

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise citogenética de populações do
gênero *Pimelodus* da bacia do rio Paranaíba.**

Aluna: Ana Carolina Humanes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

UBERLÂNDIA - MG

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise citogenética de populações do
gênero *Pimelodus* da bacia do rio Paranaíba.**

Aluna: Ana Carolina Humanes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG

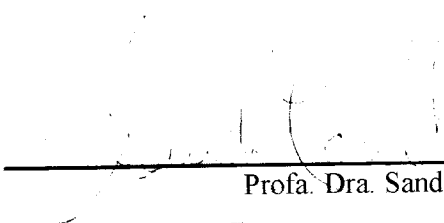
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


**Análise citogenética de populações do
gênero *Pimelodus* da bacia do Rio Paranaíba.**

Ana Carolina Humanes

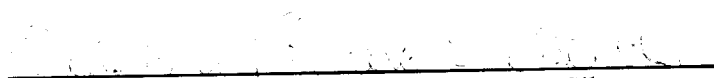
Aprovado pela Banca Examinadora em: 21/01/2007 Nota: 8,0



Prof. Dra. Sandra Morelli



Prof. Dr. Luiz Carlos Guilherme



Msc Sabrina Vaz dos Santos e Silva

Uberlândia, 21 de Jan de 2007.

Dedico esta monografia à minha avó Beatriz, por quem serei eternamente grata por todo cuidado, carinho, doçura e amor. Você é um exemplo de pessoa para mim, minha querida “vovis”.

AGRADECIMENTOS

À orientadora e amiga Prof^a Dr^a. Sandra Morelli, pela orientação, incentivo, ensinamentos, paciência e, acima de tudo, pela amizade e conversas descontraídas durante meus anos no laboratório;

Ao Instituto de Genética e Bioquímica, que proporcionou as condições para o desenvolvimento desta monografia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro;

Aos amigos do laboratório, Roberto, Sabrina, Robson, Leonardo, Roosevelt e Alessandra, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e orientar e, também, pelas conversas e muitas risadas que tornaram esse trabalho mais leve e agradável;

Ao técnico do laboratório, José Clinedor dos Santos, por me proporcionar a base deste trabalho. Sem suas coletas de horas e, às vezes, dias, este trabalho não seria possível de ser feito;

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Guilherme, por ter me orientado no começo do estágio e no Parque do Sabiá, pelos vários ensinamentos e por ser membro da banca do meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Paulo Eugênio e seus orientados, principalmente a Luciana, por me receberem em seu laboratório, onde pude completar parte deste trabalho;

Ao Prof. Francisco Langeani, da Universidade Estadual Paulista, pela identificação de alguns espécimes, que foram de fundamental importância para este trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias, da Universidade Estadual de Londrina, por me disponibilizar artigos e me atender com muita simpatia e prontidão;

Aos meus pais, Adilson e Vilma, por todo apoio, amor, carinho, compreensão, dedicação, ajuda nas horas difíceis e, até, pelas broncas que me ajudaram a crescer;

À minha avó Beatriz, que desde pequena sempre esteve ao meu lado, me dando todo suporte, amor, conselhos e carinho, tão importantes para mim;

Aos meus irmãos, Patrícia e André, pela amizade, carinho e confiança ao longo de todos esses anos;

À todos familiares, que de alguma forma, me incentivaram e contribuíram para esta conquista;

Aos amigos da faculdade, pelos momentos de felicidade, por terem sido meu principal apoio em Uberlândia e por terem me ajudado por muitas vezes. Quando relembrar dos tempos bons da faculdade é de vocês, minha “grande família”, que recordarei; e

Às minhas amigas Ana Paula, Bárbara, Mayra, Débora, Natália e Franciane, que mesmo longe, nunca deixaram de serem fiéis companheiras e conselheiras.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO.....	1
Características Gerais Da Região Estudada	1
Citogenética em Peixes Neotropicais	2
Ordem Siluriformes e família Pimelodidae.....	5
Gênero <i>Pimelodus</i>	6
Regiões Organizadoras de Nucléolos.....	8
Heterocromatina e marcações cromossômicas em peixes.....	9
OBJETIVOS.....	14
JUSTIFICATIVAS.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Preparação Dos Cromossomos Mitóticos.....	16
Detecção das NORs pela Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NORs)	17
Detecção de Heterocromatina Constitutiva (Bandas C).....	17
Coloração com Cromomicina A ₃ (Fluorocromo GC Específico)	18
Bandeamentos por Endonucleases de Restrição.....	19
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Informações citogenéticas do gênero <i>Pimelodus</i>	7
Figura 1: Cariótipo da população de <i>Pimelodus maculatus</i> da represa de Nova Ponte..	21
Figura 2: Cariótipo da população de <i>Pimelodus maculatus</i> da represa de Miranda.	21
Figura 3: Cariótipo da população de <i>Pimelodus maculatus</i> do rio Tijuco.....	22
Figura 4: Metáfases mitóticas tratadas com nitrato de Prata.....	22
Figura 5: Padrão de distribuição heterocromática nas populações	24
Figura 6: Metáfases de <i>P. maculatus</i> submetidas ao tratamento com Cromomicina A ₃ e enzima de restrição <i>Hinf</i> I	25
Figura 7: Esquema da possível inversão pericêntrica entre as populações de Araguari e Tijuco.....	30

RESUMO

Três populações de *Pimelodus maculatus* coletadas nas represas de Nova Ponte e Miranda do rio Araguari e no rio Tijuco foram analisadas citogeneticamente. Os resultados mostraram um número diplóide de 56 cromossomos e $NF=106$ para todos os exemplares analisados. A fórmula cariotípica das espécimes das represas de Nova Ponte e de Miranda foi $22m + 18sm + 10st + 6a$, enquanto que a população do rio Tijuco apresentou fórmula cariotípica de $26m + 14sm + 10st + 6a$. As regiões organizadoras de nucléolo foram encontradas na posição terminal dos braços longos de um par de cromossomos subtelo-cêntricos. O bandeamento C gerou padrão de bandas heterocromáticas nas porções teloméricas e centroméricas de vários pares cromossômicos e foi positivo na região da NOR. Além disso, todas as populações apresentaram marcações biteloméricas em alguns pares de cromossomos e no par número 5. Apenas os exemplares do rio Araguari apresentaram bandas intersticiais no segundo par cromossômico. A presença de bandas heterocromáticas características de cada população permitiu diferenciá-las. O tratamento com cromomicina A_3 foi NOR positiva nas três populações, sendo que na da represa de Miranda apresentou marcação intersticial nos braços longos de um par de cromossomos submetacêntricos. Esta mesma marcação, também pôde ser evidenciada no tratamento com a endonuclease de restrição *Hinf* I. Esta gerou, em todas as populações, padrão de bandeamento similar ao da banda C, com regiões mais escuras (locais de menor digestão da enzima) nas porções teloméricas e centroméricas de vários pares cromossômicos.

Palavras-chaves: *Pimelodus*, cariótipo, NOR, banda C, CMA_3 , *Hinf* I

ABSTRACT

Three populations of *Pimelodus maculatus*, collected on Nova Ponte and Miranda barriers in the Araguari river and on Tijuco river, were cytogenetically analyzed. The results showed a diploid number of 56 chromosomes and $FN = 106$ for all populations. The karyotype formula of populations from Nova Ponte and Miranda barriers were $22m + 18sm + 10st + 6a$, while Tijuco population presented karyotype formula of $26m + 14sm + 10st + 6a$. The nucleolus organizer regions were found, in all populations, at terminal position on the long arms of a subtelocentric chromosome pair. The C-banding pattern presented heterochromatic bands on the terminal and centromeric regions of various chromosomes and it was NOR positive. Besides that, all populations presented bitelomeric marks on some chromosomes pairs and on pair 5. Only Araguari River populations showed interstitial marks on the second pair of chromosomes. The presence of characteristic bands in each population allowed to differentiate them. Chromomycin A_3 was NOR positive on the three populations, but in Miranda population occurred interstitial mark on the long arms of a submetacentric chromosome pair. This mark could also be evidenced on the treatment with *Hinf* I restriction endonuclease. It produced, in all populations, similar pattern to C-banding, with dark bands, less enzyme digestion, on the terminal and centromeric regions of various chromosomes.

Key words: *Pimelodus*, karyotype, NOR, C-band, CMA_3 , *Hinf* I

INTRODUÇÃO

Características Gerais Da Região Estudada

A Bacia do rio Paranaíba, terceira maior bacia hidrográfica do país, faz parte da grande bacia brasileira do rio Paraná. Abrange áreas dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal, envolvendo no total, 196 municípios (136 em Goiás, 55 em Minas Gerais, 5 em Mato Grosso do Sul, além do Distrito Federal) e uma população de aproximadamente 8,5 milhões de habitantes, com perspectivas de um crescimento rápido nos próximos dez anos (<http://www.mg.gov.br>).

Segundo consta na página do governo de Minas Gerais (<http://www.mg.gov.br>), o rio Paranaíba nasce na Serra da Mata da Corda, no município de Rio Paranaíba, a uma altitude de 1.140 m. A partir daí, em seu percurso de 1.120 km até sua desembocadura no rio Paraná, muda várias vezes de orientação até tomar o rumo sudoeste e, por 680 km, marcar a fronteira do estado de Minas com Goiás e Mato Grosso do Sul. Seus principais afluentes são: os rios São Marcos, Corumbá, Piracanjuba, Meia Ponte, Verde, Corrente, Aporé (margem direita), Dourados, Perdizes, Bagagem, Araguari, Piedade, Tijuco e Prata (pela margem esquerda).

Suas sub-bacias são: Araguari, Tijuco-Prata, Arantes, São Domingos, São Marcos e mais outras pequenas bacias as quais somam 26.950 km², localizadas em Minas Gerais, São Marcos, Meia Ponte, Rio Verde, Claro, Aporé e outras menores localizadas em Goiás (<http://www.mg.gov.br>).

De acordo com Santos e Baccaro (2004), a sub-bacia do rio Tijuco, um dos locais de coleta, está localizada no Triângulo Mineiro, entre as coordenadas geográficas 18°40' e 19°47' S e 47°53' a 50°13' W. Tal rio percorre partes dos municípios de Uberlândia, Uberaba, Veríssimo, Ituiutaba, Prata, Monte Alegre de Minas e Campina Verde.

O rio Tijuco nasce na cota altimétrica de 950 m e tem sua foz na cota de 526 m, na represa de São Simão, que é a última deste rio. É afluente da margem esquerda do rio Paranaíba e possui uma área de, aproximadamente, 27% do Triângulo Mineiro. Ocupa um total de 14.249,05 km², tendo como principais afluentes os rios: Prata, Babilônia, Cabaçal, Douradinho, Panga, Estiva e outros (SANTOS; BACCARO, 2004). Encontra-

se isolado geograficamente de outros rios da bacia do rio Paranaíba por duas barragens à montante, Cachoeira Dourada e Itumbiara.

A Bacia Hidrográfica do rio Araguari situa-se nas mesorregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, onde estão municípios, como Uberlândia e Araxá. Possui 475 km de extensão, nasce no Parque Nacional da Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas (BACCARO *et al.*, 2004). Abrange um total de 20 sedes municipais na porção oeste do Estado de Minas Gerais, entre as coordenadas geográficas de 18° 20' e 20° 10' de latitude Sul e 46° 00' e 48° 50' de longitude Oeste de Greenwich, ocupando uma área de 20.186 Km² (BRITO; ROSA, 2003).

O rio Araguari é afluente da margem esquerda do rio Paranaíba e apresenta várias usinas hidrelétricas, que formam represas, como Nova Ponte, Miranda, Capim Branco I e II. As duas primeiras constituíram pontos de coleta do presente trabalho.

