

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Estudos Citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia*
quelen da região do Triângulo Mineiro.

Aluna: Sabrina Vaz dos Santos e Silva

Orientadora: Prof. Dr^a Sandra Morelli

UBERLÂNDIA - MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586e Silva, Sabrina Vaz dos Santos e, 1979-

Estudos citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia quelen* da região do Triângulo Mineiro / Sabrina Vaz dos Santos e Silva. -- 2007.

43 f. : il.

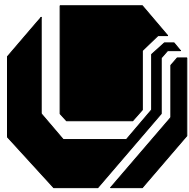
Orientadora: Sandra Morelli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética animal - Teses. 2. Peixe - Genética - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 591.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

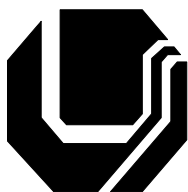
Estudos Citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia
quelen* da região do Triângulo Mineiro.

ALUNA: Sabrina Vaz dos Santos e Silva

Orientador: Prof. Dr^a Sandra Morelli

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA-MG
2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Estudos Citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia
quelen* da região do Triângulo Mineiro.

ALUNA: Sabrina Vaz dos Santos e Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr^a Sandra Morelli (Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: 28 /02 / 2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

Dedico esta dissertação a minha amada avó Nair Vaz dos Santos, pelos preciosos ensinamentos e por todo amor dedicado. E aos meus pais, Suzete e Reinaldo, pelo apoio e paciência.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTO

A Prof. Dr^a. Sandra Morelli, pelas orientações, paciência, amizade, dedicação e por acreditar em mim.

Aos amigos e companheiro do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Uberlândia, por tornarem o local de trabalho mais leve e alegre, em especial a Ana Carolina Humanes, Valéria Barbosa de Souza e Roberto Augusto Silva Molina pelo auxílio prestado neste trabalho e horas de descontração.

Ao meu amigo Robson José de Oliveira Júnior, pelas horas de trabalho, amizade, confiança, ajudas, risadas e sugestões e a Elaine Sílvia Dutra pela amizade e por dividir as angústias, alegrias e dúvidas do mestrado.

Ao José Clidenor, sem o qual essa dissertação não seria possível, pelo auxílio e paciência nas coletas noturnas.

Ao Prof. Dr. Robson Carlos Antunes, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, e pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) Dr^a. Margot Alves Nunes Dode, Dr. Maurício Machaim Franco e Dr. Eduardo de Oliveira Melo pelas oportunidades e confiança.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, pessoas responsáveis pela minha formação acadêmica e profissional.

As colegas Msc. Juliana Martins e Msc. Fernanda por me darem à honra de realizar trabalhos em outras áreas, ampliando meus horizontes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e a CAPES pela oportunidade dada para a realização deste trabalho e apoio financeiro.

Aos meus pais, por uma vida cheia de amor, incentivo, paciência, apoio e por sempre acreditar em mim.

Aos meus irmãos, tios e primos, em especial Suze Vaz dos Santos e Sônia Vaz dos Santos, pela grande torcida.

Aos meus grandes amigos Luciana Lima Pires e, em especial, Gustavo André Góis dos Santos pela paciência para ouvir meus problemas e por acreditar que eu podia ir além.

Em fim agradeço a todos que torceram e contribuíram para realização deste trabalho.

Lista Figuras

Figura 1: Locais de coleta de <i>Rhamdia quelen</i>	24
Figura 2: População do córrego do Bebedouro	25
Figura 3: População do rio Araguari	26
Figura 4: População do rio das Pedras	27
Figura 5: População do rio Tijuco	28
Figura 6: Metáfases de <i>Rhamdia quelen</i> com diferentes tratamentos	29
Figura 7: Esquema da possível origem da NOR intersticial do rio Tijuco	31

Sumário

Introdução Geral.....	1
Capítulo 1: Aspectos citogenéticos da família Heptapteridae	3
Citogenética de Peixes	3
A família Heptapteridae	5
Cromossomos B, Supranumerários ou Acessórios.	7
Marcações e Bandeamento Cromossômico.....	11
Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs)	11
Heterocromatina	12
Referências Bibliográficas	14
Capítulo 2 Estudos cromossômicos em <i>Rhamdia quelem</i>	19
Resumo	19
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Materiais e Métodos	22
Resultados.....	22
Discussão	29
Referências Bibliográficas	34
Anexo 1	39
Material e Métodos	39
Material	39
Métodos	39
Preparação dos cromossomos mitóticos.....	39
Detecção das NORs pela impregnação com nitrato de Prata (Ag-NORs).40	
Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandas C).....	40
Coloração com Cromomicina A ₃	41
Coloração com Hoechst 33258	41
Técnica de bandamentos por endonucleases de restrição.....	42
Cd- Banda	42
Montagem do cariótipo	43

Introdução Geral

A maior e mais variada ictiofauna do planeta encontra-se no Brasil, devido ao seu extenso sistema hidrográfico, muitas espécies ainda são desconhecidas. O papel econômico da ictiofauna no Brasil não se restringe somente ao comércio, mas possui um extenso atrativo o crescente ramo do turismo ecológico. Entretanto, além da poluição de rios e córregos, que tem sido uma preocupação mundial e acarretam morte e/ou mutação de peixes, outro fato que merece atenção é a construção de barragens e hidroelétricas que provocam o peixamento indevido.

Situada na região do triângulo mineiro, Uberlândia é a segunda maior cidade do estado de Minas Gerais. Seu crescimento desordenado acarretou impactos ambientais, promovendo a degradação de rios e córregos do município, comprometendo a ictiofauna nestes locais.

A espécie de peixe *Rhamdia quelen*, pertence à Ordem Siluriforme, família Heptapteridae, e o gênero *Rhamdia* possui vinte e oito espécies e duas prováveis espécies novas. *Rhamdia quelen* tem vários nomes populares entre eles bagre, jundiá ou lobó. Por seu sabor característico ele possui grande importância econômica para as populações ribeirinhas de Minas Gerais. Os estudos citogenéticos fornecem uma importante contribuição para o conhecimento evolutivo e taxonômico da espécie, informações necessárias para o desenvolvimento da piscicultura e a realização de repovoamento nessa região.

A citogenética é a área da genética que tem como objetivo o estudo morfológico e estrutural dos cromossomos. Como ciência, a citogenética ainda auxilia o melhor entendimento evolutivo populacional e classificação das espécies dos peixes.

Os cromossomos B são cromossomos adicionais e teoricamente dispensáveis ao organismo, não pareiam e não são homólogos aos cromossomos As. Os cromossomos B foram encontrados em 40 espécies de diferentes táxons de peixes neotropicais, dentre dos aproximadamente 1,5% dos cariótipos estudados até agora. Eles podem possuir diferentes tamanhos, em *Astyanax* aparecem como macrocromossomos, em *Rhamdia* possuem

tamanho médio e em *Prochilodus* são microcromossomos. Existem diferenças quanto ao sexo e populações estudadas.

A origem desses cromossomos é ainda desconhecida, sendo várias as hipóteses desenvolvidas para explicá-la e elucidar a subsequente evolução dos cromossomos Bs. Eles podem ter se originado de um híbrido com sucesso, por tanto possuir origem inter-específica, ou através da não-dijunção ou por isocromossomo, tendo origem intra-específica. As duas hipóteses parecem ser plausíveis e verdadeiras.

Esses fatores, juntamente com a grande variação de número diplóide devido aos cromossomos B ou supranumerários torna *Rhamdia quelen* um excelente modelo para o desenvolvimento de estudos citogenéticos. O presente visa elucidar a caracterização citogenética de quatro populações de *Rhamdia quelen*, buscando a obtenção de novos dados que possam auxiliar em uma melhor compreensão de evolução cromossômica deste grupo.

Capítulo 1: Aspectos citogenéticos da família Heptapteridae

Citogenética de Peixes

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, assim como um dos mais extensos sistemas hidrográficos, com suas oito bacias. Devido a isto, os peixes assumem grande importância econômica, evolutiva e ecológica.

Toledo Filho et al., 1978 destaca a importância do estudo evolutivo dos peixes por possuírem uma posição chave na filogenia dos vertebrados, tendo assim um papel decisivo para a identificação de linhas evolutivas que originaram os Tetrapoda.

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. Para controlar o dano, são feitos repovoamentos indevidos que geralmente agravam o problema, com a introdução de espécies exóticas aos ambientes naturais já degradados, o que dificulta o estudo das espécies nativas. Essa diversidade e interações biológicas podem ser melhor estudadas com o auxílio da citogenética.

Os estudos ictiocitogenéticos proporcionam não só um maior conhecimento genético, mas auxiliam no entendimento da dinâmica evolutiva das populações de peixes. Além de ser um excelente meio de acompanhar o impacto dos poluentes fluviais na ictiofauna.

Trabalhos iniciais nessa área se restringiram ao número cromossômico das espécies, contudo, os avanços nas metodologias possibilitaram um conhecimento mais profundo das espécies estudadas (TORRES-MARIANO, 2001).

O grupo dos peixes apresenta poucas pesquisas citogenéticas quando comparado com outros vertebrados. As espécies relatadas citogeneticamente correspondem, somente, em cerca de 5% dos 20 000 ou mais espécies existentes. Essa situação reflete a natureza desfavorável dos tipos cromossômicos dos peixes para a cariotipagem, juntamente com o grande número de espécies que possuem a presença de pequenos cromossomos (FUJIWARA et al. 2001).

A citogenética de peixes neotropicais teve seu início na década de 70, com trabalhos em *Astyanax* por Jim e Toledo em 1975, *Pimelodidae* com Toledo e Ferrari (1976) e Michele et al. em 1977 com *Cichlidae* e *Loricariidae* (JIM; TOLEDO, 1975; TOLEDO; FERRARI, 1976; MICHELE et al., 1977 *apud* ARTONI et al., 2000). Segundo Oliveira et al. (1996 *apud* ARTONI et al., 2000) até o presente momento são conhecidos os números diplóides de 706 espécies, variando de $2n=20$ para *Pterolebias longipinnis* a $2n=134$ para *Corydoras aeneus*. Em peixes neotropicais os cromossomos sexuais ocorrem em aproximadamente 50 espécies e os supranumerários são verificados em torno 33 espécies (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

Segundo Torres-Mariano (2001) devido ao seu grande tamanho, o grupo dos peixes possui muita diversidade dentro das ordens, famílias, gêneros ou mesmo espécies. A ampla distribuição, principalmente nas diferentes bacias hidrográficas, leva ao isolamento reprodutivo. O isolamento geográfico das populações possui um papel importante na especiação, e também pode levar a extinção de pequenas populações (PAIVA et al., 2005).

No grupo dos ciclídeos e de alguns caracíformes, entre os quais podemos citar Curimatidae, Prochilodontidae, Parodontidae e Anostomidae com $2n=54$, a variabilidade cromossômica é menor. Dentro da família Characidae, é possível encontrar subfamílias com números constantes: Salminae (MARGARIDO, 1995; MONDIN et al., 1999; VENERE et al., 1996), Acestrorhynchinae (FALCÃO; BERTOLLO, 1985 *apud* MONDIN et al., 1999; TORRES-MARIANO 2001) e Bryconinae com $2n=50$ (MARGARIDO, 1995). As estruturas das populações estão relacionadas com a variabilidade ou conservacionismo dos cariotípicos (OLIVEIRA et al., 1988). O maior grau de variação cromossômica é mais freqüente em espécies que apresentam populações menores e sedentárias, já aquelas que possuem grandes populações de alta dispersão, teriam cariótipos mais conservados (MAISTRO, 1996).

Em estudos citogenéticos conduzidos nas subordens Gymnotoidei e Siluroidei da ordem Suluriformes, observou-se uma ampla variabilidade cariotípica, com diversidades tanto nos números cariotípicos quanto nas formas dos cromossomos. Na subordem Siluroidei o cariótipo parece ser mais

conservado, sendo o número cromossômico basal igual a $2n=56 +$ ou $- 2$ cromossomos (ARTONI et al., 2000; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992).

Nos Teleostei, os Loricariidae, conhecidos como bagres, são a segunda maior família em número de espécies. Possui 70 gêneros e 6 subfamílias (Neoplecostominae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Ancistrinae e Hypostominae). Há grande variação no número cromossômico nesse grupo, desde $2n= 36$ nos Loricariinae, *Rineloricaria latirostris*, até $2n=80$ nas espécies Hypostominae. Sugerindo vários rearranjos cromossomais como na divergente evolução cariotípica (ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2005).

