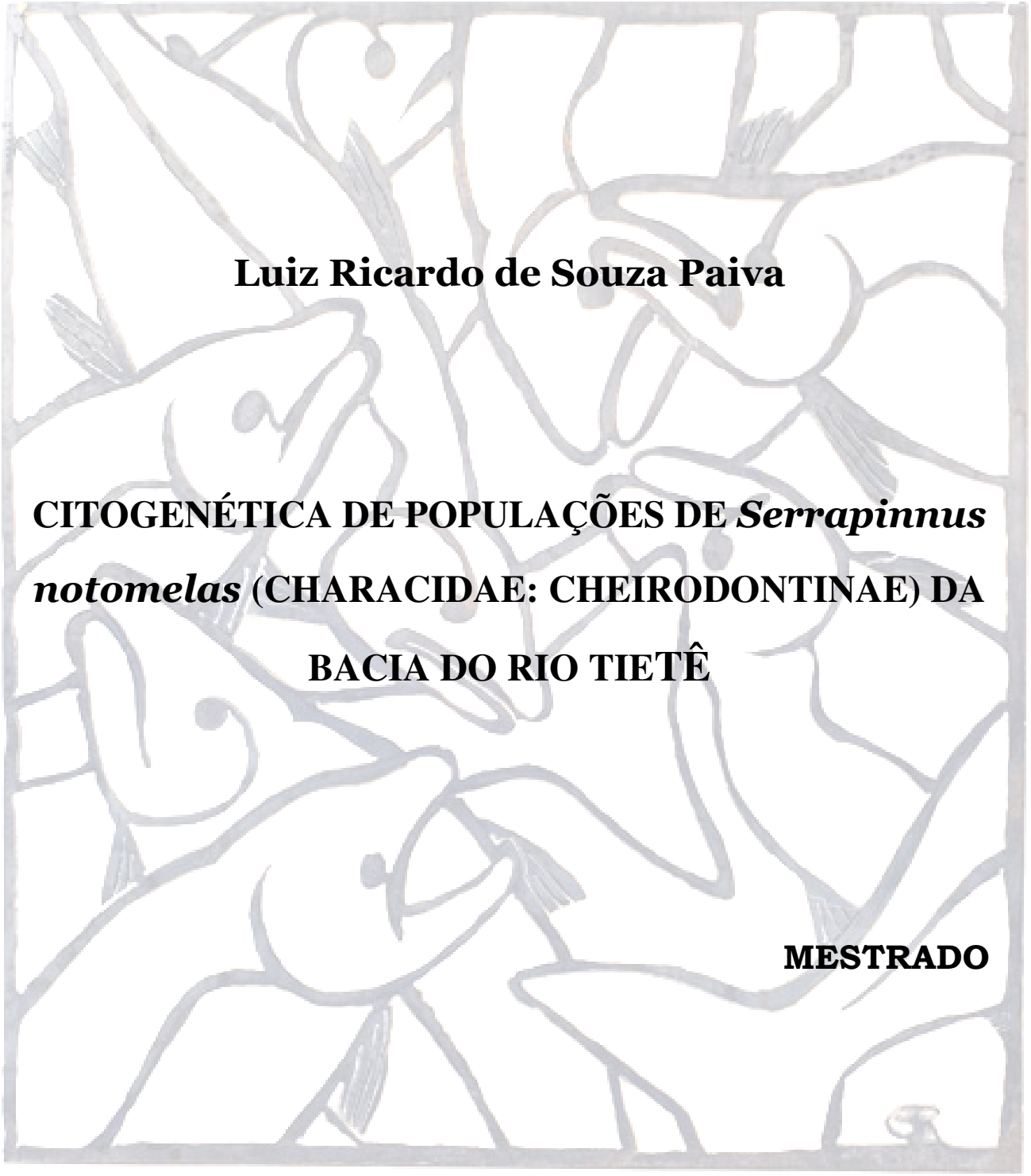
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS



Luiz Ricardo de Souza Paiva

CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Serrapinnus notomelas* (CHARACIDAE: CHEIRODONTINAE) DA BACIA DO RIO TIETÊ

MESTRADO

Botucatu-SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Serrapinnus notomelas* (CHARACIDAE: CHEIRODONTINAE) DA BACIA DO RIO TIETÊ

Luiz Ricardo de Souza Paiva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para Obtenção do título de Mestre Ciências Biológicas, Área de Concentração Zoologia.