Citogenética em Peixes Neotropicais

Conforme Nelson (1994), os peixes exibem uma enorme diversidade na sua morfologia, biologia e habitats que ocupam. Constituem-se um pouco mais que a metade do total de, aproximadamente, 48.170 espécies de vertebrados reconhecidas viventes e ocorrem em lagos, rios, estuários e oceanos por todo o mundo. A ictiofauna neotropical compreende grande diversidade de ambientes ecológicos que permitiu uma grande irradiação evolutiva. Hoje, possui uma fauna de peixes muito rica contendo, cerca de 60 famílias e, aproximadamente, 2.800 espécies conhecidas.

Estima-se que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais encontradas para as Américas, Central e do Sul, o que corresponde a aproximadamente 25% da diversidade mundial de peixes (NELSON, 1994). Diante deste fato, os peixes são um dos mais interessantes grupos para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados.

Uma explicação para a alta variabilidade existente no grupo dos peixes, dada por Kirpichnikov em 1981, seria que os peixes pertencem a um grupo de animais primitivos altamente heterogêneo e, assim, estariam submetidos a processos evolutivos em diferentes direções. Outra explicação para este fato, segundo Bush *et al.* (1977) e Lande (1979) estaria relacionada com o padrão de distribuição geográfica, uma vez que o isolamento das bacias hidrográficas, com a conseqüente formação de populações alopátricas, favorece o processo de especiação e, deste modo, a maior diversidade de

espécies (BUSH *et al.*, 1977; LANDE, 1979; KIRPICHNIKOV, 1981 *apud* CAMILO, 2004). O fenômeno de formação de populações alopátricas é mais acentuado em peixes de água doce que habitam rios ou lagos com barreiras físicas, enquanto que as populações de peixes marinhos são menos delimitadas.

Fatores históricos, tais como as colonizações e o surgimento de barreiras físicas ou geográficas, podem influenciar a distribuição dos peixes. A crescente modificação no habitat da ictiofauna, tais como: construção de barragens, desvios e poluição causam efeitos devastadores, acarretando desaparecimento e morte de diversas espécies. Na intenção de reparar esses danos, são feitos repovoamentos indevidos que geralmente agravam o problema, com a introdução de espécies exóticas aos ambientes naturais já degradados, o que dificulta os estudos das espécies nativas. Essa diversidade de interações biológicas podem ser mais bem estudadas com o auxílio da citogenética (SILVA, 2007).

As características morfológicas estão sujeitas às variações produzidas por fatores além dos genéticos (TOLEDO; FERRARI, 1976) e, por isso, a classificação baseada na morfologia das espécies tem sido complementada pela citogenética, que tem como importância esclarecer a filogenia e taxonomia das várias espécies de animais. Uma boa caracterização cromossômica das espécies, a evidência cariotípica para as relações evolutivas, o suporte adicional para a identificação de espécies taxonomicamente problemáticas e a reunião de evidências de possíveis casos de espécies crípticas constituem contribuições concretas da citogenética para a taxonomia (BERTOLLO *et al.*, 1996 *apud* CAMILO, 2004).

A partir da segunda metade do século XX, iniciaram-se os estudos citogenéticos onde certas características cromossômicas puderam individualizar algumas espécies de animais e vegetais (KANTEK, 2005). Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais iniciaram na década de 60 por pesquisadores europeus e no início da década de 70 por pesquisadores brasileiros. Os estudos eram baseados, inicialmente, em cortes de tecidos ou esmagamento de embriões, testículos ou tecidos hematopoiéticos, que tiveram um notável avanço a partir da década de 70, com a utilização da técnica de suspensão de células e secagem ao ar (CAMILO, 2004).

Os primeiros trabalhos citogenéticos de peixes neotropicais no Brasil foram publicados por Jim e Toledo (1975) em *Astyanax*, Toledo e Ferrari (1976) em

Pimelodidae e Michele *et al.* (1977) em *Cichlidae* e *Loricariidae*, e se basearam no estudo dos números cromossômicos das espécies.

Nas duas últimas décadas, o avanço das metodologias na citogenética vem contribuindo significativamente para um melhor conhecimento da biodiversidade em nossos peixes (JIM; TOLEDO, 1975; MICHELE, 1977; TOLEDO; FERRARI, 1976 *apud* ARTONI *et al.*, 2000). Estudos cromossômicos apresentam uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais e distribuição geográfica de espécies ou populações. Todas as situações de poliploidia nos peixes neotropicais referem-se a formas triplóides, somente. Há dados de 14 espécies com casos de triploidia, sendo estas pertencentes à diferentes famílias (*Callichthyidae*, *Trichomycteridae*, *Gymnotidae*, *Sternopygidae*, *Erythrinidae*, *Curimatidae*, *Anostomidae*, *Characidae*) (CENTOFANTE, 2003).

Estima-se ao redor de 2.600 espécies com cariótipos conhecidos, entre cerca de 24.600 espécies taxonomicamente reconhecidas (OZOUF-COSTAZ; FORESTI, 1992). Deste total, as espécies neotropicais somam um número de 921 espécies com cariótipos conhecidos, pertencentes a 252 gêneros e 44 famílias (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Os resultados obtidos pela citogenética são importantes para a compreensão das relações de parentesco entre ou dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros.

O grupo dos peixes apresentam uma grande variação cromossômica, que é confirmada por uma revisão feita por Oliveira *et al.* (1988). Nesta, 433 fórmulas cariotípicas de espécies de peixes neotropicais foram listadas, em que 11,3% apresentaram variações no número de cromossomos, 5,8% apresentaram cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados e 2,3% apresentaram cromossomos supranumerários (OLIVEIRA *et al.*, 1988). Na ictiofauna neotropical, o menor número diplóide consiste de 20 cromossomos, descrito para *Pterolebis longipinnis* e o maior consiste de 134 cromossomos, descrito para *Corydoras aeneus* (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Ordem Siluriformes e família Pimelodidae

Entre a ordem dos Siluriformes, a família Pimelodidae é uma das mais diversificadas e maiores famílias. Tem distribuição geográfica desde o México até a Argentina e são conhecidos vulgarmente como bagres ou jundiá.

Os representantes da ordem Siluriformes possuem pequeno até grande porte, habitando o fundo dos rios, onde podem se esconder entre as pedras e a vegetação. Devido seu hábitat, possuem hábitos sedentários, o que dificulta a realização de migrações pelas populações, já raras, frente a barreiras como corredeiras e cachoeiras. (BRITSKI, 1981).

Peixes da família Pimelodidae possuem características morfológicas diversas, porém todos apresentam características comuns, como corpo alongado, pele lisa e sem escamas, aberturas branquiais amplas e três pares de barbilhões sensitivos (BURGESS, 1989).

As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal portador de um acúleo forte e pungente. A nadadeira adiposa encontra-se presente, e é, em geral, bem desenvolvida; já a nadadeira caudal assume formato variável. (MESS, 1974).

Além disso, a família Pimelodidae tem grande importância econômica, pois nela são encontrados peixes de variados tamanhos e muitos são usados pelos humanos na alimentação. Possuem sabor característico e um grande potencial na piscicultura brasileira (BRITSKI *et al.*, 1984).

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil, envolvendo representantes da subordem Siluroidei (família Pimelodidae), foram realizados por Toledo e Ferrari (1976), os quais analisaram espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella*, *Rhamdia* e *Pimelodus*. Estudos realizados na família revelaram, quanto ao número cromossômico, um número diplóide variando de 46 em *Pimelodella sp.* (TOLEDO e FERRARI, 1976) a 58-63 em *Rhamdia quelen* (GUILHERME, 2005; SILVA, 2007).

De acordo com Borin e Martins-Santos (2004), uma causa para variações no número diplóide dentro da família Pimelodidae pode ser atribuída à presença dos cromossomos B em algumas espécies. Dados de Dias e Foresti em 1993 confirmaram a extensiva variabilidade cromossômica existente nesta família, caracterizada por polimorfismos dos tipos intraindividual e/ou intrapopulacional de natureza estrutural, ligados ou não ao sexo, e pela presença de cromossomos supernumerários.

Esta grande variabilidade dificulta o estabelecimento de um padrão de variação cromossômica para linhagem filogenética dos Siluriformes (KIM *et al.*, 1982). Pinna, em 1993, realizou várias revisões taxonômicas na ordem Siluriformes, baseando-se nas suas características morfológicas e filogenéticas. A partir delas, a conhecida família ou subfamília Pimelodidae foi considerada polifilética e reagrupada em Pimelodidae, Heptapteridae (Rhamdiidae) e Pseudopimelodidae.

A família Pimelodidae é atualmente formada por cerca de 32 gêneros: *Aguarunichthys*, *Bagropsis*, *Bergiaria*, *Brachyplatystoma*, *Calophysus*, *Cheirocerus*, *Conorhynchus*, *Duopalatinus*, *Exallodontus*, *Golslinea*, *Hemisurubim*, *Hypophthalmus*, *Iheringichthys*, *Leiarius*, *Luciopimelodus*, *Megalonema*, *Merodontotus*, *Perrunichthys*, *Parapimelodus*, *Phractocephalus*, *Pimelodina*, *Pimelodus*, *Pirinampus*, *Piramutana*, *Platynemichthys*, *Platysilurus*, *Platyatomichthys*, *Pseudoplatystoma*, *Sorubim*, *Sorubimichthys*, *Steindachneridion* e *Zungaro* (LUNDBERG *et al.*, 1991 *apud* GARCIA, 2005).

Gênero *Pimelodus*

O gênero *Pimelodus* é considerado o grupo que contém maior número de espécies dentro da família Pimelodidae. Possui 27 espécies, encontradas ao longo dos rios da América do Sul (SOUZA *et al.*, 2004a), contendo tanto espécies endêmicas, tais como *P. ortmanni*, proveniente do rio Iguaçu, como espécies mais largamente distribuídas, como *P. maculatus* (GARCIA, 2005).

Estudos citogenéticos no gênero *Pimelodus* têm mostrado um número diplóide constante de 56 cromossomos (BORIN; MARTINS-SANTOS 2002, 2004; DIAS; FORESTI, 1993; GARCIA, 2005; SOUZA *et al.*, 2003; SWARÇA *et al.*, 2001; TOLEDO; FERRARI, 1976; VISSOTO *et al.*, 1999, entre outros). A exceção se dá em espécimes de *Pimelodus blochii* do rio Solimões (DELLA-ROSA *et al.*, 1980) e em espécimes de *P. maculatus* do rio Jarí Almerim (SOUZA *et al.*, 2000b), em que foi encontrado número diplóide igual a 58 cromossomos; e em espécimes de *P. fur* coletados do rio São Francisco com número diplóide igual a 54 cromossomos (GARCIA, 2005).

Apesar da maioria das espécies do gênero *Pimelodus* apresentar um número diplóide constante, ocorrem variações inter e intraespecíficas na fórmula cariotípica de algumas espécies do gênero (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002). Isto pode acontecer

devido ao grau de condensação dos cromossomos, ou pode estar relacionado a rearranjos cromossômicos (SOUZA *et al.*, 2003).

Além disso, foram encontrados polimorfismos estruturais nas espécies *P. maculatus* e *Pimelodus sp.* (DIAS; FORESTI, 1993), decorrentes de inversões pericêntricas em cromossomos subtelocêntricos-acrocêntricos e, também, casos de cromossomos supranumerários em *Pimelodus sp.* e *P. ortmanni* do rio Iguaçu (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004).

O número fundamental varia entre 88 a 106 para as várias populações de *P. maculatus*, conforme tabela 1. Tal fato confirma a grande variabilidade cariotípica para esta espécie e este gênero.

Tabela 1. Informações citogenéticas do gênero *Pimelodus* segundo Garcia (2005), com modificações.