As fusões cêntricas emergem como um processo potencialmente importante na evolução cariotípica (KAVALCO et al., 2005). Isto não exclui a ocorrência de outros rearranjos cromossomais na história evolutiva do grupo. A fissão centromérica é observada em outros vertebrados (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Feldberg (1990) propõe a hipótese de que rearranjos Robertsonianos, do tipo fissão cêntrica, tenham ocorrido na evolução cariotípica de *Potamorhina altamazonica* e *Potamorhina latior*, para tanto, supõe-se que fissões cêntricas seguidas de fusões e inversões em um ancestral das espécies, levaram as formações cariotípicas atuais. Segundo Feldberg, 1990 há um predomínio de fusões sobre as fissões. Os rearranjos Robertsonianos, fusão de dois cromossomos acrocêntricos formando um metacêntrico, causam diversificações cariotípicas numéricas e morfológicas sem alterar o número fundamental (número de braços).

As ampliações dos estudos citogenéticos em peixes possibilitaram o aumento na constatação de variações envolvendo tanto a estrutura quanto o número de cromossomos. Os avanços tecnológicos na área da citogenética, unida com as metodologias convencionais e clássicas, auxiliam a compreensão dos mecanismos de especiação que atuaram e atuam neste vasto grupo (MAISTRO, 1996).

A família Heptapteridae

O conhecimento citogenético dos peixes aumentou nos últimos anos. Apesar disto, alguns grupos são pouco estudados ou só possuem dados superficiais, um desses são as espécies da ordem Siluriformes, uma ordem

que possui várias famílias neotropicais com um grande número de espécies, muitos de importância econômica (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992). Um bom exemplo conhecido de polimorfismo em peixes, envolvendo rearranjos cromossômicos ocorrem na maioria dos gêneros da família Salmonidae (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2000).

Estudos com os Pimelodidae mostram que muitas espécies apresentam 56 cromossomos, apesar do número diplóide variar de 46 a 63. Estes dados predominam na maioria das espécies contidas nas subfamílias Sorubiminae e Pimelodinae (SEBASTIAN et al., 2000). Alguns gêneros da família Pimelodidae incluem *Pimodella*, *Rhamdia*, *Imparfinis*, *Cetopsorhamdia* e *Rhamdella* foram agrupados na nova subfamília Heptapteridae (Rhamdiidae), baseada em características morfológicas e genéticas (PINNA, 1993 *apud* SWARÇA et al., 2000).

Uma análise de dados de diferentes espécies das subfamílias Pimelodidae e Rhamdiidae identifica que de um total de 300 espécies, apenas 33 foram caracterizadas citogeneticamente. Os cariótipos de espécies de alguns gêneros mostraram uma grande variabilidade quanto ao número cromossômico (SWARÇA op cit). Os *Pimelodella* apresentaram um número diplóide de 46 a 58 cromossomos (SILVA et al., 1996; VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000), enquanto o gênero *Rhamdia* apresenta de 56 a 62 cromossomos (FENOCCHIO et al., 1994; GONZALES, 1994; TOLEDO; FERRARI, 1976 *apud* JORGE; SÁNCHEZ, 2005; ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 1996; JORGE; SEBASTIÁN, 2005). Oliveira et al. (1988) propõem que a extensiva variabilidade cariotípica entre as duas subfamílias sugere um reajuste cromossomal responsável pela especiação deste grupo. O principal rearranjo cromossômico responsável pela redução do número diplóide em *Pimelodella* parece ser a translocação robertsoniana (VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000). Entretanto, surgem rearranjos através de deleções como observado durante a diferenciação do sistema sexual cromossômico em *Pimelodella* sp (DIAS; FORESTI, 1993).

Segundo SWARÇA et al. (2000) a evolução cariotípica entre as duas subfamílias é mais divergente que uniforme. A Rhamdiidae possui uma grande

diversidade cariotípica, enquanto os Pimelodidae são mais constantes, amparando a decisão de elevar a subfamília o gênero Rhamdiidae.

Poucos estudos citogenéticos foram desenvolvidos nas espécies do gênero *Rhamdia*. *Rhamdia hilarii* foi descrita tendo $2n=58$ a $2n=63$ (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990, 2000; FENOCCHIO et al., 2003). As espécies *Rhamdia* sp. e *Rhamdia laticauda* possuem $2n=58$ (LE GRANDE, 1981 *apud* FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990), já em *Rhamdia quelen* Hochberg; Edtman (1988) observaram uma variação cromossômica de 58 a 59, raramente 60 cromossomos. Guilherme (2005) descreveu uma variação de $2n=58$ a $2n=65$ cromossomos na população de *Rhamdia quelen* do rio Uberabinha em Uberlândia-MG, sendo que sete cromossomos mostravam-se bastante heterocromáticos quando tratados com a técnica de banda C. Os cromossomos dos peixes deste gênero são muito pequenos, sendo freqüente a presença de dois braços, conseqüentemente o número fundamental é alto, mais de 100.

A variação é atribuída à presença de cromossomos supranumerários. No entanto o número diplóide mais comum nesse gênero é de 58, a variação do número fundamental nestas espécies é de 78 a 116. Algumas dessas variações podem ocorrer devido a diferentes graus de condensação cromossômica, levando a diferentes classificações de acordo com o autor. Outras razões podem ser rearranjos sofridos, como inversões, acarretando polimorfismos (SWARÇA et al., 2000).

Cromossomos sexuais foram observados somente em Rhamdiidae, sendo que *Pimelodella* sp., os machos são heterogaméticos, com o sistema XX/XY (DIAS; FORESTI, 1993) e em *Imparfinis mirini* as fêmeas são heterogaméticas, com o sistema ZZ/ZW (VISSOTTO et al., 1997 *apud* SWARÇA et al., 2003).

Cromossomos B, Supranumerários ou Acessórios.

Em animais a ocorrência de cromossomos supranumerários é comum em vários grupos, prevalecendo no Insecta (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990). Nos grupos de vertebrados ocorrem espécies que apresentam cromossomos extras ou supranumerários. A ocorrência pode ser esporádica, o cromossomo adicional pode ser um traço individual variando na população. Em alguns casos

esses cromossomos tornaram-se comuns em algumas espécies, tornando geração após geração, fixas nas espécies (VENERE et al., 1999). A primeira descrição desses cromossomos em peixes teleósteos ocorreu em *Prochilodus lineatus*, citado como *Prochilodus scrofa*, onde foram descritos cinco pequenos cromossomos fortemente heterocromáticos (PAULS; BERTOLLO, 1983 *apud* FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990), com variações numéricas inter e intra-individual. Outros casos foram relatados em peixes neotropicais tais como *Prochilodus lineatus* (ARTONI et al., 2006), *Iheringichthys labrosus* (CARVALHO; DIAS, 2005), *Astyanax eigenmanniorum* (TORRES-MARIANO, 2001) e no gênero *Rhamdia* (CENTOFANTE, 2003; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990; GARCIA, 2005; GUILHERME, 2005; entre outros).

De acordo com Jones; Rees (1982 *apud* ZHANG; ARAI, 2003) os cromossomos B podem ser facilmente distinguidos dos cromossomos normais pelos seguintes aspectos:

- 1) Geralmente possuem menor tamanho que o menor par do cariótipo;
- 2) Ocorre variação numérica inter e intra-individual;
- 3) Não há efeito morfológico obvio no fenótipo;
- 4) Heterocromatina positiva (Banda C positiva);
- 5) Alta freqüência em células meióticas;
- 6) Não pareiam durante a meiose.

Beukeboom (1994) descreve que os cromossomos supranumerários não são herdados de forma mendeliana; raramente possuem regiões organizadoras de Nucléolos; não há segregação na anáfase da mitose, resultando em freqüências variáveis entre os órgãos do mesmo animal; reduz a fertilidade e o desenvolvimento quando em grande número e não carrega genes com maiores efeitos. Os efeitos dos cromossomos supranumerários, como fertilidade, crescimento e aumento dos quiasmas, são mais pronunciados quando esses aparecem em números ímpares.

Apesar da maioria dos cromossomos supranumerários não afetarem os organismos a quem pertencem, nem todos permanecem totalmente inertes, alguns talvez apresentem atividade transcricional (BEUKEBOOM, 1994). Atualmente existem duas teorias para origem dos cromossomos Bs. Uma insiste na origem intra-específica, descendendo dos cromossomos acessórios

do complemento normal das espécies ou cromossomos A (JONES; REES, 1982 apud NÉO et al., 2000), como ocorre em *Astyanax scabripinnis*, onde a origem do grande cromossomo B metacêntrico pode ser derivado do cromossomo 24, um ponto de vista confirmado por análises dos complexos sinaptonêmicos (NÉO et al. 2000); Como ocorre em *Astyanax scabripinnis*, onde o grande cromossomos B metacêntrico pode ser um isocromossomo derivado do cromossomo 24 (MESTRINER et al., 2000) a outra hipótese defende que a primeiro plano, os cromossomos B possuem uma origem inter-específica devido aos cruzamentos entre espécies próximas (BATAGLIA, 1994; MCALLISTER; WERREN, 1997; PERFECTTI; WERREN, 2000 apud BORIN et al., 2004).

Portela-Castro et al. (2001) visualizaram em células germinativas, um total de 11 metáfases de espermatogônias, com 1B e 59 metáfases I em configuração bivalente. Entretanto algumas vezes univalentes foram observados. Cromossomos B na forma de pequenos bivalentes foram observados em paquíteno. A configuração bivalente dos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae*, sugere uma segregação normal meiótica (tipo Mendeliana), assegurando a transmissão de ao menos um cromossomo B para cada célula filha. A variação numérica (0-2B) nas células somáticas pode ser atribuída aos mecanismos de não segregação meiotica característicos dos cromossomos supranumerários.

A presença dos cromossomos supranumerários geralmente produz uma variação do coeficiente de DNA contido nas espécies. Em estudos recentes, com espécimes de *Rhamdia hilarii* coletadas em Jacutinga MG, observou-se número diplóide de $2n=58$ a $2n=61$ e DNA nuclear contendo valor de $2,25 \pm 0,18$ pg, enquanto duas espécies do rio Paranapanema e do córrego Edgardia apresentaram $2n=58$ cromossomos, $2,00 \pm 0,20$ pg e $1,97 \pm 0,10$ pg de DNA, respectivamente. As diferenças encontradas na quantidade de DNA nuclear avaliada no gênero *Rhamdia* talvez sejam explicadas pela presença dos cromossomos supranumerários na população de Jacutinga. Sendo assim, uma variação na quantidade de DNA nos diferentes animais deve-se a diferença no número e/ou tamanho dos supranumerários (FENERICH et al., 2004).

Segundo Artoni et al. (2000) entre os Characiformes, verificou-se a vasta ocorrência de cromossomos supranumerários, como *Apareidon piracicabae* e *Paraligosarcus pintoij*, *Prochilodus lineatus* e *P. cearensis*, *Leporinus friderici* e *Prochilodus nigricans*, *Curimata modesta* e *Steindachnerina insculpta* e *Schizodon*.

A origem dos cromossomos supranumerários é ainda indeterminada. Sem dúvidas eles vêm de diferentes eventos, mas a origem da maioria deve ser a mesma.

No grupo dos Characiformes há diferenças nas ocorrências de cromossomos B nas espécies, locais estudados e sexos estudados. De acordo com Stange e Almeida-Toledo (1993), *Astyanax scabripinnis* do rio Jucu do município de Vitor Hugo, os exemplares machos possuem de zero a quatro cromossomos Bs, enquanto as fêmeas não apresentam nenhum.

Em *Leporinus*, *Cyphocharax* e *Characidium*, por exemplo, a aparente ocorrência rara talvez indique que, os cromossomos extras, somente recentemente tenham se fixado nas populações. Por outro lado, a morfologia similar de pequenos heterocromossomos acrocêntricos detectados em três espécies do gênero *Leporinus* sugerem uma precoce e única origem destes cromossomos neste gênero (VENERE et al., 1999).

