativa. A presença de um ITS, mapeado na região do cromossomo neo-Y onde a fusão original deve ter ocorrido, dá um forte suporte a fusão em tandem $Ypter/20pter$ que resultou na formação desse novo cromossomo.

Foi anteriormente proposto que o cariomorfo B tenha se derivado do cariomorfo A pelo surgimento de um sistema XX/XY de cromossomos sexuais, onde o X corresponde ao único cromossomo subteloentrico do cari6tipo. De fato, os dados ora obtidos indicam que os cromossomos sexuais XY do cariomorfo B e o par autoss6mico n6 21 do cariomorfo A s6o relacionados, com base na distribu76o das seq6ncias (GATA), dos s6tios de DNAr 18S e de 5SHindIII-DNA nestes cromossomos. Enquanto que as seq6ncias (GATA) aparentemente n6o apresentam grandes diferen7as quantitativas entre os cromossomos X e Y, o DNAr 18S associado 6 heterocromatina C-positiva passou por um processo claro de ac6mulo no bra7o longo do cromossomo X, diferindo-o grandemente do cromossomo Y. Assim sendo, a diferencia76o do cromossomo X ocorreu pelo ac6mulo na quantidade de heterocromatina e de seq6ncias de DNAr 18S a partir de um par ancestral homom6rfico semelhante ao cromossomo n6 21 do cariomorfo A. Uma grande parte do cromossomo X 6 heterocrom6tica e claramente acumulou mais seq6ncias repetitivas que o cromossomo Y. A hibrida76o da fra76o Cot-1 DNA complementou esta an6lise, mostrando a abund6ncia de seq6ncias alta- e moderadamente repetitivas acumuladas no cromossomo X. Assim sendo, o cromossomo X foi o local preferencial para o ac6mulo de repeti76es de DNA, representando um exemplo incomum de cromossomo X acumulando mais DNAs repetitivos do que o cromossomo Y nos peixes.

Em conclus6o, embora a estrutura cariot6pica geral dos cariomorfos de *H. malabaricus* seja mantida, seus genomas est6o em constante evolu76o, como demonstrado pelas varia76es cromoss6micas observadas em rela76o aos s6tios de

DNAs repetitivos mapeados nos cromossomos. Por sua vez, os resultados obtidos também apontam para origens independentes dos sistemas de cromossomos sexuais XY do cariomorfo B em relação ao cariomorfo C e, por conseguinte, também em relação ao sistema X_1X_2Y do cariomorfo D, dando assim suporte a provável origem polifilética desses cromossomos em *H. malabaricus*.

Biografia

Marcelo de Bello Cioffi é formado em Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2004-2007). Iniciou seus estudos na Citogenética de Peixes em 2005 sob orientação do Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, sendo bolsista de Iniciação Científica por 1 ano pelo CNPq e 6 meses pela FAPESP. Foi também bolsista pela FAPESP durante o mestrado. Possui atualmente 7 artigos aceitos/publicados em periódicos.

- Diniz D, Laudicina A, **Cioffi MB**, Bertollo LAC: Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research** 122: 163-168 (2008).
- **Cioffi MB**, Martins C, Bertollo LAC: Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC genetics** 10:34 (2009).
- **Cioffi MB**, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research** 125:132-141 (2009).
- Santos U, Volcker CM, Belei FA, **Cioffi MB**, Bertollo LAC, Paiva R, Dergam JA: Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Journal of Fish Biology** 75: 2326-2343 (2009).

- **Cioffi MB**, Bertollo LAC: Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity** (*in press*)

- **Cioffi MB**, Martins C, Rebordinos L, Vicari MR, Bertollo LAC: Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus*. Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual development** (*in press*).

- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Almeida MC, **Cioffi MB**, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF: Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology** (*in press*).