Espécie	Localidade	2N	Fórmula cariotípica	NF	Autor(es)
<i>P. absconditus</i>	Rio Paraná – PR	56	24m + 18sm + 8 st + 10a	106	Borin; Martins-Santos (2002)
<i>P. altipinnis</i>	Rio Guamá – PA	56	46m/sm + 10 st/a	102	Souza <i>et al.</i> (2000a)
<i>P. argentus</i>	Rio Paraguai/Corumbá - MS	56	24m + 16sm + 12st + 4a	108	Souza <i>et al.</i> (2003)
<i>P. blochii</i>	Rio Solimões - AM	58			Della-Rosa <i>et al.</i> (1980)
	Rio Araguaia – MT	56	36m/sm + 20st/a	92	Faria <i>et al.</i> (2000)
<i>P. clarias</i>	Argentina	56			Fenocchio <i>et al.</i> (1994)
<i>P. fur</i>	Rio Mogi, Rio Pardo e Rio Onça – SP	56	30m + 14sm + 12a	100	Toledo; Ferrari (1976)
	Rio São Francisco - MG	54	32m + 8sm + 6st + 8a	100	Garcia (2005)
<i>P. heraldoi</i>	Rio Tibagi – PR	56	22m + 22sm + 6st + 6a	106	Souza <i>et al.</i> (2004a)
	Rio Mogi, Pardo e Onça – SP	56	30m + 14sm + 12a	100	Toledo; Ferrari (1976)
<i>P. maculatus</i>	Rio São Francisco – MG e Rio Mogi-Guaçu - SP	56	40m/sm + 16st/a	96	Dias; Foresti (1993)
	Rio Tibagi – PR	56	20m + 20sm + 10st + 6a	106	Swarça <i>et al.</i> (2001)
	Rio Parapanema – SP	56	20m + 20sm + 10st + 6a	106	Vissoto <i>et al.</i> (1999)
	Rio Jari Almerim – PA	58	30 m/sm + 28 st/a	88	Souza <i>et al.</i> (2000b)
	Rio Paraguai - MS	56	22m + 16sm + 10st + 8a	104	Souza <i>et al.</i> (2003)
	Rio Paraná - PR	56	20m + 20sm + 10st + 6a	106	Borin; Martins- Santos (2002)
	Rio São Francisco - MG	56	32m + 12 sm + 12a	100	Garcia (2005)
	Rio Araguaia (Represa de Nova Ponte e Miranda) – MG	56	22m + 18sm + 10st + 6a	106	Presente trabalho
	Rio Tijuco - MG	56	26m + 14sm + 10st + 6a	106	Presente trabalho
	Rio Paraguai - MS	56	26m + 20sm + 2st + 8a	104	Souza <i>et al.</i> (2003)
<i>P. mysteriosus</i>	Rio Paraguai - MS	56	26m + 20sm + 2st + 8a	104	Souza <i>et al.</i> (2003)
<i>P. ornatus</i>	Rio Paraná - PR	56	20m + 18sm + 8st + 10a	108	Borin; Martins-Santos (2002)
<i>P. ortmanni</i>	Rio Iguaçu - PR	56	24m + 18sm + 8st + 6a	106	Borin; Martins-Santos (2004)
	Rio Iguaçu - PR	56			Terencio <i>et al.</i> (2001)
	Rio Iguaçu - PR	56	20m + 12sm + 14st + 10a	102	Margarido; Gavasso (2000)
<i>Pimelodus sp.</i>	Rio Mogi, Rio Pardo, Rio Onça - SP	56	30m + 14sm + 12a	100	Toledo; Ferrari (1976)
	Rio São Francisco - SP	56	40m/sm + 16st/a	96	Dias; Foresti (1993)
	Rio Iguaçu – PR	56	30m + 16sm + 8st + 2a	102	Borin; Martins-Santos (2000)
	Rio Tibagi – PR	56	24m + 26sm + 4st + 2a	110	Souza <i>et al.</i> (2004a)
	Rio São Francisco - MG	56	32m + 12sm + 6st + 6a	106	Garcia (2005)

Regiões Organizadoras de Nucléolos

Nos eucariotos, as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são formadas por cístrons repetidos em tandem. Os cístrons são formados por genes que tem como função a transcrição do RNA ribossômico precursor, dotado de três segmentos mais conservados (RNAr 18S, 5, 8S e 28S) e de uma região espaçadora intergênica (IGS). Esta se localiza entre os três segmentos e transcreve um RNA instável e que é, por isto, abortado (HSU *et al.*, 1975; MILLER *et al.*, 1976 *apud* MESTRINER, 1993). O RNA ribossômico precursor tem um coeficiente de sedimentação de 45S.

As regiões organizadoras dos nucléolos (NORs), detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, são evidenciadas pela coloração das proteínas residuais que permaneceram aderidas a estas regiões, após a sua atividade transcricional. Estas proteínas, combinadas com as moléculas de RNAr, permanecem vizinhas ao DNAr e formam as subunidades ribossomais. Estas moléculas são responsáveis pela produção de uma região mais escura do núcleo, o nucléolo (MILLER *et al.*, 1976).

A impregnação pela Prata não acontece em todos os sítios de DNAr, mas naqueles que estão transcricionalmente ativos ou que já estiveram ativos e ainda tem resíduos de RNAr associados a proteínas, presos em torno de cístrons de DNAr condensados. A não impregnação pela Prata em torno da NOR pode indicar que o cístron de DNAr não transcreveu RNAr e, por isso, não há RNAr associado àquelas proteínas (SCHWARZACHER *et al.*, 1978 *apud* TORRES-MARIANO, 2001).

Vários grupos de peixes apresentam padrões conservados de distribuição das NORs, enquanto que outros apresentam variações na localização de tais regiões. Variações inter ou intraindividuais, tanto no número como na localização e no tamanho cromossômico, foram descritas em vários gêneros, muitos dos quais da nossa ictiofauna (MORELLI, 1988).

Nos pimelodídeos, as regiões organizadoras nucleolares distribuem-se preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, sendo que marcações intersticiais são mais raras (FENOCCHIO *et al.*, 2003). No gênero *Pimelodus* ocorre variabilidade de localização cromossômica da NOR. Esta, provavelmente, está relacionada à rearranjos ocorridos nesta região, tais como as translocações (SOUZA *et al.*, 2004b).

Na maioria das espécies do gênero *Pimelodus*, a NOR se encontra na porção terminal dos braços longos de um par cromossômico, como verificado em *P. maculatus* do rio Tibagi (SWARÇA *et al.*, 2001); em *P. maculatus* e *Pimelodus sp.* coletados dos rios Mogi-Guaçu e São Francisco, respectivamente (DIAS; FORESTI, 1993); em *P. maculatus*, *P. absconditus* e *P. ornatus* do rio Paraná (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); em *Pimelodus sp.* e *P. ortmanni* do rio Iguazu (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004), entre outros trabalhos.

Porém, em *P. ornatus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002), *P. blochii* (FARIA *et al.*, 2000) e *P. fur* (GARCIA, 2005) a NOR se localiza nos braços curtos de um par de cromossomos subtelocêntricos, no primeiro e submetacêntricos, nos dois últimos. Essa característica decorre, possivelmente, de translocação de DNAr dos braços longos para os braços curtos, durante o processo de especiação.

A variação numérica pode ser explicada pela diferença na atividade dos cístrons ribossômicos, pela redução nessa atividade ou mesmo pela falta de DNAr. Quando a impregnação por Prata está presente em apenas um par de cromossomos, a NOR é dita simples, isto é, ocorreu atividade gênica anterior a divisão celular em apenas um sítio; e quando mais de um par de cromossomos apresenta a NOR, ela é dita múltipla (MOREIRA-FILHO, 1983 *apud* TORRES-MARIANO, 2001).

Em vários estudos da espécie de *P. maculatus* foi observada NOR simples na porção terminal de um par cromossômico (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002; DIAS; FORESTI, 1993; SWARÇA *et al.*, 2001; VISSOTO *et al.* 1999), com exceção de Souza *et al.* (2000b), que em estudo de espécimes do rio Jarí Almerim - PA, obteve marcação de NOR múltipla nos braços longos de um par de cromossomos submetacêntricos e de um par de subtelocêntricos.

Além da localização, número e tamanho estão incluídos como aspectos variáveis das NORs a atividade e organização das seqüências do DNA ribossômico. A variação de tamanho pode ser explicada pela alteração na quantidade de DNAr presente, por sua atividade transcricional diferente em interfases anteriores ou estes dois casos (MOREIRA-FILHO, 1983 *apud* MARIANO, 2001).

Heteromorfismos de tamanho das NORs já foram relatados no gênero *Pimelodus*, como entre as espécies *Pimelodus sp.*, *P. maculatus* e *P. argenteus* do bacía do rio Paraguai. Além disso, diferenças de tamanho da NOR entre cromossomos homólogos foram observadas em pesquisas realizadas em *P. maculatus* (VISSOTTO *et*

al., 1999) e em *Pimelodus sp.* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004). Nesta última, o polimorfismo da NOR entre os homólogos foi observado quando a técnica de impregnação por prata e de CMA₃ foram usadas na mesma lâmina.

GOLD *et al.* (1990) hipotetiza que o heteromorfismo de tamanho das regiões organizadoras de nucléolo pode se dar por diferenças na expressão entre cromossomos homólogos ou, até, pode demonstrar um verdadeiro polimorfismo genético (GOLD, 1990 *apud* SOUZA *et al.*, 2004b). Estes resultados, apesar de não muito freqüentes no gênero (SOUZA *et al.*, 2004b), sugerem possíveis rearranjos transposicionais ou crossing-over desigual entre os cromossomos homólogos, acarretando em variações na quantidade de DNAr entre estes (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004).

O estudo das NORs é importante porque contribui para o conhecimento da estrutura cromossômica, fornece informações sobre a atividade gênica dessas regiões, além de ser importante marcador citotaxonômico (TORRES-MARIANO, 2001). A técnica de impregnação por Ag-NORs é, hoje, uma das mais empregadas para estudos das NORs em espécies de peixes neotropicais.

Heterocromatina e marcações cromossômicas em peixes.

A heterocromatina está diretamente relacionada às regiões do DNA que possuem seqüências altamente repetitivas, presentes geralmente próximas às NORs, centrômeros, telômeros e às vezes em algumas regiões intersticiais de alguns cromossomos (MORELLI, 1988). É caracterizada por possuir replicação tardia (no final da fase S), ter atividade transcricional baixa ou inexistente. Autores como Yunis e Yasmineh (1971 *apud* GARCIA, 2005) propõem que ela tenha como funções essenciais proteger regiões vitais para o genoma e auxiliar no pareamento dos cromossomos homólogos durante a meiose (VERMA, 1988), além de auxiliar nos processos evolutivos de especiação.

De acordo com Guerra (1988) a heterocromatina é dividida em facultativa e constitutiva. A primeira é aquela em que a cromatina pode estar condensada, tendo características de heterocromatina constitutiva ou ela pode estar descondensada compondo a eucromatina. Enquanto que, a segunda sempre está condensada durante todo o ciclo celular. A heterocromatina constitutiva é detectada pela técnica de bandeamento C, uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão de mecanismos ocorridos durante a evolução cariotípica dos organismos (PATHAK;

ARRIGHI, 1973), inclusive na caracterização e diferenciação de algumas espécies de peixes (MANTOVANI, 2001).

A heterocromatina possui um importante papel na diversidade da análise cariotípica dos peixes, pois é altamente polimórfica, revelando heteromorfismos, grande variabilidade entre indivíduos e entre cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo. Em função de sua composição, pode sofrer mais alterações e rearranjos cromossômicos (WICHMAN *et al.*, 1991).