Na família Pimelodidae, o cromossomo B foi descrito em dois gêneros: *Bergiaria* (DIAS; FORESTI, 1993) e *Iheringichthys* (DIAS; FORESTI, 1993; VISSOTTO, 1995 *apud* SWARÇA, et al., 2000; SILVA et al., 1996). Na subfamília Rhamdiidae, o cromossomo B foi observado em espécies de *Pimelodella* (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1992 *apud* SWARÇA et al., 2000) e em quase todas as espécies do gênero *Rhamdia* (FENOCCHIO, 1993; VISSOTO, 1995 *apud* SWARÇA, et al., 2000; ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 1996; MAISTRO, 1996). Segundo Borin e Martins-Santos (2004) os cromossomos extras detectados variavam de zero até quatro no gênero *Pimelodus* sp. estavam presentes em 6 dos 41 indivíduos analisados (14,64%), mas somente uma célula possuía quatro cromossomos Bs. Em *P. ortmani* 100% dos indivíduos tinham cromossomos acessórios. Esse cromossomo extra é altamente conservado nos gêneros antigos e deve possuir uma importância na característica evolutiva cariotípica (SWARÇA et al., 2000).

Marcações e Bandeamento Cromossômico

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs)

Em eucariontes superiores, nas regiões organizadoras de Nucléolos (NORs) ocorrem cístrons repetidos em tandem. Os genes que formam os cístrons são responsáveis pelas transcrições de um RNA ribossômico precursor (pré-rRNA) e uma região conhecida como espaçador intergênico (IGS), que é transcrito em um RNA instável e abortado (MESTRINER, 1993).

Os segmentos dos RNAs ribossômicos 18S, 5,8S e 28s, intercalados por quatro regiões espaçadoras, são formados por moléculas de rRNA precursor, que possui um coeficiente de sedimentação de 45S. As moléculas produzidas permanecem vizinhas ao DNA ribossômico (rDNA) que combinam-se com várias proteínas para formar as subunidades ribossomais. Esse conjunto de moléculas ao redor do rDNA é o responsável pela produção de uma região com coloração mais intensa no núcleo, o nucléolo. Com a condensação dos cromossomos, durante a metáfase, os genes ribossômicos pararam suas atividades, o que provoca o desaparecimento dos nucléolos. A Prata combina-se com as proteínas presentes ao redor dos genes ribossômicos e não com o próprio DNA, sendo assim, a técnica de marcação com solução de nitrato de Prata permite visualizar as regiões organizadoras de Nucléolos, que estavam ativas na interfase anterior (HSU et al., 1975; MILLER et al., 1976 *apud* MESTRINER, 1993). As características dessas regiões podem auxiliar no maior entendimento dos sistemas evolutivos de diferentes espécies e as possíveis variações individuais.

Diferenças na atividade transcricional dos genes para rDNA é geralmente evocada para explicar o heteromorfismo de NORs. Contudo uma outra explicação é a ocorrência de crossing-overs desiguais entre cromossomos homólogos, possuidores de NOR, que fixam na população provocando o heteromorfismo. Em algumas espécies pertencentes à família Scianidae, a evolução deve ter ocorrido primeiramente na localização e tamanho da NOR. Isto significa que os genes ribossomais têm um importante papel na plasticidade cariotípica do grupo (FELDBERG et al., 1999).

A análise da variabilidade cariotípica pode ser completada com a localização cromossômica de genes específicos, como as Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs). Em peixes, a localização do 45s rDNA (18s + 5,8s + 28s) é um importante marcador citogenético. Alguns grupos de peixes apresentam a NOR em um único par cromossômico (Curimatidae, Anostomidae, Prochilodontidae, Cichlidae), outros possuem NORs múltiplas (Characidae, Lebiasinidae, Loricariidae, Erythrinidae e Callichthyidae), incluindo uma localizada no cromossomo sexual. A NOR pode ser detectada diretamente com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas específicas, ou indiretamente com o uso de nitrato de Prata (Ag-NOR) (KAVALCO et al., 2005).

Em *Rhamdia* sp. observou-se uma marcação de Ag-NORs no braço curto de um par subtelocêntrico correspondendo ao par 27, com associações freqüentes entre estas regiões. Em alguns casos constatou-se um heteromorfismo do tamanho das NORs entre os dois homólogos (CENTOFANTE, 2003). Já Andrade et al. (1998) constatou a presença de um par cromossômico submetacêntrico portador de cístrons ribossômicos, na extremidade do braço curto. Um terceiro cromossomo é ocasionalmente marcado na porção terminal do braço longo. Em *Rhamdia quelen*, Garcia (2005) verificou Ag-NORs simples localizadas no braço curto do par cromossômico submetacêntrico nº 22.

Heterocromatina

De acordo com Hsu (1975 *apud* MARGARIDO, 1995) a heterocromatina é constituída de DNA satélite, um DNA altamente repetitivo, de replicação tardia e geneticamente inativo. A heterocromatina pode ser dividida em facultativa e constitutiva. A heterocromatina facultativa é a cromatina que se condensa e obtém características de heterocromatina constitutiva, e pode apresentar-se descondensada como eucromatina. Já a constitutiva permanece condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células. Ela aparece em blocos e em ambos os homólogos (GUERRA, 1988). Esta permanente inatividade da heterocromatina é ainda bastante discutida.

A heterocromatina possui um papel importante na diversidade da análise cariotípica dos peixes. A macroestrutura cariotípica é relativamente constante,

mas existem variações ressaltadas nas diferentes espécies. A heterocromatina também serve como um importante detector de polimorfismos, caracterizando variações intra-populacionais em algumas espécies da ictiofauna (MANTOVANI, 2000).

Em espécies de Loricariidae dois padrões de heterocromatinas são observados. Um grupo apresenta menos heterocromatina localizada nas regiões do centrômero e/ou telômero, enquanto o outro grupo possui grande número de heterocromatina nessas regiões, assim como em segmentos intersticiais em vários cromossomos acrocêntricos (ARTONI; BERTOLLO, 1999 *apud* ARTONI; BERTOLLO (2001). O primeiro grupo está associado com as espécies que possuem um menor número diplóide, enquanto o segundo foi observado em espécies com maior número diplóide. Artoni e Bertollo (2001) sugerem haver uma relação entre o número diplóide e as heterocromatinas contidas nos centrômeros e telômeros. Isso pode demonstrar uma mudança interessante na heterocromatina paralela a fissão cêntrica, em sua maioria devido ao DNA repetitivo.

De acordo com Garcia (2005) as heterocromatinas localizam-se predominantemente nas regiões teloméricas e centroméricas, existindo também marcações intersticiais e polimorfismos. Os pequenos cromossomos apresentados pelo grupo dos Siluriformes, assim como, a pouca quantidade de heterocromatina, que tornam as bandas pálidas, dificultam a correta descrição de heterocromatina nesse grupo.

A ocorrência de regiões ricas em GC adjacentes ou espalhadas no meio das NORs é descrita em muitos organismos. Outras heterocromatinas ricas em GC não associadas com as NORs foram vistas em *N. microps* e *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2004) e em *Hoplias* cf. *lacerdae* (MORELLI, 1998), representando fatos raros em peixes. Regiões ricas em A-T, também representam um fato raro nos peixes, foram descritos casos em espécies de *Hypostominae* (KAVALCO et al., 2004).

A distribuição da heterocromatina constitutiva no gênero *Pimelodus* limita-se as regiões teloméricas e centroméricas, pode ou não conter uma pequena banda intersticial. A heterocromatina predomina em ambas as partes terminais dos cromossomos de *Pimelodus* sp., enquanto em *P. ortmani* as

áreas centroméricas são mais marcadas. Uma marca espécie específica, no braço curto do par 16, também foi observada nesta espécie (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004).

Fenocchio e Bertollo (1992) detectaram heterocromatina intersticial no primeiro par de acrocêntricos de *P. tigrinum*, contrariando a característica dos cariótipos dessas espécies de mostrarem quase total ausência de bandas de heterocromatina intersticiais.

Referências Bibliográficas

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I. C. Caracterização cromossômica de 3 duas espécies da família Pimelodidae (PISCES; SILURIFORMES). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos. *Anais VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos (SP), 1996, p.73.

ANDRADE, S. F.; MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Caracterização cariotípica da espécie *Rhamdia* sp. (PISCES, PIMELODIDAE) proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44º, 1996, Águas de Lindóia. *Anais 44º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia (SP), p.66.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLEO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: Métodos, Resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences*, v. 6, n. 1, p. 43-60, 2000.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. Trends in karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, v. 134, p. 201-210, 2001.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Evolution of B chromosomes in the Prochilodontidae fish, *Prochilodus lineatus*. *Genética*, v. 127, p. 277-284, 2006.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçu River basin in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 605-607, 2000.

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*, v. 140, p. 201-209, 2004.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: na impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, v. 73, p. 328-336, 1994.

CARVALHO, R. A.; DIAS, A. L. Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genet. Mol. Res.*, v. 4, p. 663-667, 2005.

CENTOFANTE, L. *Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da Mantiqueira*. São Carlos-SP, 2003, 151f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

DIAS, A. L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishies of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 16, n. 3, p. 585-600, 1993.

FELDBERG, E. *Estudos citogenéticos em 12 espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia Central*. Manaus- AM, 1990, 16f. Tese (Doutorado em Biologia de água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; SANTOS, E. B. P.; VALENTIM, F. C. S. Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the central Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n. 3, p. 351-356, 1999.

FENERICH, P. C.; FORESTE, F.; OLIVEIRA, C. Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 3, p. 350-354, 2004.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, v. 81, p. 193-198, 1990.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios*, v. 69, p. 41-46, 1992.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; CAMACHO, P. M. B Chromosomes in Two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica (Kraków)*, v. 48, p. 3-4, 2000.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, v. 68, n. 4, p. 363-368, 2003.

FUJIWARA, C.; NISHIDA-UMEHARA, T.; SAKAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; NAKAYAMA, I., ABE, S. Improved fish lymphocyte culture for chromosomo preparation. *Genetica*, v. 111, p. 77-89, 2001.

GARCIA, C. *Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco*. São Carlos, SP, 2005, 88f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

GUERRA, M. *Introdução à Citogenética Geral*, Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

GUILHERME, L. C. *Estudos reprodutivos e citogenéticos na população de Rhamdia quelen (PISCES, RHAMDIIDAE) do rio Uberabinha no município de Uberlândia-MG*. 2005, 81f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

HOCHBERG, V. B. M.; ERDTMANN, B. Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae)-the occurrence of b chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11, n. 3, p. 563- 576, 1988.

JORGE, L. C.; SÁNCHEZ, S. Estudio citogenético preliminar en *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) del río Paraná, provincia de Corrientes - Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, 2005.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O. Heterchromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, v. 141, p. 237-242, 2004.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHJO, Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, v. 94, p. 180-186, 2005.

MAISTRO, E. L. *Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes*. Botucatu, SP, 1996. 152f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista.

MANTOVANI, M. *Citogenética comparativa entre populações de Astyanax scabripinnis (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Paranapanema*. São Carlos, SP, 2000, 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MARGARIDO, V. P. *Uma contribuição à citogenética dos Bryconinae (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)*. São Carlos, SP, 1995, 107f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MESTRINER, C. A. *Análise de regiões organizadoras de Nucléolos e investigação do sistema XX/XY decrito para Leporinus lacustris (Pisces, Anostomidae)*. São Carlos, SP, 1993, 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MESTRINER, C. A.; GALETTI Jr, P. M.; VALENTINS, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, vol. 85, p. 1-9, 2000.

MONDIN, L. A. C.; TROY, W. P.; MIYAZAWA, C. S. Descrição cariótica de *Salminus maxillosus* (Characidae, Salminae) e *Acestrorhynchus pantaneiro* (Acestrorhynchinae), da bacia do Pantanal, MT. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45°, 1999, Gramado. *Anais 45° Congresso Nacional de Genética*, Gramado (RS), 1999, p.59.

MORELLI, S. *Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero Hoplias, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo*. São Carlos, SP, 1998, 76f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v. 108, p. 211-215, 2000.

NIRCHIO, M; OLIVEIRA, C. Cromosomas supernumerarios. In: NIRCHIO, M; OLIVEIRA, C. *Citogenética de peces*. Porlamar: Coordinaciòn de Publadores Del Rectorado de La Universidad de Oriente, 2006. p. 3-212.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F., BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.

PAIVA, S.; RENESTO, E.; ZAWADZKI C. H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetic and Molecular Biology*, v. 28, n. 3, p. 370-375, 2005.

PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO-JUNIOR, H. F.; NISHIYAMA, P. B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*, v. 110, p. 277-283, 2001.