Orientador Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu-SP
2007

Dedico este trabalho as duas mulheres excepcionais em minha vida, Abádia (minha mãe) e Greicy (minha esposa), sem deixar de mencionar Paulo (meu pai) o grande incentivador e finaciador de minha estada em Botucatu, e não menos importante Junior e Alessandro (meus irmãos)!

AGRADECIMENTOS

A mais um grão de areia depositado na ampulheta que marca o tempo de minha vida, gostaria de agradecer as inúmeras pessoas que tornaram possível a minha formação de caráter, integridade e conhecimento:

- Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas A/C Zoologia do IBB-Botucatu e ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pela excelente estrutura e condições de realização deste trabalho.

- À Fapesp e ao CNPq, por possibilitar a aquisição de equipamentos e materiais de consumo, para o bom andamento dos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes;

- Ao meu Orientador Prof. Dr. Fausto Foresti, pela confiança e oportunidade concedida a mim, e questionamentos e elucidações que possibilitaram um grande avanço em minha formação acadêmica, espero sinceramente que: "a partir de agora ele possa me dar a sua bicicletinha para eu tomar conta";

- Ao Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior, por dar a oportunidade e base citogenética necessária para que eu pudesse chegar até aqui;

- Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira por ser também meu orientador (não formalmente) e pelas piadas no café, corredor, laboratórios...;

- Ao Prof. Dr. César Martins pela válida contribuição durante o desenvolvimento de meu trabalho e "por não me dar uma canetada";

- A Profa. Dr. Adriane Pinto Wasco pela colaboração e discussão durante o desenvolvimento deste trabalho;

- Aos Prof. Dr. Mario de Pinna e Prof. Dr. Ricardo Bennine pela identificação dos exemplares coletados;

- Aos técnicos Renato Devidé, Ricardo, Zé Eduardo, Dona Terezinha e Dona Iolanda que trabalham duro para deixar tudo pronto e arrumado nos laboratórios e departamento para nós pós-graduandos;

- A Secretária dos departamentos de Morfologia e Histologia Luciana pela pronta atenção quando requisitada;

- Obrigado especial às amigas Irani Alves Ferreira e Tatiane Mariguela, por me ensinarem FISH, Extração de DNA, Sequenciamento, ...;

-As amigas de coração Cíntia Karen Bulla (Cintiatus extressatus) e Fernanda Aparecida Cassemiro (Xakireatus hidrofobicus), por estarem comigo nos bons e maus momentos (Maringá);

- Ao amigo Anderson Luis Alves por me mostrar e direcionar o caminho para o Laboratório de Biologia e Genética de Peixes e me indicar ao Prof. Dr. Fausto Foresti;

- As recém amigas botucudas Patrícia Elda Sobrinho Escudeler e Lígia Carolina Corazza Quessada Bassetto, obrigado pela imensa ajuda durante meu período de adaptação a Botucatu, bem como auxiliar no desenvolvimento desta dissertação;

-Aos amigos que ficaram em Maringá torcendo por mim: Ana Paula, Leandro, Fernanda, Kátia, Edner, Gislaine, Gisele Fidelis, Gisele Lacanalo, Valéria e Cléverson, Ana Cristina Petri;

- Ao meu irmão de coração Dr. Edson Fontes, obrigado por me proporcionar o gosto pela pesquisa, pelo método científico, pela investigação científica, com princípios calcados na ética e responsabilidade;

- Aos Professores Harumi I. Suzuki, Elaine Antoniasi, Erasmo Renesto, Cláudio H. Zawadski, Élio Conti, Walter Della Rosa, Erivelto Goulart, Ismar Mosqueta, Isabel Cristina Martins Santos, Ana Luiza Britto Portela Castro, Edmir Carvalho, Silvia R. Rogatto, por estarem disponíveis e presentes quando me surgiam dúvidas das mais diversas;