O estudo realizado em três espécies do gênero *Pimelodus*, *P. fur*, *P. maculatus* e *Pimelodus sp.*, por Garcia (2005) detectou um padrão de banda C espécie-específico, permitindo a diferenciação de cada espécie. *P. fur* e *Pimelodus sp.* tiveram blocos heterocromáticos distribuídos pericentromericamente e nas regiões terminais da maioria dos cromossomos, sendo, também, observado bandeamento C em ambas extremidades de um par de cromossomos metacêntricos. *P. maculatus* apresentou menor quantidade de blocos heterocromáticos, que foram localizados nas porções pericentroméricas.

Borin e Martins-Santos (2002) estudaram a heterocromatina constitutiva de *P. maculatus*, *P. absconditus* e *P. ornatus*. Neste estudo também foram observadas marcas características em cada espécie. *P. maculatus* apresentou blocos heterocromáticos em 17 pares cromossômicos. Tiveram destaque o primeiro par de submetacêntricos, que apresentou marca intersticial nos braços curtos e terminal nos braços longos; e o primeiro par de subtlocêntricos com marca intersticial nos braços longos e telomérica em ambos braços.

Em *P. absconditus* os blocos heterocromáticos apareceram em 12 pares de cromossomos, em que o primeiro par de submetacêntricos teve a mesma característica da espécie anteriormente estudada, enquanto que o primeiro par de subtlocêntricos apresentou bloco heterocromático na porção intersticial dos braços longos e na porção telomérica dos braços curtos. Já *P. ornatus* apresentou bandeamento C em 12 pares cromossômicos (BORIN, MARTINS-SANTOS *op.cit.*)

Os mesmos autores supracitados, no ano de 2004, analisaram a heterocromatina de *Pimelodus sp.* e de *P. ortmanni*. Na primeira, o bandeamento C ocorreu em ambas extremidades de 8 pares de cromossomos, enquanto que na segunda este foi basicamente centromérico em 5 pares cromossômicos. Ainda, observou-se que o par 16 em ambas espécies teve marcas heterocromáticas centroméricas e teloméricas nos braços curtos; e o primeiro par cromossômico submetacêntrico revelou marca

intersticial nos braços curtos, próxima ao centrômero, e marca terminal nos braços longos.

Souza *et al.* (2003) encontrou um padrão de distribuição heterocromática diferente para *P. argenteus* e *P. mysteriosus*. Ambas apresentaram marcas teloméricas, porém em *P. argenteus* um par de cromossomos, teve marcação terminal mais forte e em *P. maculatus* um par de cromossomos teve marcação intersticial mais forte.

Este tipo de bandeamento cromossômico pode diferir na localização e quantidade presente nos cromossomos de diferentes espécies, como observado em vários estudos do gênero *Pimelodus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002, 2004; GARCIA, 2005; SOUZA *et al.*, 2003). Assim, o bandeamento C torna-se importante ferramenta para a caracterização e diferenciação de espécies e populações.

A coloração com fluorocromos base específicos, como a cromomicina A₃ (CMA₃) são utilizados para detecção de regiões cromossômicas “ricas” em bases GC. No caso de vertebrados inferiores, em especial nos peixes, as regiões evidenciadas por esses fluorocromos, quando excitados pela luz violeta, parecem corresponder a sítios de DNAr independente da atividade na intérfase anterior (AMEMYA; GOLD, 1986; GALETTI Jr *et al.*, 1992; GALETTI Jr; RASCH, 1993 a,b). Em peixes, o uso de fluorocromos GC específicos tem mostrado marcações coincidentes com os sítios marcados por NOR (AMEMYA; GOLD, 1986) e, freqüentemente, a região é heterocromática (GALETTI Jr *et al.*, 1991; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992).

A maior parte dos estudos no gênero *Pimelodus*, com utilização da cromomicina A₃, têm mostrado marcações coincidentes das NORs com as regiões ricas em bases GC. Exemplos destes são: *P. maculatus*, *P. absconditus* e *P. ornatus* coletados do rio Paraná-PR (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); *P. maculatus* coletada do rio Tibagi-PR (SWARÇA *et al.*, 2001), *Pimelodus sp.* e *P. ortmanni* coletados do rio Iguaçu-PR (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004); *Pimelodus heraldoi*, *Pimelodus sp.*, *Pimelodus argenteus*, *P. maculatus* e *P. mysteriosus* (SOUZA *et al.*, 2004b) coletados em várias localidades brasileiras; dentre outros trabalhos.

Além dessas marcações, outros trabalhos envolvendo a técnica de CMA₃ em peixes do gênero *Pimelodus* relataram marcações de cromossomos que não os pares correspondentes da NOR. De acordo com Souza *et al.* (2003), *P. maculatus* do rio Paraguai apresentou sítios fluorescentes em vários pares cromossômicos, incluindo um par com marca intersticial. No estudo de *P. heraldoi* e de *Pimelodus sp.* (SOUZA *et al.*,

2004a), também foi encontrado padrão de fluorescência GC específica com marcações em vários pares cromossômicos, sendo NOR positiva e com um par de cromossomos marcado bitelomericamente.

Freqüentemente, a região fluorescente impregnada por CMA₃ é heterocromática (GALETTI Jr. *et al.*, 1991; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992), como evidenciado nos estudos de Souza *et al.* (2003, 2004a), onde algumas marcas teloméricas fluorescentes coincidem com as marcas teloméricas visualizadas através do bandeamento C.

As enzimas de restrição são aquelas produzidas por bactérias como um mecanismo de defesa, pois cortam o DNA do invasor, inativando-o. Elas cortam o DNA em seqüências-alvo específicas, se tornando importantes ferramentas em diversas áreas que necessitam da manipulação do DNA, como a tecnologia do DNA recombinante e a citogenética (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Na citogenética, as enzimas de restrição produzem bandas através de cortes do DNA em pares de bases específicos, que resultam em diminuição da coloração por Giemsa em alguns fragmentos dos cromossomos. Cada enzima de restrição corta pares de bases específicos. Alguns exemplos de enzimas bastante usadas em técnicas citogenéticas são: *Dde* I (5'...C↓TNAG...3'), *Bam* HI (5'...G↓GATCC...3'); *Alu* I (5'...AG↓CT...3'), e *Hinf* I (5'...G↓ANTC...3') (MORELLI, 1998).

Swarça *et al.* (2001) utilizou a técnica de bandeamento pela endonuclease de restrição *Alu* I em espécimes de *P. maculatus*. Esta produziu bandeamento com diferenciação linear similar ao apresentado pela banda C. O padrão foi caracterizado por bandas mais escuras, com pouca especificidade pela enzima, nas porções teloméricas e centroméricas de vários cromossomos.

OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo o estudo de *Pimelodus maculatus*, visando aumentar os dados de citogenética do gênero *Pimelodus*, realizando-se a:

1. Caracterização do cariótipo de três populações de *Pimelodus maculatus* da bacia do rio Paranaíba;
2. Análise das regiões organizadoras do nucléolo, através da coloração com nitrato de Prata;
3. Análise do padrão de distribuição de bandas C do grupo, com o intuito de melhor compreender o cariótipo deste;
4. Análise da heterocromatina constitutiva, através de fluorocromo base específico GC;
5. Comparação dos resultados deste trabalho a outros já efetuados sobre o gênero *Pimelodus* em diferentes localidades hidrográficas.

JUSTIFICATIVAS

Apesar de estudos citogenéticos de *P. maculatus* já terem sido realizados em diferentes rios, estes são raros na bacia do rio Paranaíba. O isolamento geográfico presente há muitos anos, separando populações desta espécie, pode ter permitido a fixação de possíveis alterações cariotípicas ocorridas. O estudo citogenético das populações desta região contribuirá para uma ampliação dos dados citogenéticos deste gênero e da família Pimelodidae. Além disso, tal estudo poderá ajudar na melhor compreensão da evolução cariotípica do grupo, com base nos resultados obtidos e em dados já disponíveis na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises citogenéticas foram realizadas em espécimes de *Pimelodus maculatus* pertencentes a três populações: represa de Nova Ponte do rio Araguari (6 espécimes, sendo 2 fêmeas e 2 machos); represa de Miranda do rio Araguari (8 espécimes, sendo 3 fêmeas e 1 macho); e rio Tijuco (7 espécimes). Algumas espécimes não puderam ter o sexo identificado. A espécie de alguns exemplares foi identificada pelo Prof. Dr. Francisco Langeani da Universidade Estadual Paulista.

A captura dos espécimes se realizou através de pesca comum, sendo utilizado equipamento do tipo molinete, utilizando-se de linhas de 10 a 15 lb e anzóis de número 0,25 e 0,5. As iscas utilizadas foram do tipo naturais como minhocas, miúdos de boi e de galinha, insetos e pedaços de peixes.

Preparação Dos Cromossomos Mitóticos

Foi utilizada a seguinte técnica, descrita por Bertollo *et al.* (1978), para estudo de cromossomos de peixes, com modificações.

1. Injetou-se, intraperitonealmente, colchicina a 0,025% na proporção de 1 mL/100g de peso do animal;
2. Deixou-se o animal em aquário aerado por aproximadamente uma hora, sacrificando-o em seguida. Retirou-se os tecidos desejados;
3. Lavou-se o material retirado em uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M;
4. Transferiu-se o material para uma pequena cuba de vidro contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica;
5. Fragmentou-se o material, com pinças de dissecação, completando este processo com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha;
6. Colocou-se a suspensão obtida em estufa a 36°C por 20 minutos;
7. Suspendeu-se cuidadosamente o material sedimentado com auxílio de pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrífuga. Nesta transferência, os pedaços de tecido não desfeitos foram descartados. Acrescentou-se 5 a 6 gotas de fixador (álcool metílico e ácido acético 3:1) recém-preparado e suspendeu-se novamente o material sedimentado;

8. Centrifugou-se durante 10 minutos, entre 500 e 900 rpm, descartando o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur;
9. Adicionou-se 5 a 6 mL de fixador;
10. Suspendeu-se o sedimento com auxílio de pipeta Pasteur;
11. Repetiu-se os itens 8 a 10 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionou-se 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material e suspendeu-se bem o sedimento;
12. Pingou-se 3 a 4 gotas de suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina mantida em água destilada à 63°C;
13. Escorreu-se o excesso de material, inclinando um pouco a lâmina sobre o papel de filtro;
14. Secou-se a lâmina diretamente ao ar.
15. Corou-se a lâmina com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato, pH 6.8, por 10 minutos;
16. Lavou-se a lâmina em água corrente, deixando-a secar ao ar e, então, analisou-se a lâmina ao microscópio.

Detecção das NORs pela Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NORs)

Foi utilizada a técnica apresentada a seguir, descrita por Howell e Black (1980).

1. Foi colocada uma gota de solução de gelatina a 2% acrescida de ácido fórmico, na proporção de uma parte para 100 de solução e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de Prata a 50%, sobre lâmina preparada para cromossomos mitóticos;
2. As duas soluções foram misturadas e cobertas com lamínula;
3. A lâmina foi transferida para estufa a 70°C. Decorridos alguns minutos (5 a 6), a lâmina adquiriu uma coloração amarelada, passando para marrom dourada;
4. A lamínula foi removida com água e bem lavada em água deionizada;
5. A lâmina foi seca e examinada ao microscópio.

Detecção de Heterocromatina Constitutiva (Bandas C)

A técnica utilizada foi descrita por Sumner (1972), com pequenas modificações.