SILVA, C. T.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Análise citogenética em *Iheringichthys labrosus* e *Pimelodella* sp. (Pisces, Pimelodidae) da bacia do rio Tibagi/PR. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos. *Anais VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos (SP), 1996, p.76.

STANGE, E. A. R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 16, n. 3, p. 601-315, 1993.

SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiaidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 589-593, 2000.

TOLEDO FILHO, S. A.; FORESTI, F.; RIBEIRO, A. F. ICTIOGENÉTICA: ASPECTOS BÁSICOS E APLICADOS. *Ciência e Cultura*, v. 3, n. 30, p.320-327, 1978.

TORRES-MARIANO, A. R. *Descrição citogenética de espécies do gênero Astyanax (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Araguari-Uberlândia (MG)*. Uberlândia, MG, 2001, 51f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

VASCONCELOS, C.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in species of Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, v. 132, p. 103-109, 2000.

VENERE, P. C.; MARGARIDO, V. P.; GALETTI Jr., P. M. Análises comparativas entre *Salminus hilarii* (Characidae, Salminae) de duas bacias hidrográficas distintas: Alto Paraná e Araguaia. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos. *Anais VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São carlos (SP), 1996, p.23.

VENERE, P. C.; MIYAZAWA, C. S.; GALETTI Jr, P. M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n. 3, p. 345-349, 1999.

VIDOTTO., A .P.; SWARÇA, A .C.;FENOCCHIO, A .S.; DIAS, A. L. Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodiade) from Tibagi river basin (Brazil). *Journal of Heredity*, v. 95, n. 6, p. 517-520, 2004.

ZHANG, Q.; ARAI, K. Extensive karyotype variation in somatic and meiotic cells of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces:Cobitidae). *Folia Zool.*, v. 52, n. 4, p. 423-429, 2003.

Capítulo 2 Estudos cromossômicos em *Rhamdia quelen*

Resumo

Foram realizados estudos citogenéticos em quatro populações de *Rhamdia quelen* da região de Uberlândia-MG. Todas as populações apresentaram $2n=58$ cromossomos, com a ocorrência de 0-2 cromossomos supranumerários. Nos animais analisados, observou-se NOR simples e heteromórfica. As Ag-NORs de três populações marcaram a região do braço curto de um par de cromossomos subtelocêntrico/acrocêntrico, enquanto que a população do rio Tijuco apresentou NOR intersticial em um par submetacêntrico. O tratamento com cromomicina A_3 evidenciou a presença de algumas regiões com afinidade ao fluorocromo CG específico, indicando a presença de outras regiões de blocos heterocromáticos "ricos" em GC além dos associados às NOR. Pequenos blocos heterocromáticos nos centrômeros e telômeros foram visualizados através da técnica de banda C. Na tentativa de uma caracterização mais completa das populações foram utilizadas as técnicas de Enzima de Restrição, Hoechst 33258 e bandeamento Cd. Este trabalho confirma alguns dados da literatura e trás novas informações enriquecedoras para o conhecimento de diferentes populações desta espécie.

Palavras-chaves: *Rhamdia*, citogenética, peixes, cromossomos.

Abstract

Cytogenetic studies were performed in three populations of *Rhamdia quelen* in Uberlândia-MG and one in Prata-MG. The results obtained evidenced a diploid number $2n=58$ with 0-2 supranumerary chromosomes. The Nucleolus Organizer Regions were identified by silver nitrate and the NOR evidenced a simple heteromorphic NOR system. The three populations showed Ag-NOR in the short arm of the subtelocentric chromosome pair, in the Tijuco's population the NOR is located on the interstitial region of the submetacentric pair. The preparations were stained with the specific G-C fluorochrome CMA_3 , some of the chromosomes exhibited a pale fluorescence, indicating other regions richness in G-C base pairs beyond the NORs. The C band pattern

showed small heterochromatic blocks in the centromeric and telomeric regions. In the attempt of a complete characterization, Restriction Endonuclease Banding, Hoechst 33258 and Cd-banding were applied. This study confirms some results of literature and show new important results for the better understanding this specie.

Keywords: *Rhamdia*, cytogenetic, fish, chromosome.

Introdução

A ordem dos Siluriformes é a mais diversa e amplamente distribuída do grupo dos Ostariophysi e compreende mais de 30 famílias, 412 gêneros e aproximadamente 2400 espécies (ROMAN et al., 2002). As espécies da família Pimelodidae representam um amplo grupo de Siluriformes, exclusivos de água doce. Os Pimelodidae são endêmicos da região neotropical, com distribuição geográfica desde o México até a Argentina, e são conhecidos vulgarmente como bagres ou jundiás. A posição taxonômica da subfamília Pimelodidae é muito confusa e cheia de controvérsias. Estudos recentes de sistemática filogenética modificaram a classificação dividindo a família Pimelodidae em três famílias: Pimelodinae, Heptapteridae e Pseudopimelodinae (SWARÇA et al., 2001). A nova subfamília Heptapteridae possui aproximadamente 24 gêneros, 190 espécies e 52 prováveis novas espécies (<http://silurus.acnatsci.org/ACSI/taxa/Families.html>), sendo a terceira maior família em número de espécies da ordem dos Siluriformes. Os animais desta família possuem o corpo nu, aberturas brânquiais amplas e sabor característico, o que lhes confere um grande potencial na piscicultura brasileira.

O gênero *Rhamdia* é formado por 11 espécies, dentre as quais *Rhamdia quelen* que possui sinônimas (SILFVERGRIP, 1996 *apud* TAVARES-DIAS et al., 2002). Estudos citogenéticos mostraram uma variação cariotípica de $2n= 56$ a 62 cromossomos (CENTOFANTE, 2003; FENERICH et al., 2004; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990; GARCIA, 2005; JORGE; SÁNCHEZ, 2005; VALCARCEL et al., 1993). Contudo Guilherme (2005) observou uma variação de $2n= 58$ a $2n= 65$ em espécimes coletados no rio Uberabinha no município de Uberlândia. Confirmando a afirmação de Swarça et al. (2000) que os cariótipos de espécies do gênero *Rhamdia* apresentam uma grande

variabilidade quanto ao número cromossômico. Essa variação cromossômica ocorre devido a presença dos cromossomos Bs.

Os cromossomos B foram detectados por A. E. Longley em 1927 em milho. Desde então eles foram observados em vegetais e em animais incluindo homens. O número máximo suportado pelo organismo é variável, podendo chegar a cinquenta, superando muitas vezes o número de cromossomos As. Há variações em relação ao tamanho dos cromossomos B (REJÓN et al., 1987).

Em *Rhamdia quelen* a ocorrência de cromossomos supranumerários é comum. Abucarma e Martins-Santos (2001) observaram cromossomos metacêntricos de tamanho médio variando de 0 a 2 cromossomos em *R. voulezi* e 0 a 4 em exemplares de *R. branneri*, sinônimas de *R. quelen*, coletados no rio Iguaçu. Os cromossomos B apresentaram uma variação intra e interespecífica de 91,7%, em *R. branneri* a frequência foi de 75% e em *R. voulezi* de 50%. Hoechberg e Erdtmann (1988) descrevem em *R. quelen*, nas populações da estação de piscicultura perto da Lagoa dos Quadros e de espécimes do Rio Guaíba, $2n = 58$ a 59 , com raras ocorrências de 60 cromossomos. Esses dados são parecidos com os obtidos por Stivari e Martins-Santos (2004) na população de Maringá-PR, contudo, estudos realizados em *R. quelen* do rio Taquarussu de Junqueirópolis-SP, apresentaram uma variação de 1 a 4 cromossomos supranumerários de tamanho médio como o descrito em *R. branneri* por Abucarma e Martins-Santos op. cit. apesar de grande parte dos trabalhos descreverem a ocorrência de 0-4 cromossomos. Guilherme (2005) observou em *R. quelen* do rio Uberabinha, do município de Uberlândia, a ocorrência de 0-7 cromossomos Bs, sendo a presença de 7 cromossomos supranumerários muito rara.

Comparando os espécimes de *R. quelen* coletados no Brasil e na Argentina, as brasileiras apresentaram cromossomos supranumerários metacêntricos de tamanho médio, enquanto nas da Argentina não foram observados tais cromossomos (FENOCCHIO et al., 2000), assim como na população do rio Tibagi-PR estudada por Carneiro e Dias (2002).

O *Rhamdia quelen* é uma das espécies mais controvertidas, os estudos citogenéticos são uma importante ferramenta para melhor compreensão

evolutiva e taxonômica desta espécie. Os dados citogenéticos das quatro populações de *Rhamdia quelen* tiveram como objetivo a obtenção de novos dados que possam auxiliar em uma melhor compreensão da evolução cromossômica deste grupo.

Materiais e Métodos

Os animais foram coletados em 4 diferentes locais (Figura 1), 4 fêmeas e 4 machos de *Rhamdia quelen* provenientes do Córrego Bebedouro (18°45'44"S, 048°17'24"W), 1 exemplar do sexo feminino do rio Araguari (18°46'17"S, 048°14'40"W), 5 fêmeas e 8 machos do rio das Pedras (18°53'31"S, 048°26'09"), da região do município de Uberlândia-MG e 2 exemplares machos do rio Tijuco (19°03'26"S, 048°35'37"W) município de Prata-MG.

As metáfases foram estimuladas com cloreto de cobalto segundo técnica descrita por Cucchi e Baruffaldi (1990), 18 horas antes da preparação do animal. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior e posterior, por preparação direta (BERTOLLO et al., 1978). As Regiões Organizadoras de Nucléolos foram marcadas através da técnica de impregnação com nitrato de Prata descrita por Howell e Black (1980) com modificações. Também foi utilizada a coloração com flourocromo CMA₃ que reconhece regiões ricas em GC, de acordo com a técnica modificada descrita por Schind (1980). As regiões de heterocromatinas foram detectadas conforme Summer (1972). Hoechst 3358 foi utilizado para o reconhecimento de regiões "ricas" em bases AT, como descrito na técnica de Latt *et al.* (1974). As metáfases foram submetidas à técnica de enzima de Restrição e banda Cd de acordo com Mezzanotte (1983) e Eiberg (1974) respectivamente, com algumas modificações.

O cariótipo foi montado com auxílio do software Micro Measure versão 3.01 (REEVES; TEAR, 1999), sendo a morfologia cromossômica determinada segundo os critérios propostos por Levan *et al.* (1964).

Resultados

Os estudos citogenéticos de *Rhamdia quelen* nos locais pesquisados demonstraram um número diplóide de 58 cromossomos com a presença de 0-2

cromossomos supranumerários. Os animais coletados no Córrego do Bebedouro, a fórmula cariotípica foi de $30m + 16sm + 8st + 4a$, com o número fundamental de 112 (Figura 2A). Os espécimes do rio Araguari apresentaram $NF = 114$ e fórmula cariotípica de $18m + 34sm + 4st + 2a$ (Figura 3A). No rio das Pedras o cariótipo apresentou $22m + 16sm + 10st + 10a$, com NF de 106 (Figura 4A). No rio Tijuco observou-se uma fórmula cariotípica de $18m + 28sm + 6st + 6a$ e $NF = 110$ (Figura 5A). Não foram observados cromossomos sexuais em nenhuma das populações pesquisadas.

Os exemplares de todos os locais coletados apresentaram Ag-NOR simples com heteromorfismo de tamanho. Os espécimes coletados do córrego do Bebedouro (Figura 2a), Rio Araguari (Figura 3a) e das Pedras (Figura 4a) tiveram marcação em um par de cromossômicos subtelocêntrico/acrocêntrico, na região terminal do braço curto. No rio Tijuco houve a marcação na região intersticial do braço longo de um par submetacêntrico.

Nas quatro localidades, a coloração por cromomicina A_3 evidenciou um par cromossômico fluorescente compatível com o par portador de Ag-NOR (Figuras 2b, 3b, 4b e 5b). Nas metáfases analisadas dos exemplares provenientes do rio Tijuco revelou-se um bloco heterocromático com afinidade ao fluorocromo GC específico além do par da NOR (Figura 5b).

As metáfases submetidas ao tratamento de banda C mostraram pequenos blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas e teloméricas de alguns cromossomos (Figuras 2c, 3c, 4c e 5c).