Anexos

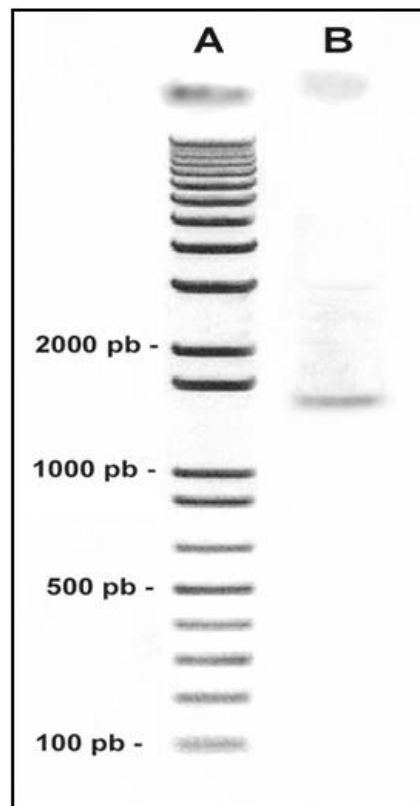


Figura 1. Fragmento amplificado de DNAr 18S de *Hoplias malabaricus*, com tamanho aproximado de 1.400 pares de bases. (A) 1Kb Plus DNA Ladder; (B) DNAr 18S.

```

LOCUS      FJ577367                312 bp    DNA       linear    VRT 09-OCT-
2009
DEFINITION Hoplias malabaricus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  FJ577367
VERSION    FJ577367.1  GI:221185989
KEYWORDS   .
SOURCE     Hoplias malabaricus
  ORGANISM Hoplias malabaricus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Ostariophysi;
            Characiformes; Erythrinidae; Hoplias.
REFERENCE  1 (bases 1 to 312)
  AUTHORS  Cioffi, M.B., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U. and
            Bertollo, L.A.
  TITLE    Chromosomal variability among allopatric populations of
of
            Erythrinidae fish Hoplias malabaricus: mapping of three classes
            of
            repetitive DNAs
  JOURNAL  Cytogenet. Genome Res. 125 (2), 132-141 (2009)
  PUBMED   19729917
REFERENCE  2 (bases 1 to 312)
  AUTHORS  Bello, M.C., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U. and
            Bertollo, L.A.C.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (18-DEC-2008) Institute of Bioscience, UNESP - Sao
Paulo
            State University, Rubiao Jr., Botucatu, SP 18618000, Brazil
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..312
            /organism="Hoplias malabaricus"
            /mol_type="genomic DNA"
            /db_xref="taxon:27720"
  rRNA    <1..>312
            /product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1  ccgcttttggg  gactcttgat  nacctcgggtg  cctgacgcgcg  cgcctctctgc  ggcgcgcgcac
61  gtctcattcgc  acatgtctgc  cctntcaact  ttcgggtggta  ctatagtgcgc  cctaccatgg
121  tgaccacggg  taacgngaa  tcanggggttc  gattccgcga  gagggagcct  gagaaacgga
181  ataccacatc  caaggaaggc  agcacgcgcg  tttataccca  ttaccgcaca  cggggaggta
241  gtgacgaaca  aataacgata  caggtctctt  tcgaagnac  ctagtaaatc  agcgaatcga
301  gcgtatccta  aa

```

Figura 2: Seqüência parcial do gene que codifica o RNA ribossomal 18S depositada no GenBank sob número de acesso FJ577367.

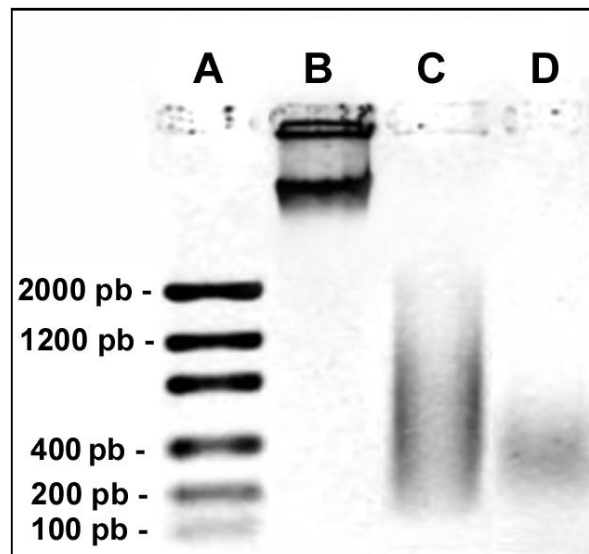


Figura 3. Fração C_{0t-1} DNA de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo B). (A) *Low DNA Mass Ladder*; (B) DNA genômico total; (C) DNA genômico após autoclavagem por 10 minutos; (D) fração C_{0t-1} DNA.

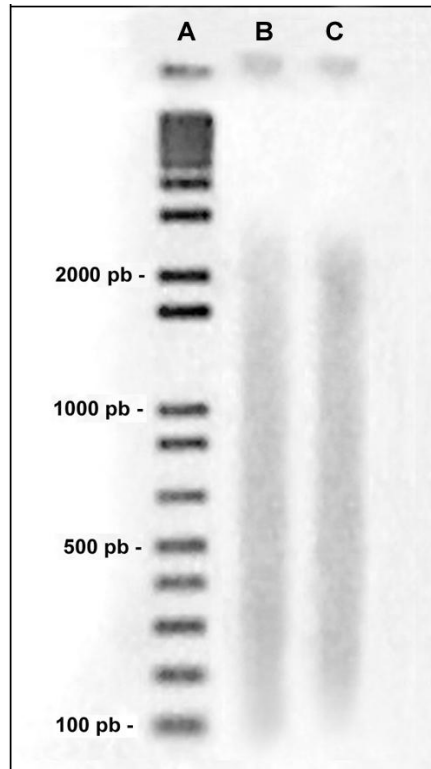


Figura 4: Seqüências de DNA telomérico $(TTAGGG)_n$ e $(GATA)_n$ por PCR, na ausência de um DNA molde. (A) *1Kb Plus DNA Ladder*; (B) Seqüências $(TTAGGG)_n$; (C) Seqüências $(GATA)_n$.