1. Tratou-se o material preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N em temperatura ambiente, por 15 minutos;

2. Lavou-se a lâmina em água deionizada à temperatura ambiente, deixando-a secar ao ar;
3. Incubou-se a lâmina por 15 minutos em solução de 2xSSC à 37 °C.
4. Incubou-se a lâmina, por 50 segundos, em solução filtrada recém-preparada de Ba(OH)₂.8H₂O, a 5%, a 42°C;
5. Lavou-se a lâmina rapidamente em HCl 0,2N e em água deionizada, deixando-a secar ao ar;
6. Incubou-se a lâmina em solução de 2xSSC à 60°C, por 50 minutos.
7. Lavou-se a lâmina em água deionizada à temperatura ambiente, deixando-a secar ao ar;
8. Corou-se a lâmina com Giemsa, diluído a 2% em tampão fosfato, pH 6.8, por 30 minutos;
9. Lavou-se a lâmina com água deionizada, deixando-a secar ao ar e, então, analisou-se a lâmina ao microscópio.

Coloração com Cromomicina A₃ (Fluorocromo GC Específico)

A técnica utilizada foi descrita por Schmid (1980), com pequenas modificações.

1. Foram colocados 100µL da solução de cromomicina A₃ (preparada através da dissolução de 0,5mg de cromomicina em 1mL de tampão McIlvaine e adição de 5mM de cloreto de magnésio, deixando a solução dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), com o auxílio de uma micropipeta, sobre a lâmina, cobrindo-a com uma lamínula e deixando-a corar por 60 minutos no escuro.
2. A lâmina foi lavada, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 1 minuto, fazendo com que a lamínula fosse escurida. Então, a lâmina foi deixada em tampão McIlvaine por 5 minutos.
3. A lâmina foi deixada secando ao ar e montada novamente com nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.
4. A lâmina foi guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias e, então, analisada em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

Bandeamentos por Endonucleases de Restrição

A técnica utilizada foi descrita por Mezzanotte et al. (1983) com algumas modificações sugeridas por Maistro (1996).

1. Estabeleceu-se a concentração desejada de 2U/ μ L para a enzima *Hinf* I (5'...G↓ANTC...3');
2. Colocou-se em um tubo de Eppendorf, no gelo, 27 μ L de água destilada, 3 μ L de tampão da enzima e o volume necessário de enzima para atingir a concentração desejada;
3. Pingou-se 30 μ L da solução de enzima em cada lâmina (pingadas no dia anterior ou preparadas a mais tempo, mantidas no freezer e descongeladas na véspera), cobriu-se com lamínula e incubou-a a 37°C, por 12 a 14 horas;
4. Lavou-se a lâmina com água destilada até a remoção da lamínula;
5. Corou-se a lâmina com Giemsa e tampão fosfato a 2% por 10 minutos e examinou-a ao microscópio.

RESULTADOS

As três populações estudadas apresentaram o mesmo número diplóide, $2n = 56$. Contudo, as fórmulas cariotípicas discerniram entre os exemplares de Miranda e Nova Ponte dos do rio Tijuco. Os espécimes de Miranda e Nova Ponte tiveram fórmula cariotípica de $22m + 18sm + 10st + 6a$ (fig. 1 e 2, respectivamente), com $NF = 106$, enquanto que os do Tijuco apresentaram fórmula cariotípica de $26m + 14sm + 10st + 6a$ (fig. 3), com $NF = 106$. Em nenhum deles foram observados cromossomos sexuais.

Todas as populações analisadas tiveram o mesmo padrão de marcação da NOR. Esta ocorreu na porção terminal dos braços longos de um par de cromossomos subtelocêntricos (fig. 4).

Cada população apresentou marcas características obtidas através do bandeamento C. A da represa de Nova Ponte (fig. 5a) apresentou marcações heterocromáticas centroméricas e teloméricas em vários pares cromossômicos. Três pares de cromossomos, um metacêntrico, um submetacêntrico e um subtelocêntrico, de números 5, 15 e 21, respectivamente, tiveram marcações biteloméricas, ou seja, bandas heterocromáticas nas duas extremidades dos cromossomos. Além disso, o par número 2 apresentou marcação intersticial e a banda C foi NOR-positiva, já que o par cromossômico 23, marcado pela NOR na porção telomérica dos braços longos, também apresentou banda heterocromática.

Dentre os cromossomos que tiveram marcas de banda C, os que as apresentaram mais fortes foram: o par 2 de metacêntricos com banda intersticial; o par 4 de metacêntricos com bloco próximo ao centrômero e no telômero; o par 5 de metacêntricos com banda bitelomérica; o par 14 de submetacêntricos com banda telomérica nos braços curtos; o par 21 de subtelocêntricos com banda bitelomérica; o par 23 com banda telomérica nos braços longos; e o par 26 de acrocêntricos com banda heterocromática na extremidade superior.

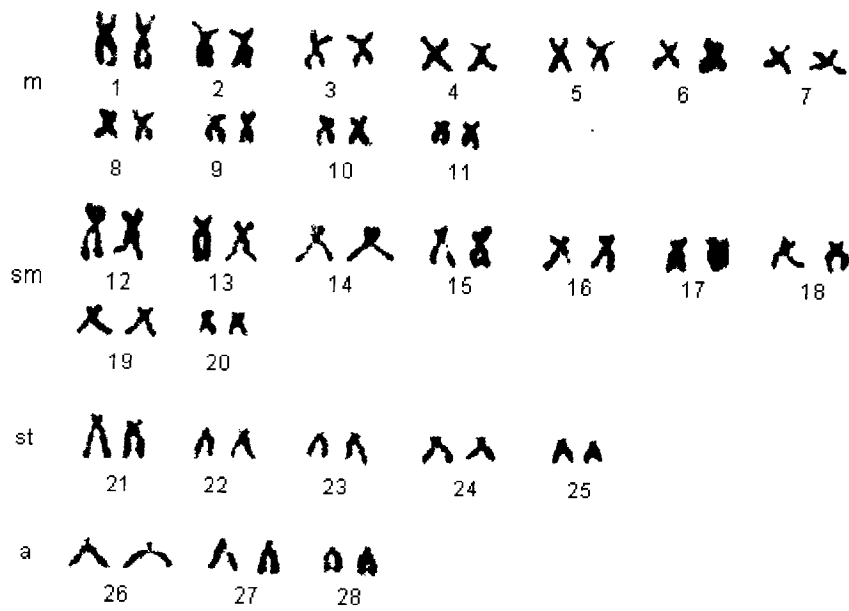


Figura 1: Cariótipo da população de *Pimelodus maculatus* da represa de Nova Ponte

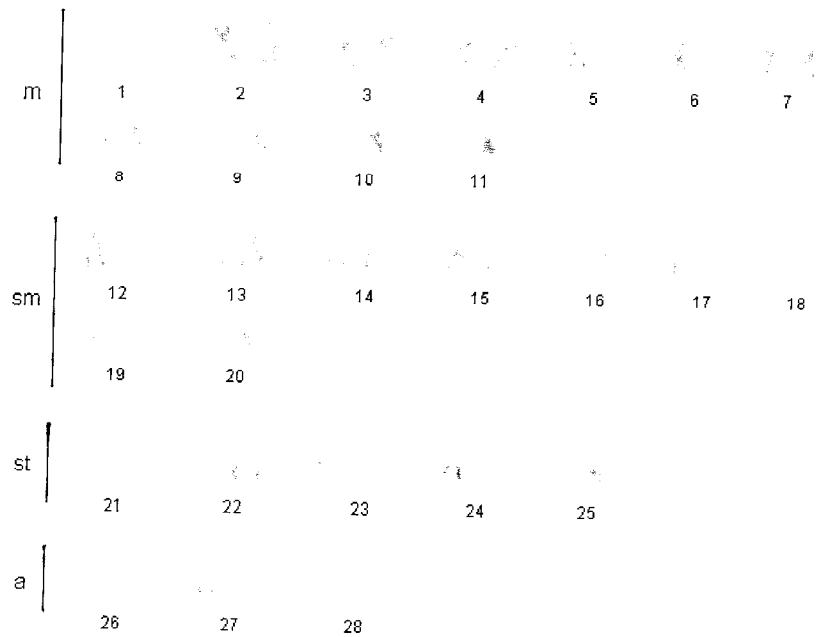


Figura 2: Cariótipo da população de *Pimelodus maculatus* da represa de Miranda.

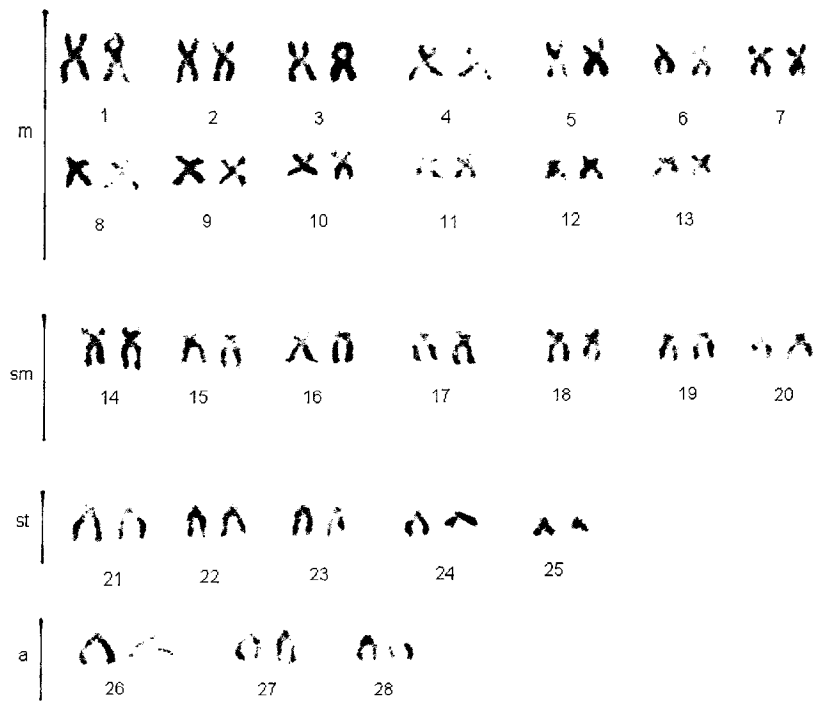


Figura 3: Cariótipo da população de *Pimelodus maculatus* do rio Tijuco.

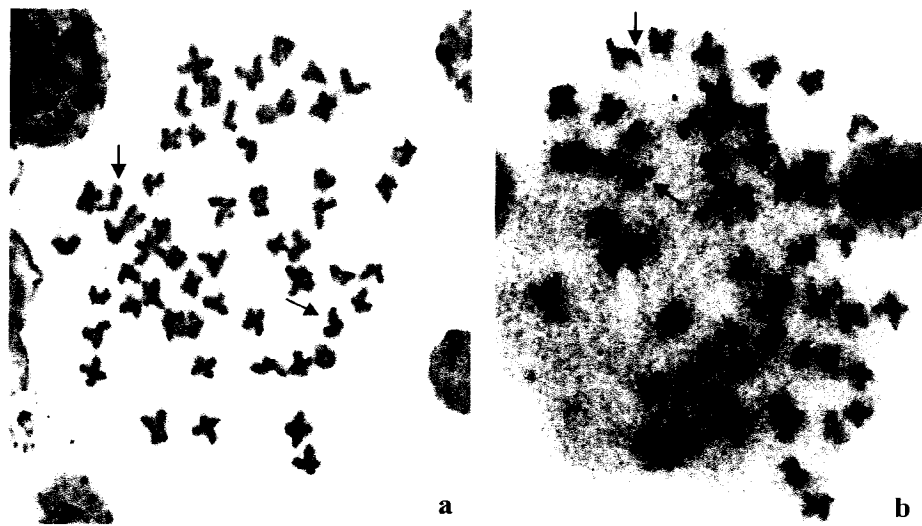


Figura 4: Metáfases mitóticas tratadas com nitrato de Prata nas populações da: a) represa de Nova Ponte e b) represa de Miranda. As setas indicam os cromossomos subtlocêntricos com marcações terminais da NOR.