Nas metáfases submetidas à técnica de Hoechst 33258, os cromossomos apresentaram uma coloração fluorescente levemente mais brilhante nas regiões teloméricas dos braços longos dos cromossomos (Figura 6a). O bandeamento Cd apresentou marcação de grandes regiões no braço longo de três cromossomos submetacêntricos (Figura 6b).

A marcação com as enzimas de restrição *Alu* I e *Eco* I, realizadas nas populações do córrego do Bebedouro e rio Araguari, respectivamente digeriram a região intersticial, evidenciando as regiões teloméricas e em alguns cromossomos na região pericentromérica (Figura 6c-d).

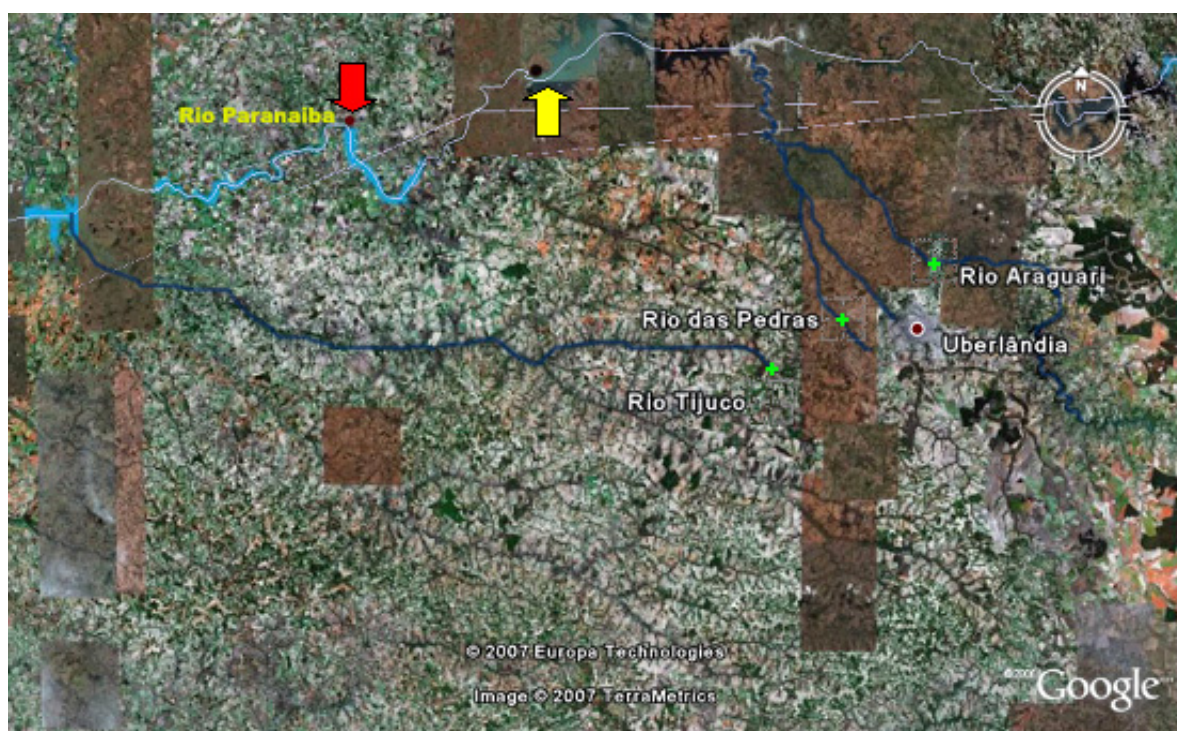


Figura 1: Locais de coleta de *Rhamdia quelen*. Setas indicam os locais de represa. Seta vermelha indica a represa de Cachoeira Dourada e seta amarela de Itumbiara.

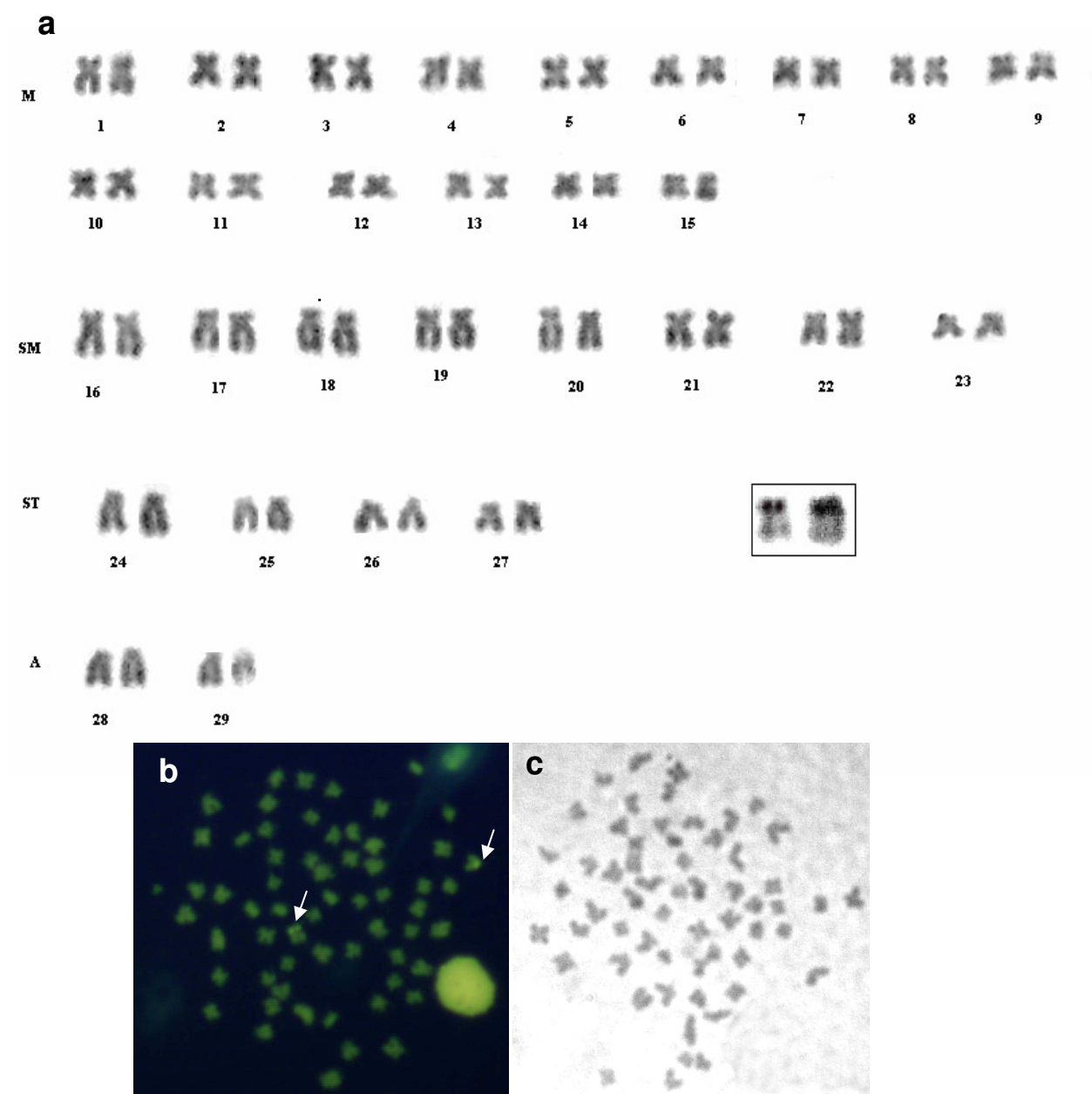


Figura 2: População do córrego do Bebedouro a) Cariótipo de *Rhamdia quelen* do córrego do Bebedouro, em destaque o par das AgNORs, b) Metáfase submetida a coloração de Cromomicina A₃, com setas evidenciando as regiões “ricas” em GC, c) Metáfase submetida ao tratamento de Banda C.

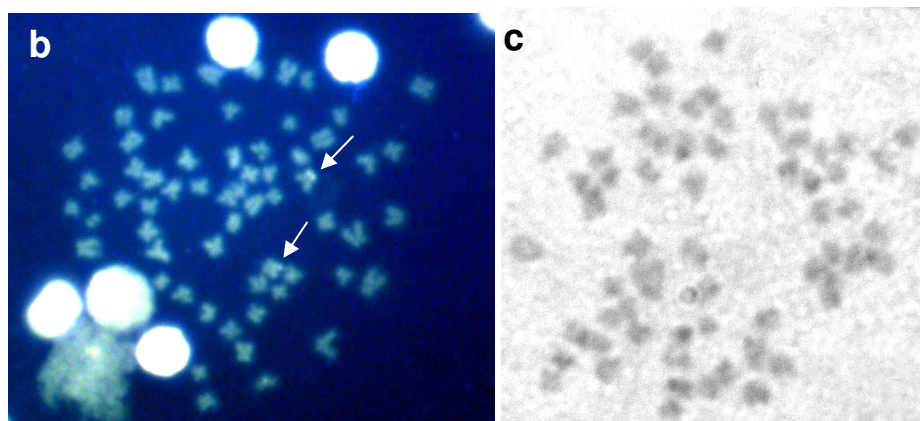
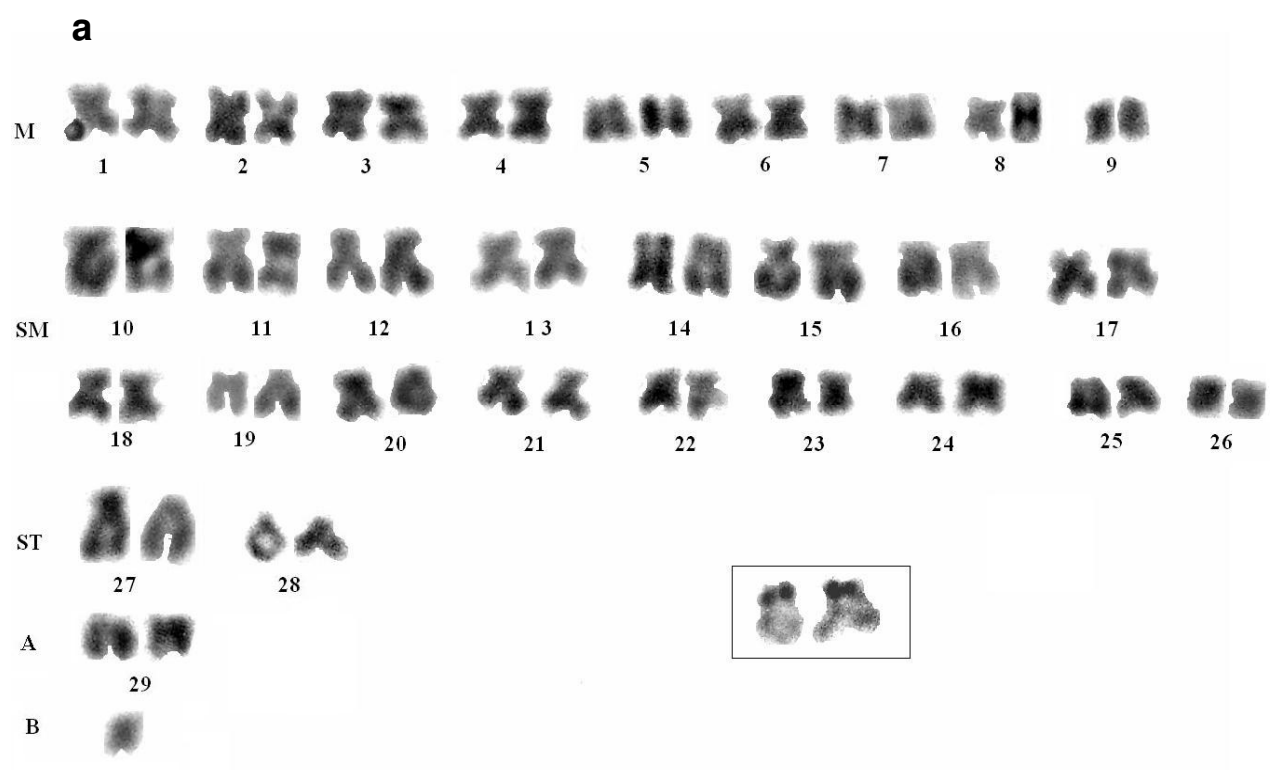


Figura 3: População do rio Araguari a) Cariótipo de *Rhamdia quelen* do rio Araguari, em destaque o par das AgNORs, b) Metáfase submetida a coloração de Cromomicina A₃, com setas evidenciando as regiões ricas em GC, c) Metáfase submetida ao tratamento de Banda C.