- Aos Colegas de Laboratório do IBB-UNESP: Heraldo, Kelly, Daniela, Karina, Prof. Celso, Waldo, Conrado (vulgo Fernando), Kátia, Danillo, Emanuel, Adréia Alves, Andréia Poletto, João Paulo, Marisa, Alex, Fernanda, Daniela, Cristiane, Eleno, João Paulo, Gisleine, Guilherme, Gleisy, Jefferson, Luiz, Marina, Juliana;

- A todos aqueles que por algum momento estiveram presente em minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ..... **II**

RESUMO GERA **1**

1 INTRODUÇÃO GERAL **2**

1.1 SUBFAMÍLIA CHEIRODONTINAE 2
1.2 - O GÊNERO *SERRAPINNUS* 3
1.3 BREVE HISTÓRICO DA CITOGENÉTICA DE PEIXES 3
1.4 - CITOGENÉTICA DE CHEIRODONTINAE 4
1.5 - REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO E DNAR 45S 5

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS **8**

3 MATERIAL E MÉTODOS **10**

3.1 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS 10
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS POR BANDAMENTO C 13
3.3 DETECÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONS), ATRAVÉS DE IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA 13
3.4 OBTENÇÃO DA SONDA DNAR 18S 14
3.4.1 Marcação da sonda *14*
3.4.2 Tratamento das lâminas *15*
3.4.3 Solução de hibridação *15*
3.4.4 Hibridação *16*
3.4.5 Lavagens *16*
3.4.6 Detecção e amplificação do sinal da sonda *16*
3.5 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS 17

4 RESULTADOS **18**

CAPÍTULO I **20**

RESUMO 20
INTRODUÇÃO 21
MATERIAL E MÉTODOS 22
RESULTADOS 24
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO RIO PIRIQUITO (BACIA DO RIO SÃO JOSÉ DOS DOURADOS)** 24
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO RIO PARAITINGUINHA (BACIA DO RIO TIETÊ)** 24
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO RECANTO DOS CAMBARÁS (BACIA DO RIO PARANAPANEMA).** 25
DISCUSSÃO 31
REFERÊNCIAS 37

CAPÍTULO II **42**

RESUMO 42
INTRODUÇÃO 43
MATERIAL E MÉTODOS 44
RESULTADOS 44
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO RIO TIETÊ (SALESÓPOLIS-SP)** 44
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO RIO CAPIVARA (BOTUCATU-SP)** 46
SERRAPINNUS NOTOMELAS - **POPULAÇÃO DO CÓRREGO CAMPO NOVO (BAURU-SP)** 46
DISCUSSÃO 53
REFERÊNCIAS 61

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS **65**

6 REFERÊNCIAS GERAIS **67**

Resumo Geral

Os Cheirodontinae formam um grupo monofilético de pequenos peixes com duas tribos reconhecidas, Cheirodontini e Compsurini, sendo caracterizados pela combinação de um grupo de caracteres que envolvem forma dos dentes, cobertura muscular sobre a região anterior à bexiga natatória e padrão de cores na região umeral. Distribuem-se amplamente na região Neotropical ocorrendo desde o sul do México até a Argentina. No presente trabalho foram analisados exemplares de *Serrapinnus notomelas* provenientes de seis diferentes localidades da região leste da bacia do alto rio Paraná, no Estado de São Paulo, Brasil. Todos os exemplares capturados apresentaram número diplóide de 2n=52 cromossomos, com poucas variações quanto à fórmula cariotípica, indicando uma tendência conservadora do número diplóide da espécie. Porém, o mesmo não parece ocorrer em relação à macro-estrutura cromossômica e à micro-estrutura cariotípica, sendo detectadas diversas alterações com o uso da técnica de bandamento C, bem como quando aplicada a técnica de impregnação pela Prata para identificação das regiões organizadoras nucleolares, confirmada pela aplicação da técnica de hibridação "in situ" fluorescente (FISH) utilizando sonda de DNAr 18S. São discutidos os prováveis eventos de rearranjos cromossômicos envolvidos na diferenciação deste grupo, bem como as características citogenéticas limítrofes entre indivíduos destes ambientes que podem dar início ao estabelecimento de novas espécies.