A população de *P. maculatus* da represa de Miranda (fig. 5b) revelou bandas heterocromáticas centroméricas e teloméricas em vários pares de cromossomos e um padrão parecido ao da população da represa de Nova Ponte. Como esta, também apresentou banda intersticial no segundo par de cromossomos metacêntricos, banda C positiva na região da NOR e cromossomos com marcas biteloméricas. Coincidiram, nas duas populações, marcações heterocromáticas mais fortes nos pares cromossômicos de números 2, 4, 5, 14, 23 e 26. Além destes, diferentemente dos exemplares de Nova Ponte, os pares número 8 e 15, metacêntrico e submetacêntrico, respectivamente, apresentaram marcações biteloméricas fortes.

Já os espécimes do rio Tijuco (fig. 5c) apresentaram padrão heterocromático diferente em relação às outras duas populações, apesar de, também, possuir marcas heterocromáticas teloméricas e centroméricas em vários pares cromossômicos. Esta população não teve tantos cromossomos marcados bitelomericamente quanto às outras, já que apenas os cromossomos 5 e 19 apresentam este tipo de marcação. O cromossomo de número 5 está representado em todas as populações, com o mesmo tipo de marcação heterocromática.

A marca intersticial no segundo par de cromossomos metacêntricos não esteve presente como nas outras populações, mas a banda C também foi positiva na região da NOR, apesar de esta ser mais fraca e estar presente no cromossomo de número 22. Em algumas células de dois exemplares desta população, visualizou-se um par de cromossomos submetacêntricos com marcação intersticial em seus braços longos. Os cromossomos mais fortemente marcados pelo bandeamento C foram: o par 3 de metacêntricos, com bloco próximo ao centrômero e no telômero; o par 5 de metacêntricos, com banda bitelomérica; o par 14 de submetacêntricos, com marca telomérica nos braços curtos; o par 19 de submetacêntricos, com banda bitelomérica; e o par 23 de subtelo-cêntricos, com marcação telomérica nos braços curtos.

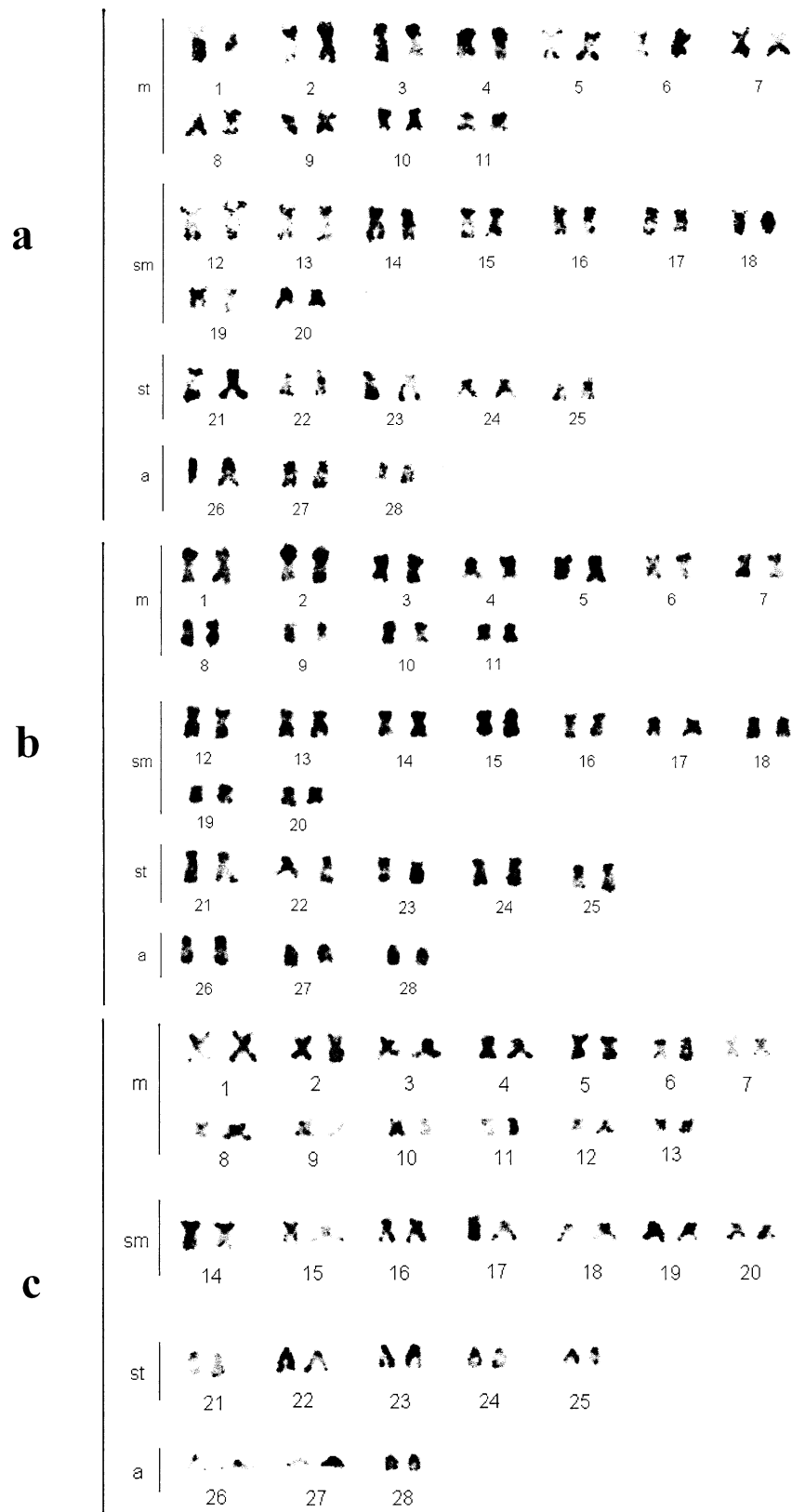


Figura 5: Padrão de distribuição heterocromática nas populações: a) Nova Ponte, b) Miranda e c) Tijucu.

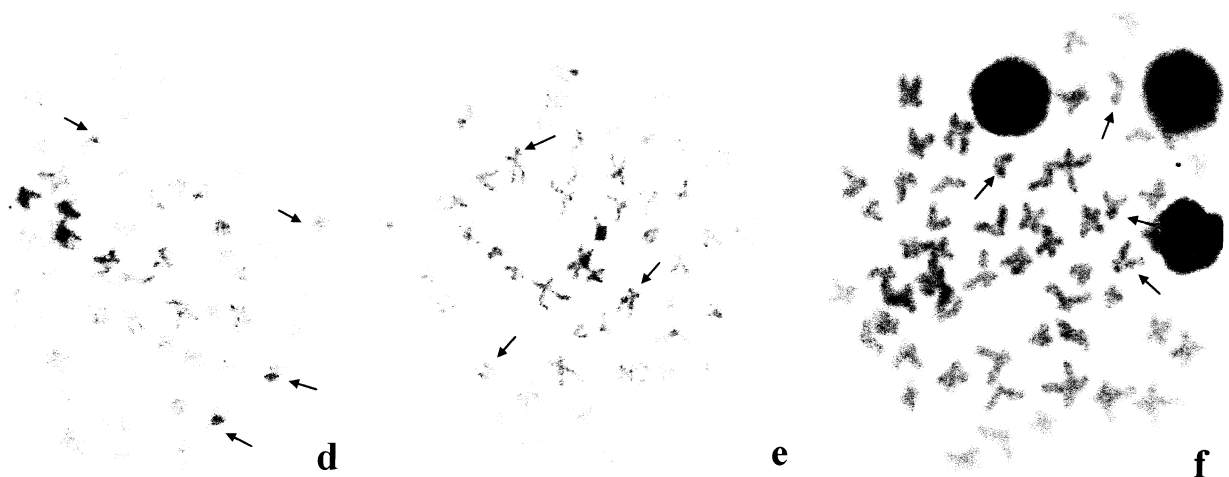
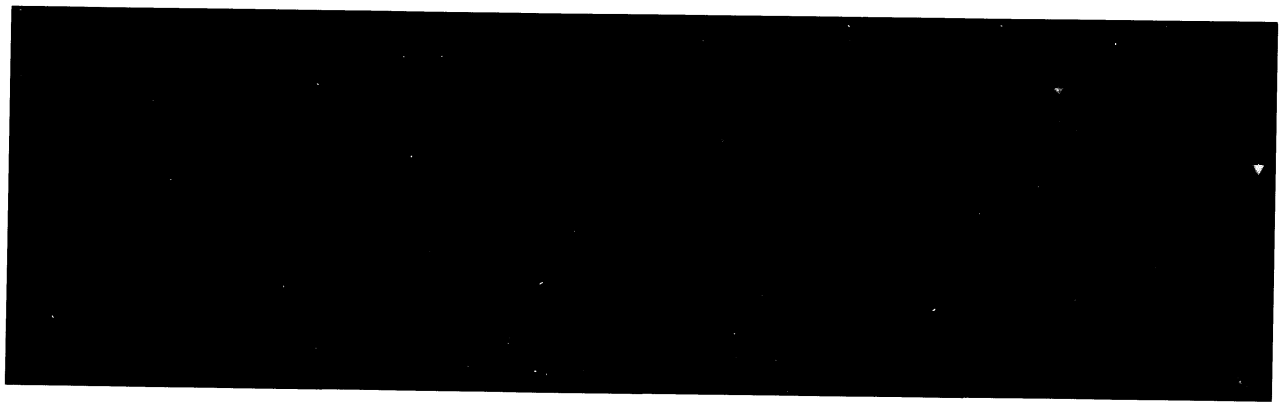


Figura 6: Metáfases de *P. maculatus* submetidas ao tratamento com Cromomicina A₃ e enzima de restrição *Hinf*I. Figuras a, b e c representam a coloração com Cromomicina A₃, respectivamente, nos exemplares da represa de Nova Ponte, da represa de Miranda e do rio Tijuco. As figuras d, e, e f referem-se ao tratamento com a enzima de restrição *Hinf*I, respectivamente, nas populações Nova Ponte, Miranda e Tijuco. As setas amarelas indicam os cromossomos que apresentam marcações deste fluorocromo e as setas pretas as marcações produzidas pela digestão da endonuclease de restrição, sendo teloméricas e centroméricas nas figuras d e f e intersticiais na figura e.

A coloração com fluorocromo GC específicos (cromomicina A₃) mostrou-se diferente nos exemplares de duas localidades hidrográficas. Nas populações da represa de Nova Ponte (fig. 6a) e do rio Tijuco (fig. 6c), ocorreu marcação apenas do par de cromossomos correspondente ao marcado pela NOR. Já, a população da represa de Miranda (fig. 6b), apesar de também ter os cromossomos correspondentes da NOR marcados, teve marcação intersticial nos braços longos em um par cromossômico submetacêntrico.

O tratamento das metáfases com a endonuclease de restrição *Hinf* I produziu, nas três populações (fig. 6d, e, f), um padrão em que alguns cromossomos foram mais

fortemente corados (menor digestão pela enzima) nas porções teloméricas e centroméricas. Entretanto, a população de Miranda (fig. 6e) apresentou marcas intersticiais em um par de cromossomos metacêntricos e nos braços longos de um par de submetâcentricos, não visualizadas nas outras duas populações.

DISCUSSÃO

Oliveira e Gosztanyi (2000) sugeriram que o número diplóide de 56 pode ser uma característica ancestral dos Siluriformes, já que a maioria das espécies do grupo apresentam este número diplóide modal, como descrito para: *P. absconditus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); *P. altipinnis* (SOUZA *et al.*, 2000a); *P. argentus* (SOUZA *et al.*, 2003); *P. blochii* (FARIA *et al.*, 2000); *P. clarias* (FENOCCHIO *et al.*, 1994); *P. heraldoi* (SOUZA *et al.*, 2004a); *P. maculatus* (presente trabalho); *P. mysteriosus* (SOUZA *et al.*, 2003); *P. ornatus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); *P. ortmanni* (TERENCIO *et al.*, 2001); e *Pimelodus sp.* (DIAS; FORESTI, 1993).