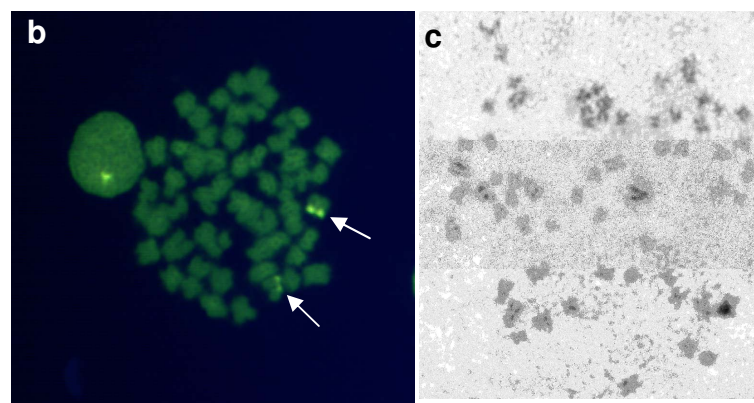
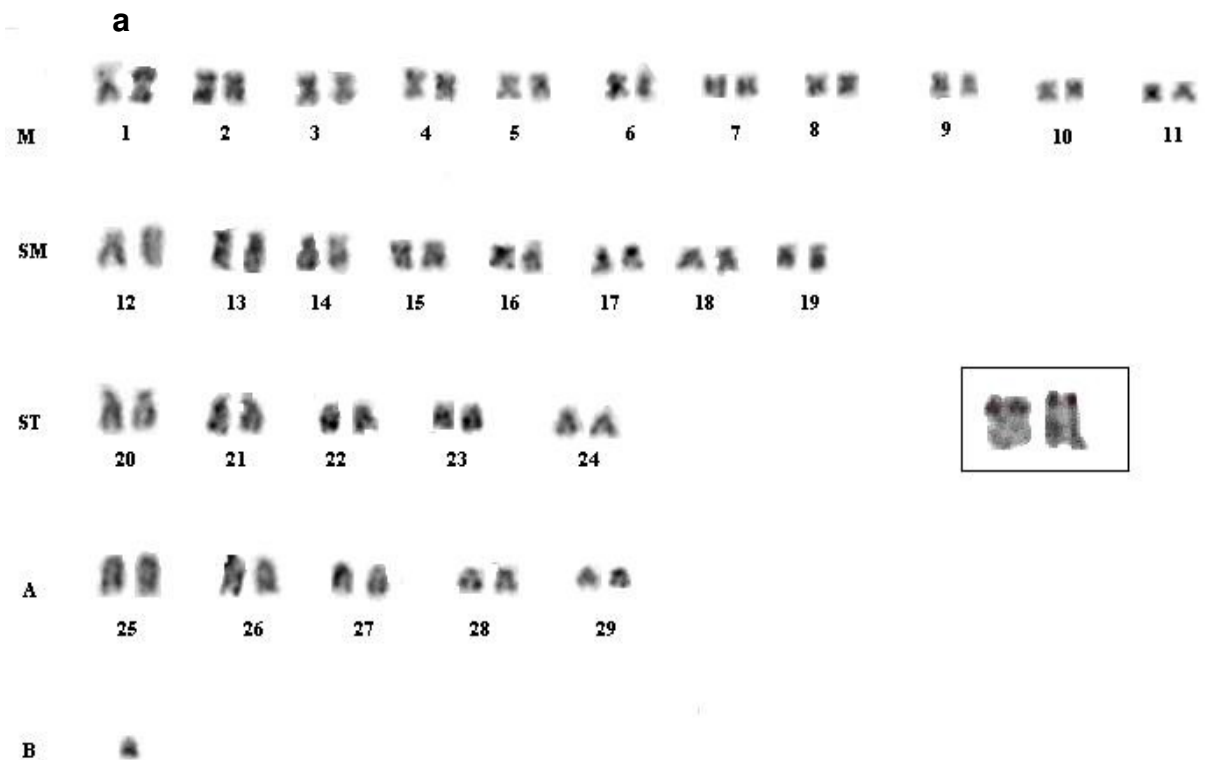


Figura 4: População do rio das Pedras a) Cariótipo de *Rhamdia quelen* do rio das Pedras em destaque, o par das AgNORs, b) Metáfase submetida a coloração de Cromomicina A₃, com setas evidenciando as regiões ricas em GC, c) Metáfase submetida ao tratamento de Banda C.

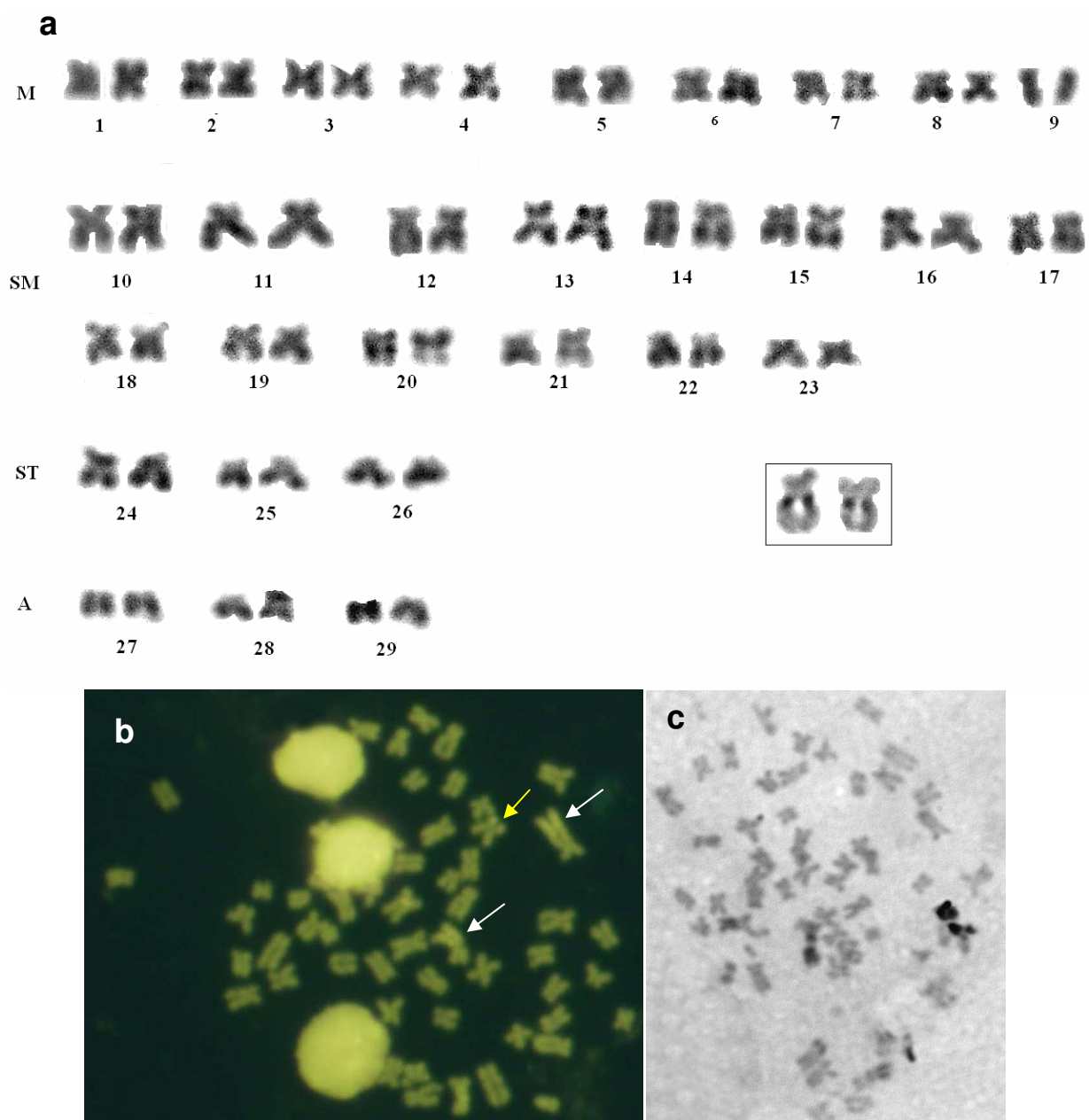


Figura 5: População do rio Tijuco a) Cariótipo de *Rhamdia quelen* do rio Tijuco em destaque, o par das AgNORs, b) Metáfase submetida a coloração de Cromomicina A₃, com setas brancas evidenciando as regiões ricas em GC do par da NOR e seta amarela mostrando o cromossomo além do par da NOR com região rica em GC, c) Metáfase submetida ao tratamento de Banda C.

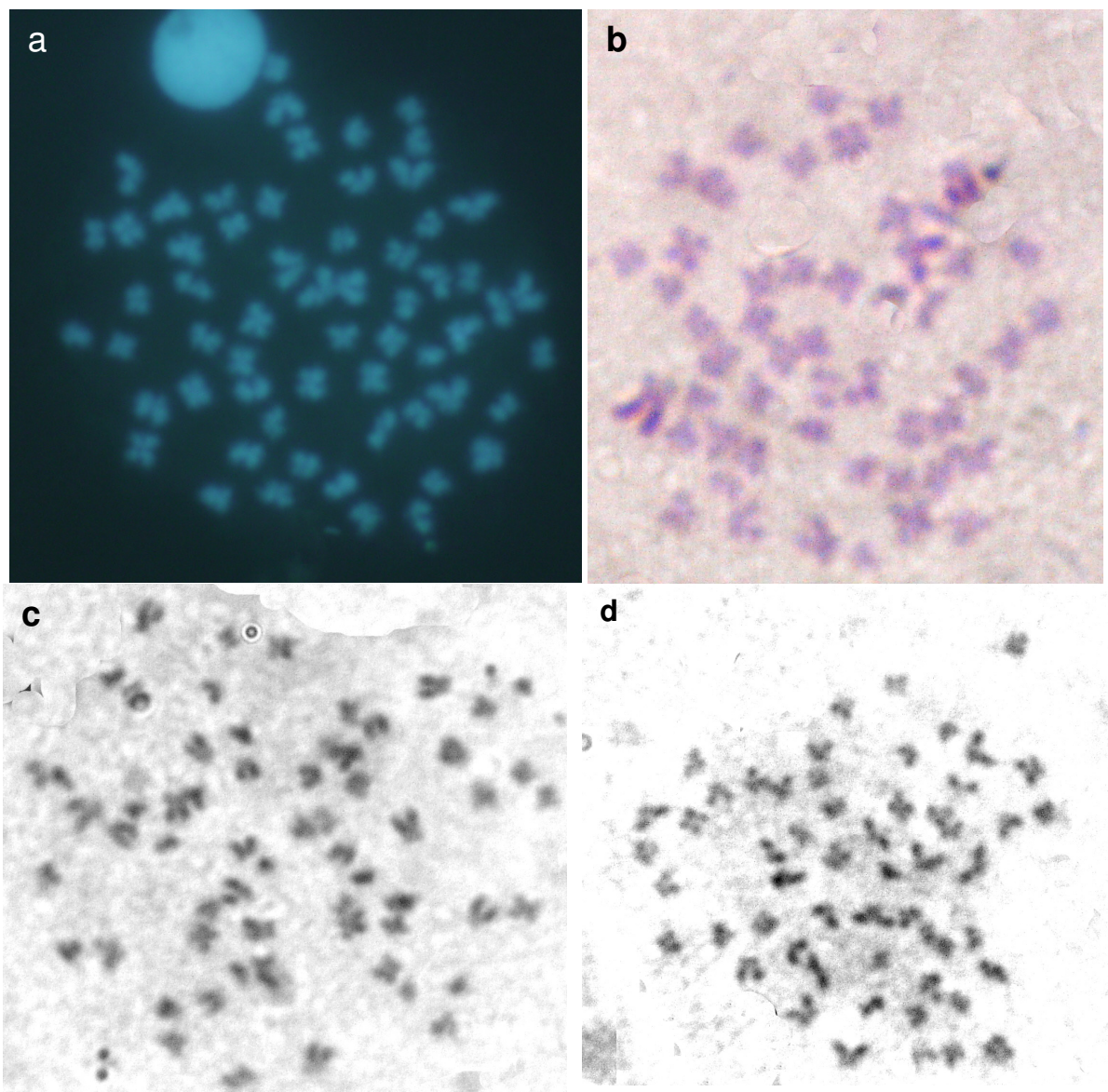


Figura 6: Metáfases de *Rhamdia quelen* com diferentes tratamentos: a) Metáfase com coloração de Hoechst 33258; b) Metáfase submetida a técnica de banda Cd; c) Enzima de Restrição *Alu* I; d) Enzima de Restrição *Eco* I.