As três populações estudadas apresentaram o mesmo número diplóide, característica freqüentemente encontrada no gênero, sendo sugerido por SOUZA *et al.* (2003) que esta seja uma característica plesiomórfica, ou seja, primitiva do gênero *Pimelodus*. Foram encontradas raras exceções a esta constância do número cromossômico, como em *Pimelodus blochii* (DELLA-ROSA *et al.*, 1980) e *P. maculatus* do rio Jarí Almerim (SOUZA *et al.*, 2000b), que apresentaram número diplóide $2n = 58$ e em *P. fur*, que apresentou número diplóide $2n = 54$.

Tais características, raras neste gênero, são consideradas apomórficas e, em *P. fur*, pode ter sido ocasionada por fusões cromossômicas ou translocações (GARCIA, 2005). Além disso, o número diplóide pode sofrer variações com a ocorrência de cromossomos supranumerários ou cromossomos B, como reportado pela primeira vez no gênero *Pimelodus* em estudo realizado por Borin e Martins-Santos em 2004, nas espécies de *P. ortmanni* e *Pimelodus sp.* presentes no rio Iguaçu.

Enquanto a maioria das espécies e populações de diferentes bacias hidrográficas mostram-se constantes quanto ao número cromossômico, suas fórmulas cariotípicas variam, conforme observado na tabela 1. Além de ocorrer variação na fórmula cariotípica entre diferentes espécies deste gênero, esta também ocorre na mesma espécie de diferentes populações, como revelado neste estudo: populações de Nova Ponte e Miranda, com cariótipo composto de $22m + 18sm + 10st + 6a$ e população do Tijuco, com cariótipo composto de $26m + 14sm + 10st + 6a$.

A diversificação de fórmulas cariotípicas nessas populações podem ser resultado de diferenças no grau de condensação dos cromossomos ou de rearranjos cromossômicos, que foram estabilizados no curso evolutivo das diferentes populações,

produzindo populações polimórficas. Alguns autores, dentre os quais, Souza *et al.* (2003) e Borin e Martins-Santos (2004) compartilham a idéia de que os arranjos cromossômicos estruturais podem ser a principal mudança que ocorre durante o processo de evolução do gênero *Pimelodus*, resultando na variação das fórmulas cariotípicas entre as espécies e populações do grupo.

Apesar de, também, ocorrer variação no número de braços cromossômicos no gênero, com NF variando de 88 a 110 (tabela 1), as três populações apresentaram o mesmo NF, igual a 106. Tal resultado corrobora com os demais dados para a família e o gênero, os quais apresentam sempre NF maior que 80, indicando predominância de cromossomos de dois braços (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002).

A presença de sítios de regiões organizadoras de Nucléolos nas posições terminais dos cromossomos é outro fator bastante conservado entre as espécies e populações do gênero, sendo esta uma característica ancestral do grupo (DIAS; FORESTI, 1993; GARCIA, 2005; SWARÇA *et al.*, 2001; presente estudo).

Como ocorrido em muitos estudos, *P. absconditus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); *P. maculatus* (SWARÇA *et al.*, 2001); e *P. ortmanni* (MARGARIDO; GAVASSO, 2000); entre outros, a utilização da técnica de impregnação por nitrato de Prata nas três populações revelou NOR do tipo simples e localizada na porção terminal dos braços longos de um par de cromossomos subtelocêntricos.

De acordo com Borin e Martins-Santos (2004), a presença deste tipo de NOR simples no gênero é uma característica plesiomórfica, enquanto que regiões organizadoras nucleolares presentes nos braços curtos de um par cromossômico subtelocêntrico (*P. ornatus* em BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002; e *P. mysteriosus* e *P. argenteus* em SOUZA *et al.*, 2003) constitui característica apomórfica do grupo.

No estudo das bandas heterocromáticas evidenciadas pela técnica de bandeamento C, pode-se observar um padrão com menor quantidade de heterocromatina constitutiva quando comparado a outros grupos de peixes, coincidindo com relatos de outros autores de que este é um padrão freqüente na subordem Siluroidei (SOUZA *et al.*, 2003; VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000; VISSOTO *et al.*, 1999).

Em todas populações analisadas foram evidenciadas marcações centroméricas e teloméricas em vários pares cromossômicos, o que coincide com o que se encontra no gênero *Pimelodus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002, 2004; SOUZA *et al.*, 2003;

SWARÇA *et al.*, 2001). Contudo, a heterocromatina foi encontrada, principalmente, na porção telomérica, característica freqüentemente observada nesse grupo (SOUZA *et al.*, 2003).

Na família Pimelodidae, pouca ou nenhuma marcação intersticial aparece em análises de bandeamento C (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002). No presente estudo, este tipo de banda ocorreu no 2º par de cromossomos metacêntricos das populações de Nova Ponte e Miranda e, ainda, observada em alguns exemplares do Tijuco, nos braços longos de um par cromossômico submetacêntrico. Em outros estudos esta marcação foi, também, encontrada, como em *P. absconditus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); *P. altipinnis* (SOUZA *et al.*, 2000a); *Pimelodus sp.* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004) e em algumas populações de *P. maculatus* analisadas por Borin e Martins-Santos (2002, 2004), Souza *et al.* (2000b, 2003) e Vissotto *et al.* (1999).

No entanto, a localização da marca heterocromática intersticial no cariótipo e no cromossomo diferiu entre os descritos na literatura e os encontrados neste trabalho. Enquanto que populações de *P. maculatus* do rio Miranda e Nova Ponte possuem marca intersticial em um par cromossômico metacêntrico, *P. maculatus* e *P. absconditus* do rio Paraná-PR apresentam banda intersticial nos braços longos do primeiro par cromossômico subtelocêntrico e nos braços curtos do primeiro par de cromossomos submetacêntricos (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); e *Pimelodus sp.* e *Pimelodus ortmanni* do rio Iguaçu-PR apresentam marcação intersticial nos braços curtos do primeiro cromossomo submetacêntrico (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004).

De acordo com Borin e Martins-Santos (2002) e Souza *et al.* (2003), alterações cromossômicas, como as inversões, podem acarretar no aparecimento de bandas heterocromáticas intersticiais em algumas populações do gênero. A ocorrência de inversão se daria na região de heterocromatina constitutiva no término do cromossomo, resultando na diversificação cariotípica do grupo.

A ausência da marca intersticial no 2º par de cromossomos metacêntricos na população do rio Tijuco, pode ter sido resultado de rearranjos cromossômicos, como uma inversão pericêntrica, que envolveria a região da banda intersticial do cromossomo metacêntrico e resultaria em um cromossomo submetacêntrico com bloco heterocromático nos braços curtos, encontrado no Tijuco (fig. 7).

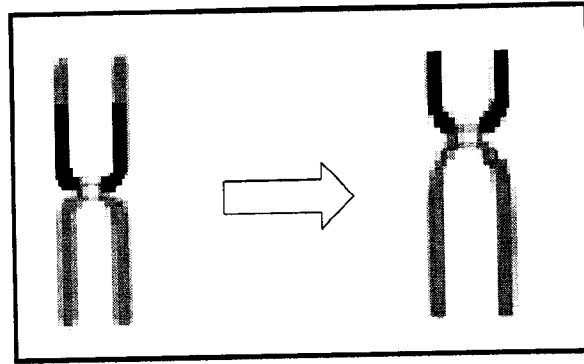


Figura 7: Esquema da possível inversão pericêntrica entre as populações de Araguari e Tijuco. A inversão envolveria a região da banda intersticial do cromossomo metacêntrico resultando em um cromossomo submetacêntrico com bloco heterocromático nos braços curtos.

A presença de vários pares cromossômicos marcados em ambos telômeros, nas três populações, têm sido reportada, também, em outras pesquisas do gênero, como em *P. absconditus* e *P. ornatus* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002); em *Pimelodus sp.* e *P. ortmanni* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004); em *Pimelodus heraldoi* e *Pimelodus sp.* (SOUZA *et al.*, 2004b); entre outros.

O número de cromossomos com marcas biteloméricas variou entre as populações, mas todas apresentaram o par de cromossomos metacêntricos número 5 com este tipo de marcação. Diante deste fato, pode-se inferir que esta seja uma característica homóloga da espécie presente na região da bacia do rio Paranaíba.

De acordo com Souza *et al.* (2004b), a presença de um cromossomo metacêntrico com marcação heterocromática bitelomérica forte parece ser padrão entre algumas espécies da família Pimelodidae. Tal fato pode constituir importante ferramenta para elucidação de estudos filogenéticos nesta família.

Em todas populações foram encontrados sítios fluorescentes coincidentes com as regiões marcadas pela NOR, isto é, nas regiões teloméricas dos braços longos de um par de cromossomos subtelo-cêntricos. Na maioria das famílias de peixes, a NOR se encontra em uma região associada a segmentos de DNA ricos em bases GC, o que explica a frequência de coincidência de sítios marcados tanto pela Ag-NOR quanto pela CMA₃ no gênero (GOLD *et al.*, 1990).

As populações puderam ser distinguidas através desta técnica, o que demonstra sua importância, pois a população da represa de Miranda apresentou um par de cromossomos com coloração fluorescentes intersticiais nos braços longos de um cromossomo submetacêntrico, enquanto as demais não. Esta característica pode ser

30

derivada e advinda de rearranjos cromossômicos ou pode ocorrer em alguma ou nas duas outras populações, mas que não puderam ser evidenciadas pelo tratamento com cromomicina A₃.

Esta variação de padrão na afinidade ao fluorocromo GC específico também ocorreu em estudos de outras bacias hidrográficas. Em *P. maculatus* do rio Paraguai, o tratamento com CMA₃ resultou em marcações em vários pares cromossômicos, em sua maioria nas porções teloméricas, incluindo o par com a NOR e um par com banda fluorescente intersticial. Já, as populações de *P. maculatus* dos rios Tibagi-PR e Paraná-PR apresentaram marcas fluorescentes apenas no par com regiões organizadoras nucleolares (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; SWARÇA *et al.*, 2001).

A análise das lâminas submetidas ao tratamento com endonucleases de restrição *Hinf* I permitiu verificar, nas três populações, regiões mais fortemente coradas, não digeridas pela enzima, nas porções teloméricas e centroméricas. Tal padrão foi similar ao encontrado no bandeamento C e coincide com resultados obtidos por Swarça *et al.* (2001) em *P. maculatus*, com a enzima *Alu* I. Tal resultado mostra que a enzima apresenta menor especificidade por regiões heterocromáticas.

A população da represa de Miranda pôde ser diferenciada das demais por apresentar dois pares de cromossomos com marcas intersticiais: um par de cromossomos metacêntricos, provavelmente o mesmo com marca intersticial heterocromática evidenciada na banda C (2º par), e um par de cromossomos submetacêntricos com marca intersticial nos braços longos, que, possivelmente, é o mesmo par que teve marca intersticial rica em bases GC no bandeamento por CMA₃.

Os resultados apresentados foram importantes para confirmar a localização de algumas regiões heterocromáticas nos cromossomos de espécimes de *P. maculatus* da bacia do rio Paranaíba. Além disso, podemos hipotetizar que a região intersticial do par de cromossomos submetacêntricos dos exemplares de Miranda é heterocromática, já que foi evidenciada pela coloração por fluorocromo e pela enzima de restrição *Hinf* I.

Apesar de populações das represas de Miranda e Nova Ponte encontrarem-se separadas por uma barragem apenas recentemente, o aparecimento de um par cromossômico submetacêntrico com marcas intersticiais heterocromáticas em seus braços longos, somente na população de Miranda, mostra que já ocorrem diferenças citogenéticas entre essas duas populações.