Discussão

Os resultados deste trabalho confirmam os dados citogenéticos de *Rhamdia quelen* conhecidos. Há uma grande variação quanto ao seu número cromossômico, devido à presença de 0-2 cromossomos supranumerários como

o descrito por Hochberg e Erdtmann (1998). Também foi observada predominância de cromossomos de dois braços, o que confere para este grupo um número fundamental alto (CENTOFANTE, 2003), acima de 100 (ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 2001; FENOCCHIO et al., 2003b; FENOCCHIO et al., 2000; MAISTRO et al., 2002; GARCIA, 2005). A característica de possuir cromossomos pequenos, com o tamanho de 1,6 μ m para 3,2 μ m (MAISTRO et al., 2002) e muito condensados, que pode alterar as suas fórmulas cariotípicas (FENOCCHIO et al., 2003a), também foi confirmada. A ocorrência de cromossomos supranumerários é comum nas diferentes populações da espécie descrita (BORN, 2002; HOCHBERG; ERDTMANN, 1988; GUILHERME, 2005). As populações estudadas não mostraram heteromorfismo cromossômico sexual, coincidindo com a descrição de vários autores (ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 2001; FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990; GUILHERME, 2005; JORGE; SÁNCHEZ, 2005; STIVARI; MARTINS-SANTOS, 2004; VALCAREL et al., 1993).

As Regiões Organizadoras de Nucléolo foram observadas em diferentes tipos cromossômicos. Os animais coletados no rio Araguari, Bebedouro e Pedras apresentaram a NOR no braço curto de um par de cromossomos subtelo/acrocêntricos, assim como, Margarido e Roman (2000) observaram em *Rhamdia voulezi* e Roman et al. (2002) em *Rhamdia branneri*, espécies estas sinônimas de *Rhamdia quelen* (FENOCCHIO et al., 2002). Essa localização pode ser coincidente com diversos outros trabalhos (CENTOFANTE; 2003; FENOCCHIO et al., 2000, 2003b; GARCIA, 2005) também observaram em *R. quelen* a NOR localizada no par cromossômico ST, no braço curto. Estas diferenças nos tipos dos cromossômicos portadores de NOR podem ser decorrentes de variações na condensação dos cromossomos. Estes dados diferem apenas dos padrões observados por Moraes et al. (2006), Mattanó (2004) e Carvalho et al. (1999) que descrevem a marcação no braço curto de um par cromossômico provavelmente submetacêntrico. As Regiões Organizadoras de Nucléolo nestas espécies mostraram heteromorfismo e freqüentes associações cromossomais (FENOCCHIO et al., 2000; FENOCCHIO et al., 2003a; FENOCCHIO et al., 2003b; MAISTRO et al., 2002; e o presente trabalho).

A descrição de NOR intersticial no par cromossômico submetacêntrico, observada nos dois exemplares do rio Tijuco, é rara no gênero *Rhamdia*. Sua ocorrência, contudo é bem descrita nos outros gêneros do grupo Siluriformes, tais como Loricariidae em *Neoplecostomus microps*, *N. paranensis* que apresentam NOR intersticial no braço longo do par cromossômico 11, as espécies da família Hypostominae que possuem somente um par cromossomo com NOR intersticial (ALVES et al., 2005). Borin; Martins-Santos (1999) mostraram que em *Trichomycterus* sp., *T. davisi* e *T. stawiarski* que a Região Organizadora de Nucléolo por nitrato de Prata possui uma localização intersticial no segundo par metacêntrico, coincidindo com a constrição secundária observada na coloração com giemsa.

Uma possível origem da NOR intersticial no par cromossômico submetacêntrico, nos exemplares proveniente do rio Tijuco, é a ocorrência de inversão pericêntrica, transformando o par subtelocêntrico, regulamente portador de NOR, em um par submetacêntrico, com NOR na região intersticial do braço longo (Figura 7).

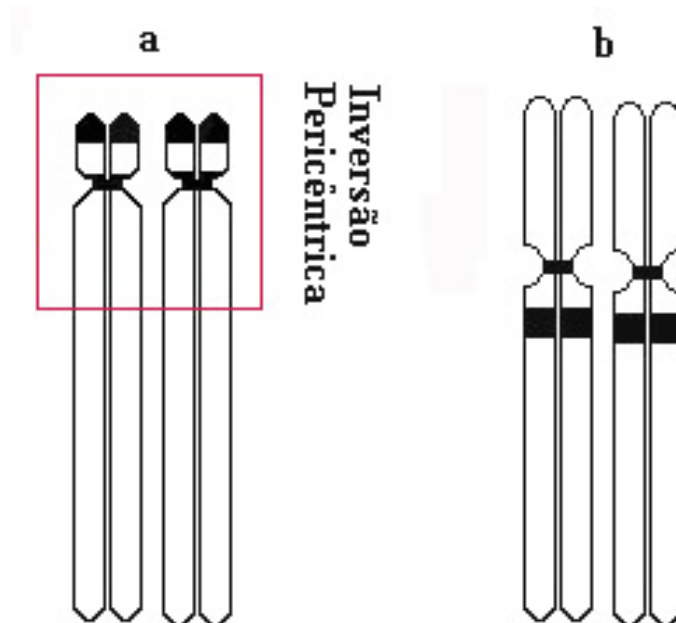


Figura 7: Esquema da possível origem da NOR intersticial do rio Tijuco. a) Par st/a portador de NORr nas populações do Córrego do Bebedouro, rio Araguari e das Pedras; b) Par cromossômico sm portador de NOR intersticial de *Rhamdia quelen* do rio Tijuco.

A ocorrência de NOR intersticial também é descrita em Pimelodidae, como nas espécies *Cetopsorhamdia iheringhi*, que possui a NOR localizada na posição intersticial do braço longo de um par subtelocêntrico, *Cetopsorhamdia* sp. e *Imparfins* aff. *schubari* com NOR no braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntrico e *Imparfins* aff. *Piperatus*, com NOR intersticial localizada no braço longo do cromossomo ST (FENOCCHIO et al., 2003a).

A ocorrência de NOR simples, assim como a ausência de NOR nos cromossomos supranumerários, como verificado no presente trabalho, também são resultados coincidentes com outras populações descritas para a espécie MAISTRO et al., 2002.

A utilização de cromomicina A₃ auxilia um maior entendimento da composição cromossômica, possibilitando detecção de regiões “ricas” em GC. Nos peixes é freqüente as Regiões Organizadoras de Nucléolos serem limitadas por blocos “ricos” em bases GC. Os animais estudados apresentaram marcações CMA₃ nas regiões teloméricas do braço curto dos cromossomos subtelocêntrico/acrocêntrico, coincidentes com as NORs, assim como Garcia (2005) e Margarido; Roman (2000) observaram, com a coloração de mitramicina. Entretanto, os cromossomos supranumerários não apresentaram marcações CMA₃ positivas, como também descrito por Andrade et al. (1998), Maistro et al. (2002) e Stivari e Martins-Santos (2004), que observaram a ausência de blocos ricos em G-C em cromossomos supranumerários de *Rhamdia* sp., *R. hilarii* e *R. quelen*, respectivamente.

A ocorrência de um grande bloco heterocromático com afinidade ao fluorocromo CG específico, indicando a presença de outras regiões de blocos heterocromáticos “ricos” em GC, além dos associados às NOR, foi encontrada na população do rio Tijuco, a exemplo do que foi observado em *Pseudopimelodus zungaro* (Garcia, 2005). Tais dados confirmam que as heterocromatinas “ricas” em bases GC não estão restritas ao par cromossômico portador da NOR. As regiões de heterocromatina em Heptapteridae são escassas. Os blocos observados são pequenos (BORIN; MARTINS-SANTOS, 1999) e, como descrito no presente trabalho, localizados em sua maioria nas regiões centroméricas e teloméricas. Esses resultados correspondem com os dados obtidos em outras populações (ABUCARMA;

MARTINS-SANTOS, 2001; CARVALHO et al., 1999; CETONFANTE, 2003; MATTANÓ et al., 2004) e parece ser o padrão de heterocromatina do *Rhamdia quelen*.

Segundo MAISTRO et al. (2002), a NOR de *Rhamdia hilarii*, localizada na constricção secundária do braço curto de um par submetacêntrico, foi banda C positiva e também apresentou um heteromorfismo de tamanho. Resultado idêntico ao observado para outra população de *R. hilarii*. por Fenocchio e Betollo (1990).

Os cromossomos supranumerários de *Rhamdia quelen* do rio Uberabinha se mostraram não só totalmente, mas também parcialmente heterocromáticos (Guilherme, 2005), como também se observou em *R. hilarii* (MAISTRO et al., 2002)

Em citogenética de peixes não é muito utilizada a técnica Hoechst 33258, pois este grupo não possui um padrão de bandas transversais ricas em AT, que são evidenciadas por esse bandejamento. Contudo, em análises das lâminas de *Rhamdia quelen* submetidas a essa coloração, foi possível visualizar um leve brilho nas regiões teloméricas. Estas mesmas regiões não foram digeridas pelas Enzimas de Restrição *Alu I* e *Eco I* e coincidem com as regiões marcadas com banda C, resultados descritos anteriormente por Maistro et al. (2002).

O bandejamento Cd é utilizado para corar os cinetócoros presentes na constricção primária, desta forma pode-se estudar a natureza e função dos mesmos mostrando quais centrômeros estão ativos e quais estão inativos (DANIEL, 1979; MARASCHIO et al., 1980; NAKAGOME et al., 1976; ROMAIN et al., 1982 *apud* VERMA; BABU, 1995). As metáfases das populações do rio Araguari e Bebedouro, submetidas a essa técnica, apresentaram até três cromossomos submetacêntricos marcados no braço longo. Essas marcações não representam as regiões cromossômicas que possuem associações com as fibras do fuso.

Os resultados obtidos nesse trabalho diferem do objetivo da técnica, mostrando que são necessárias algumas adaptações para o funcionamento do bandejamento Cd neste grupo. Em aplicações das Cd banda em *L. elongatus* realizados por Artoni et al. (1999) os segmentos visualizados também diferiram

do objetivo da técnica, contudo o padrão concebido foi similar às colorações cromossômicas de mitramicia e alguns segmentos heterocromáticos positivos ao bandeamento C, sugerindo a resistência da heterocromatina constitutiva rica em bases GC ao tratamento com calor. Entretanto no presente trabalho e em *L. anisitsi* (op. cit.) as colorações positivas para bases ricas em GC divergiram do padrão encontrado na Cd-banda. Como o tratamento mostrou um padrão diferencial de coloração cromossômica é interessante que novas pesquisas sejam realizadas, para aquisição de mais uma ferramenta para estudos em cromossomos de peixes.

As diferenças dos citótipos das populações estudadas, não são muito representativas, se for considerado que ocorrem variações nos padrões de condensação cromossômica. A única variação que é bastante resolutive é a presença da NOR intersticial em um par submetacêntrico dos espécimens do rio Tijuco. As populações dos rios Araguari, das Pedras e córrego do Bebedouro estão isoladas do rio Tijuco devido as Represas de Cachoeira Dourada e de Itumbiara (Figura 1), esse isolamento pode ter permitido a fixação da variação no padrão de NOR encontrado.

O rio das Pedras deságua no rio Uberabinha que, juntamente com o córrego do Bebedouro, segue ao encontro do Araguari. Contudo, com a construção do Complexo Capim Branco, composto pelas Usinas Hidroelétricas Capim Branco I e II, inauguradas em 2006, foram formadas três populações: Araguari - Bebedouro, separada pela Capim Branco II da segunda população Pedras - Uberabinha e a terceira do rio Tijuco. O isolamento dessas populações poderá permitir a fixação independente de interessantes diferenças cromossômicas, a serem detectadas em estudos futuros.

Referências Bibliográficas

ABUCARMA; M.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçu Basin. *Cytologia*, v. 66, p. 299-306, 2001.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of sub families Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, v. 124, p. 127-136, 2005.

ANDRADE, S. F.; MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Caracterização cariotípica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces, Pimelodidae) proveniente do rio Sapucaí, represa de Furna, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44°, 1998, Gramado. *Anais 44° Congresso Nacional de Genética*. Águas de Lindóia (SP), 1998, p. 66.

ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A.; GALETTI Jr, P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (siluriformes) and *Leporinus elongatus* (characiformes). *Gent. Mol. Biol.*, vol. 22, n. 1, 1999.

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

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçu river Basin. *Genetica*, v. 106, p. 215-221, 1999.

BORN, G. G. Análise citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) da região sul do Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Anais IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá (PR), 2002, p.79.

CARNEIRO, J. S.; DIAS, A. L. Análise cromossômica em diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do rio Tibagi-PR. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Anais IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá (PR), 2002, p. 77.

CARVALHO, R. A.; DIAS, A. L. Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) proveniente da bacia do rio Tibagi-PR. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45°, 1999, Gramado. *Anais 45° Congresso Nacional de Genética*, Gramado (RS), 1999, p.73.

CENTOFANTE, L. *Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da Mantiqueira*. São Carlos-SP, 2003, 151f, Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

CUCCHI, C.; BARUFFALDI, A. A new method for karyological studies in teleost fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 37, p. 71-75, 1990.

Disponível em< <http://silurus.acnatsci.org/ACSI/taxa/Families.html>>. Acesso em 30/10/2007.

EIBERG, H. New selective Giemsa technique for human chromosomes, Cd staining. *Nature*, v. 248, p. 55, 1974.

FENERICH, P. C.; FORESTE, F.; OLIVEIRA, C. Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 3, p. 350-354, 2004.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, v. 81, p.193-198, 1990.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; CAMACHO, P. M. B Chromosomes in Two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica (Kraków)*, v. 48, p. 3-4, 2000.

FENOCCHIO, A. S.; SWARÇA, A. C.; DIAS, A. L.; CESTARI, M. M. Caracterização cromossômica (GIEMSA, BANDA C, NORs, CMA3 e FISH) de *Rhamdia quelen* do Alto rio Iguaçu (Estado do Paraná). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Anais IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá (PR), 2002, p.78.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, v. 68, n. 4, p. 363-368, 2003a.

FENOCCHIO, A. S.; SWARÇA, A. C.; CESTARI, M. M.; DIAS, A. L. Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguaçu River (Brazil). *Folia biologica (Kraków)*, v. 51, p. 3-4, 2003b.

GARCIA, C. *Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do Rio São Francisco*. São Carlos, 2005, 88f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

GUILHERME, L. C. *Estudos reprodutivos, citogenéticos na população de Rhamdia quelen (Pisces, Rhamdidae), do rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes*. Uberlândia, 2005, 81f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

HOCHBERG, V. B. M.; ERDTMANN, B. Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae)-the occurrence of b chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Brasil. Genet*, v. 11, n. 3, p. 563- 576, 1988.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v.36, p.1014-1015, 1980.

JORGE, L. C.; SÁNCHEZ, S. Estudio citogenético preliminar en *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) del río Paraná, provincia de Corrientes - Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, 2005.

LATT S. A.; DAVIDSON, R. L.; LINS, M. S.; GERALD, P. S. Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33258 Hoechst. *Experiential Cellular Research*, v. 87, p. 425-429, 1974.

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

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C., FORESTI. Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosome of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C- Banding, Silver Nitrate and CMA3 Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, v. 67, p. 25-31, 2002.

MARGARIDO, V. P.; ROMAN, M. P. Estudos citogenéticos em *Glanidium ribeiroi*, *Pariolius* sp. *Rhamdia voulezi* (Pisces, Siluriformes) coletados no rio Iguaçu-Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46°, 2000, Gramado. *Anais 46° Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia (SP), 2000, p. 53.

MATTANÓ, H.; DIAS, A. L. Dados cromossômicos preliminares em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do rio Tibagi- PR. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, X, 2004, Natal. *Anais X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Natal (RN), 2004, p.131.

MEZZANOTTE, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R.; FERRUCCI, L. Chromatin organization and restriction endonucleases activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenetic and cell genetics*, v.3, p.562-566, 1983.

MORAES, V. P. O.; CEREALI, S. S.; FROEHLICH, O.; DIAS, A. L. Primeiros dados citogenéticos em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do planalto da Boquena – MS. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON FISH CYTOGENETICS AND GENETICS, IX E INTERNACIONAL CONGRESS OF FISH GENETICS, I, 2006, São Carlos. *Anais IX Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics e I Internacional Congress of Fish Genetics*, São Carlos (SP), 2006, p. 274.

REEVES, A.; TEAR, J. Micro Measure for Windows, versão 3.01. Disponível em <<http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>>. Acesso em 30/10/2007.

REJÓN, M. R., REJÓN, C. R., OLIVER, J. L. Evolución de los cromosomas B. *Investigación y Ciencia*, v. 133, p. 92-101, 1987.

ROMAN, M. P.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do rio Iguaçu e um caso de triploidia natural. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Anais IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá (PR), 2002, p.76.

SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia: IV: Differentiation of CG and ar rich chromosomes regions in Anura. *Chromosoma*, v. 77, p. 83-103, 1980.

STIVARI, M. K.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype Diversity in Two Population of *Rhamdia quelen* (PISCES, HEPTAPTERIDAE). *Cytologia*, v. 69, n. 1, p. 25-34, 2004.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Explorer Cellular Research*, n. 74, p. 304-306, 1972.

SWARÇA, A. C.; CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 589-593, 2000.

SWARÇA, A. C.; CESTARI, M. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, L. Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Science*, v. 5, p. 51-55, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.

VALCAREL, A., BRUNNER, P., MAGGESE, C. B-chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, v. 110, p. 111-118, 1993.

VERMA, R. S.; BABU, A. *Human chromosomes*, New York: McGraw-Hill, 1995. 419p.

Anexo 1

Material e Métodos

Material

As espécies foram coletadas no rio Araguari (S 18°46'17" / W 048°14'40" / Alt.559m), rio Tijuco (S 19°03'26" / W 048°35'37" / Alt. 643m), Córrego do Bebedouro (S 18°45'44" / W 048°17'24" / Alt. 629m), rio das Pedras (S 18°53'31" / W 048°26'09" / Alt. 783m), em diferentes épocas e horários do dia. A captura das espécies se realizará através de pesca comum, sendo utilizado equipamento do tipo médio/pesado. As espécies capturadas foram numeradas de acordo com o livro de registro do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia e posteriormente depositadas em álcool 70%.

Métodos

Preparação dos cromossomos mitóticos.

Foi usada a técnica descrita por Bertollo et al. (1978), para estudos de cromossomos de peixes, com modificações.

1. Injetar, intraperitonealmente, colchicina a 0,025% na proporção de 1 ml/100g de peso do animal;
2. Deixar o animal em aquário aerado por aproximadamente uma hora, sacrificando-o em seguida. Retirar os tecidos desejados;
3. Lavar o material retirado em uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M;
4. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica;
5. Fragmentar o material, com pinças de dissecação, completando este processo com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha;
6. Colocar a suspensão obtida em estufa a 36° C por 20 minutos;
7. Suspende cuidadosamente o material sedimentado com auxílio de pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrífuga. Nesta transferência, os pedaços de tecido não desfeitos devem ser descartados. Acrescentar 5 a 6

- gotas de fixador (álcool metílico e ácido acético 3:1) recém preparado e suspender novamente o material sedimentado;
8. Centrifugar durante 10 minutos, entre 500 e 900 rpm, descartando o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur;
 9. Adicionar 5 a 6 mL de fixador;
 10. Suspender o sedimento com auxílio de pipeta Pasteur;
 11. Repetir os itens 8 a 10 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material e suspender bem o sedimento;
 12. Pingar 3 a 4 gotas de suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa mantida em água destilada na geladeira, ou sobre uma lâmina seca, aquecida suavemente (25° a 30° C) em chapa aquecedora, ou ainda sobre uma lâmina mantida em água destilada entre 65° e 70°C;
 13. Escorrer o excesso de material, inclinando um pouco a lâmina sobre papel de filtro;
 14. Secar diretamente ao ar.

Detecção das NORs pela impregnação com nitrato de Prata (Ag-NORs).

Foi usada a técnica descrita por Howell e Black (1980).

1. Colocar 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. Misturar as duas soluções e cobrir com lamínula;
3. Transferir para estufa a 70° C. Decorridos alguns minutos (5 a 6), a lâmina adquire uma coloração amarelada, passando para marrom dourada;
4. Remover a lamínula com água e lavar bem a lâmina em água deionizada;
5. Secar e examinar ao microscópio.

Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandas C).

Foi usada a técnica descrita por Sumner (1972), com pequenas modificações.

1. Tratar o material preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N em temperatura ambiente, por 10 a 15 minutos;

2. Lavar em água deionizada, à temperatura ambiente e secar ao ar;
3. Incubar, de 4 a 8 minutos, em solução filtrada recém-preparada de $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, a 5%, a 60° C;
4. Lavar rapidamente em HCl 0,2N e em água deionizada e secar ao ar;
5. Incubar em solução de 2xSSC, a 60° C, por um período de 30 a 60 minutos;
6. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
7. Corar com Giemsa, diluído a 2% em tampão fosfato, pH 6, 8, por 15 a 20 minutos;
8. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

Coloração com Cromomicina A₃.

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

1. Colocar 100µl da solução de cromomicina A₃ (dissolver 0,5mg de cromomicina em 1ml de tampão McIlvaine e adicionar 5mM de cloreto de magnésio - deixar a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), com auxílio de uma micropipeta, sobre a lâmina, cobri-la novamente com uma lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro.
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 1 minuto e depois deixá-la em tampão McIlvaine por 5 minutos.
3. Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.

OBS: Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490nm (zona de excitação do azul).

Coloração com Hoechst 33258

Foi usada a técnica descrita por Latt et al., 1974.

1. Colocar sobre a lâmina previamente preparada cerca de 150 µl de solução Hoechst;
2. Deixar a lâmina em uma cubeta no escuro, a 37°C por 10 minutos;

3. Lavar a lâmina com água corrente e secar ao ar;
4. Adicionar sobre a lâmina 75 µl de *Mouting Solution*;
5. Cobrir com uma lamínula e armazenar no escuro;
6. Analisar a lâmina em fotomicroscópio de fluorescência com filtro 450-490 (zona de excitação do azul).

Técnica de bandamentos por endonucleases de restrição

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

1. Estabelecer a concentração desejada da enzima. Foi utilizado 0,8 U/µl para a enzima *Dde* I (5'...C↓T NAG...3'); 2,0 U/µl para *Bam* HI (5'...G↓A TCC); 0,6 U/µl para a enzima *Taq* I (5'...T↓C GA...3'); 2,0 U/µl para a enzima *Hinf* I (5'...A↓G CT...3') e 0,3 U/µl para a enzima *Alu* I (5'...A↓G CT...3');
2. Colocar em tubo Eppendorf, no gelo, 27 µl de água destilada, 3 µl de tampão da enzima e o volume necessário de enzima para atingir a concentração desejada (para cada lâmina a ser tratada);
3. Usar lâminas pingadas no dia anterior ou preparadas a mais tempo, mantidas no freezer e descongeladas na véspera; dar preferência às preparações que estejam mais limpas e livres de citoplasma;
4. Pingar 30 µl da solução da enzima em cada lâmina, cobrir com lamínula e incubar a 37°C.

Cd- Banda

Foi usada a técnica descrita por Eiberg, 1974.

1. Envelhecer as lâminas em temperatura ambiente por 1 semana a 10 dias;
2. Incubar as lâminas em Earle's Bss pré-aquecido a 85 °C por 45' minutos;
3. Lavar a lâmina com água deionizada e secar ao ar;
4. Corar com solução de Giemsa (5%) por 10 a 15 minutos;

5. Lavar com água deionizada e secar ao ar.

Montagem do cariótipo

As melhores metáfases foram fotografadas em um microscópio óptico ZEISS em campo claro, utilizando a objetiva de imersão. O cariótipo foi montado com auxílio do software Micro Measure versão 3.01 (REEVES; TEAR, 1999), sendo a morfologia cromossômica determinada segundo os critérios propostos por Levan *et al.*, (1964).