Pode-se dizer, então, que as três populações tiveram diferenças de marcações citogenéticas entre si. Todavia, nos exemplares do Rio Tijuco as diferenças foram maiores, e estiveram presentes no cariótipo e nos bandeamentos citogenéticos, notadamente na banda C. Tal fato pode ser explicado pelo tempo das barragens existentes entre estas populações. A barragem que separa os indivíduos das duas represas do rio Araguari é mais recente em comparação às que separam os indivíduos do Tijuco dos demais.

CONCLUSÕES

Os estudos citogenéticos realizados em espécimes de *Pimelodus maculatus* de três populações pertencentes à Bacia do rio Paranaíba, permitiram concluir que:

- ❖ As tendências evolutivas das populações de *P. maculatus* estudadas citogeneticamente na bacia do rio Paranaíba permanecem, relativamente, conservadas, através da comparação com outros relatos presentes na literatura, envolvendo a espécie e o gênero de outras bacias hidrográficas.
- ❖ Pode-se atribuir as diferenças das fórmulas cariotípicas entre as populações do rio Araguari e Tijuco, principalmente, ao diferente grau de condensação cromossômica, já que a variação entre os cariótipos se dá nos grupos de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, somente.
- ❖ Os resultados de análise da Ag-NOR mostram que a NOR presente na porção terminal dos braços longos de um par cromossômico é uma característica plesiomórfica do gênero *Pimelodus*, já que esta aparece na maioria dos estudos do grupo em diferentes bacias hidrográficas do Brasil.
- ❖ Através da banda C, pode-se notar diferença na estrutura cromossômica entre as populações do rio Tijuco e rio Araguari sugerindo a ocorrência de uma inversão pericêntrica, que envolveria a região da banda intersticial do cromossomo metacêntrico.
- ❖ O cromossomo metacêntrico de número 5 apresentou marcação heterocromática bitelomérica forte em todas as populações, assim como foi evidenciado em outros estudos da família Pimelodidae. Pode-se dizer que esta seja uma característica homóloga para este grupo nesta região.
- ❖ Basicamente, as três populações tiveram padrões de fluorocromo GC específicos iguais e coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo, contribuindo para a afirmação de que as NORs se encontram em uma região associada a segmentos de DNA ricos em bases GC.

- ❖ O par de cromossomos submetacêntricos com marcas intersticiais nos braços longos presentes na população de Miranda, permitiu verificar que as populações de Nova Ponte e Miranda apresentam diferenças citogenéticas, apesar de estarem separadas há pouco tempo.
- ❖ Depois de analisar todas técnicas citogenéticas desenvolvidas no trabalho, foi possível elucidar que a existência de barragens mais velhas, que separam a população do Tijuco das demais estudadas, pode ter sido a causa para a ocorrência de maiores diferenças no cariótipo e na coloração com banda C nos exemplares do Tijuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEMIYA, C. T.; GOLD, J. R. Chrommycin A3 stains Nucleolus Organizer Regions of fish chromosomes. **Copeia**. 1: 226-231. 1986.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. PUBLICATIO UEPG - **Biological and Health Sciences**. 6(1):43-60. 2000.

BACARRO, C. A.; MEDEIROS, S. M.; FERREIRA, I. L.; RODRIGUES, S. C. Mapeamento Geomorfológico da Bacia do rio Araguari (MG). In: LIMA, S. C.; SANTOS, R. J. (Org.). **Gestão Ambiental da Bacia do rio Araguari - rumo ao desenvolvimento sustentável**. Uberlândia, UFU/IG; Brasília: CNPq, 2004.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. 1: 103-120. 1978.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná basin. **Cytologia**. 67: 199-204. 2002.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. **Hereditas**. 140: 201-209. 2004.

BRITO, L. S.; ROSA, R. Elaboração do mapa de solos da bacia do rio Araguari na escala de 1:500. **II Simpósio Regional de Geografia**, 2003. Disponível em: <http://www.ig.ufu.br/2srg/2/2-123F.pdf>.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce. In: CARVALHO, J. C. M (coord). **Atlas da fauna brasileira**. São Paulo: Ed. Melhoramentos.1981. p.84-93.

- BRITSKI, H. A.; GARAVELLO, J. C. Two new southeastern Brazilian genera of Hypoptopomatinae and a redescription of *Pseudotocinclus* Nichols, 1919 (Ostariophysi, Loricariidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**. 35: 225-241. 1984.
- BURGESS, W. E. **An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the siluriformes**. Neptune City, New Jersey: T.F.H. Publications. 1989. 784p.
- CAMILO, F. M. **Estudos citogenéticos em algumas espécies de peixes da família Locariidae pertencentes à bacia do rio Piracicaba**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004. 61f.
- CENTOFANTE, L. **Citogenética comparativa entre ictiofáunulas isolados por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na Serra da Mantiqueira**. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003. 163f.
- DELLA-ROSA, V. A.; BERTOLLO, L. A. C.; FERRARI, I.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. Estudos citogenéticos de peixes da Amazônia. II. Ordem Siluriformes. **Ciência e Cultura**. 32(7): 735. 1980.
- DIAS, A. L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Revista Brasileira de Genética**. 16(3): 585-600. 1993.
- FARIA, A. A.; BRITO, J. G.; VENERE, P. C. Citogenética de Pimelodidae: caracterização cromossômica de *Pimelodus blochii*, *Pimelodella cristata* e *Hemisorubini platyrhynchos* (Siluriformes) do médio rio Araguaia. **Resumos VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. 2000. p. 92.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. **Cytobios**. 69: 41-46. 1992.
- FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. Cytogenetic studies and correlations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). **Cytologia**. 68(4): 363-368. 2003.

- FENOCCHIO, A. S.; PSTORII, M. C.; LOPEZ, P. A.; SANCHEZ, S.; ALBERDI, A. J.; BORDENAVE, S.; DIB, M. C. Levantamento citogenético em peixes de água-doce da Argentina: resumo das espécies estudadas. **Resumos do V Simpósio de Citogenética Aplicada a Peixes Neotropicais**. Botucatu, SP. 1994. p.8.
- GALETTI Jr., P. M.; MESTRINER, C. A.; VENERE, P. C.; FORESTI, F. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). **Cytogenetics and Cell Genetics**. 56: 116-121. 1991.
- GALETTI Jr., P. M.; MONACO, P. J.; MESTRINER, C. A.; RACH, E. M. NOR polymorphisms in fishes by silver nitrate, chromomycin A3 "in situ" hybridization with non radioactive probe. **IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. 1992. p.10.
- GALETTI Jr., P. M.; RASCH, E. M. Nor variability in diploid and triploid forms of the Amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A3 staining. **Brazilian Journal of Genetics**. 16(4): 927-938. 1993a.
- GALETTI Jr., P. M.; RASCH, E. M. Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei, poeciliidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. 4: 269-277. 1993b.
- GARCIA, C. **Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2005. 104f.
- GOLD, J. R.; LI, Y. C.; SHIPLEY, N. S.; POWERS P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**. 37: 563-575. 1990.
- GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 137 p. 1988.
- GUILHERME, L. C. **Estudos reprodutivos e citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (PISCES, RHAMDIIDAE) do rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG**. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2005. 76f.

- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2002.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experimentia**. 36: 1014-1915. 1980.
- KANTEK, D. L. Z. **Estudo citogenético comparativo entre populações de uma espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) endêmica do rio Iguaçu**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005. 70f.
- KIM, D. S.; PARK, E.; KIM, J. S. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes. **Korean Journal of Genetics**. 4: 57-68. 1982.
- MAISTRO, E. L. **Caracterização morfológica estrutural de cromossomos supranumerários em peixes**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 1996.
- MANTOVANI, M. **Citogenética comparativa entre populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Paranapanema**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2001. 97f.
- MARGARIDO, V. P.; GAVASSO, E. Análise cariotípica em *Pimelodus ortomanni* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) coletado no rio Iguaçu – Bacia do Iguaçu. **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP. 2000. p. 63.
- MARQUES, D. K. S. **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia do Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso**. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003. 66f.
- MEES, G. F. Auchenipeteridae and Pimelodidae. **Zoologische Verhandelingen**. 132: 115-246. 1974.

- MESTRINER, C. A. **Análise de regiões organizadoras de nucléolos e investigação do sistema XX/XY descrito para *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae).** Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1993. 58f.
- MEZZANNO, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R.; FERRUCCI, L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics.** 36: 562-566. 1983.
- MILLER, D. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research.** 101: 235-243. 1976.
- MORELLI, S. **Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero *Hoplias*, Grupo *lacerdae*. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1988. 76f.
- NELSON, S. J. **Fishes of world.** New York: John Wiley; Sons. 1994. 600 p.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. **Resumos VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes.** Manaus –AM. 2000. p. 24.
- OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. **Caryologia.** 53(1): 31-37. 2000.
- OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO FILHO, S. de A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética.** 11(3): 577-624. 1988.
- OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. **Netherlands Journal of Zoology.** 42 (2-3):277-290. 1992.
- PATHAK, S.; ARRIGHI, F. E. Loss of DNA following C-banding procedures. **Cytogenetics and Cell Genetics.** 12: 414-422. 1973.

- PINNA, M. C. C. **Higher-Level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Telostei, Ostariophysi)**. Tese de Doutorado - The City University of New York, New York. 1993.
- SANTOS, L.; BACCARO, C. A. D. Caracterização geomorfológica da bacia do rio Tijuco. **Caminhos de Geografia**. 1(11):1-21. 2004.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in anura. **Chromosoma**. 77: 83-103. 1980.
- SILVA, S. V. S. **Estudos citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia quelen* da região do Triângulo Mineiro**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2007. 43f.
- SOUZA, A. C. P.; NAGAMACHI, C. Y.; RODRIGUES, L. R. R.; RISSINO, J. D.; BARROS, R. M.; PIECZARKA, J. C. Descrição cariotípica de *Pimelodus gr. altipinnis* (Siluriformes, Pimelodidae). **Resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP. 2000a. p. 62.
- SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Parana River Basin of Brazil. **Folia biologica (Kraków)**. 52(3-4): 165-169. 2004a.
- SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River Basin. **Cytologia**. 68 (4): 345-350. 2003.
- SOUZA, L.; SWARÇA, A. C.; DIAS, A. L. Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA3 and FISH with the 18S rDNA probe. **Caryologia**. 57(2): 145-151. 2004b.
- SOUZA, A. C. P.; NAGAMACHI, C. Y.; RISSINO, J. D.; JAIME Jr, R. C.; BARROS, R. M.; PIECZARKA, J. C. Descrição cariotípica de *Pimelodus cf. maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae). **VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Manaus-AM. 2000b. p. 90.

- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75: 304-306. 1972.
- SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**. 110: 97-100. 2001.
- TERENCIO, M. L.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Citogenética de *Pimelodus ortomanni*, uma espécie de mandi endêmica ao rio Iguaçu. **Anais do 47º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP. 2001.
- TOLEDO, V.; FERRARI, I. Estudo citogenético de três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Científica**. 4(2):101-106. 1976.
- TORRES-MARIANO, A. R. **Descrição citogenética de espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2001. 58f.
- VASCONCELOS, C.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). **Hereditas**. 132: 103-109. 2000.
- VERMA, R. S. **Heterochromatin: molecular and structural aspects**, New York: Cambridge University Press. 1988.
- VISSOTO, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Science**. 3: 1-7. 1999.
- WICHMAN, H. A.; PAYNE, C. T.; RYDER, O. A.; HAMILTON, M. J.; MALTBIE, M. e BAKER, R. J. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**. 82: 369-377. 1991.

Site consultado

<http://www.mg.gov.br>