1 Introdução Geral

1.1 Subfamília Cheirodontinae

A subfamília Cheirodontinae é um clado presente nos Characidae redescrito recentemente por Malabarba (1998), sendo considerado monofilético e compreendendo 23 gêneros, dos quais seis forram apresentados como gêneros novos. Segundo este autor a monofilia do grupo é suportada pela presença combinada de quatro caracteres, sendo que três destes são representados pela forma dos dentes (pentacuspidado e pedicelado), um pela da cobertura muscular anterior à bexiga natatória, que está ausente formando um pseudo-tímpano e outro relacionado ao padrão de cores da região umeral que são exclusivos deste grupo, sendo que nenhum outro Characidae possui tais combinações.

A subfamíia Cheirodontinae é subdividida em duas tribos, Cheirodontini e Compusurini, sendo o gênero *Serrapinnus* pertencente à tribo Cheirodontini, com base principal em caracteres relacionados ao dimorfísmo sexual secundário observado nos raios procorrentes ventrais da nadadeira caudal e raios da nadadeira anal dos machos (Malabarba *et al*, 1998). Malabarba (1998) descreve que Cheirodontinae como um grupo de peixes de pequeno porte, não migradores e que tem como mecanismo reprodutivo a oviparidade no qual o macho fecunda a fêmea, porém o desenvolvimento embrionário é externo. não são migradores e são de pequeno porte. Vazzoler (1996) descreve que a este tipo de comportamento (oviparidade) está relacionado às características particulares dos peixes não migradores que apresentam cuidado parental e estratégia reprodutiva do tipo *r*. Estas características dificultam o fluxo gênico entre as diferentes populações, tornando os estudos citogenéticos populacionais importantes quando se trata de estudar aspectos relacionados à conservação genética em peixes. A tribo Cheirodontini inclui os gêneros *Cheirodon* (com seis espécies), *Spintherobolus* (com

quatro espécies), um characideo fóssil, † *Megacheirodon unicus*, *Nanocheirodon* (uma espécie), *Heterocheirodon* (uma espécie), *Serrapinnus* (sete espécies) e um novo gênero.

1.2 - O Gênero *Serrapinnus*

A denominação do gênero *Serrapinnus* (do Latim *serra*= disse e *pinna*= nadadeira) é dada em referência à forma peculiar dos raios da nadadeira anal do macho quando maduro, descrito como novo para a subfamília Cheirodontinae, antes abrangendo apenas os gêneros *Cheirodon*, *Odontostilbe* e *Holoshesthes* para os Rios Amazonas, São Francisco, Paraná-Paraguai-Uruguai e drenagens costeiras do Brasil (Malabarba, 1998). São peixes de pequeno porte entre 30mm e 60mm de comprimento máximo, habitam ambientes variáveis de lênticos a semi-lóticos e estão aparentemente distribuídos geograficamente em localidades da América Central, América do Sul e regiões costeiras.

1.3 Breve Histórico da Citogenética de Peixes

Os estudos citogenéticos no grupo de peixes tiveram um grande impulso a partir da década de 60, principalmente após a publicação do trabalho de Mcphail e Jones (1966), formulando a técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes. Stewart e Lewis (1968) descreveram que a aplicação da técnica proposta apresentava algumas desvantagens, com referência à visualização dos cromossomos (possível somente sob observação em contraste-de-fase) e à conservação do material, o qual deveria ser mantido em baixas temperaturas. Dessa forma propuseram que o material deveria ser fixado em etanol/ácido acético e corado com Giemsa. Kligerman e Bloom (1976) descreveram outro método para obtenção de cromossomos mitóticos quando solução hipotônica (KCl) foi empreganda pela primeira vez com eficiência, para melhorar a dispersão dos cromossomos. No Brasil Cestari (1973), Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1981; 1993), descreveram metodologias para obtenção de cromossomos mitóticos,

os quais foram adaptados para peixes e passaram a proporcionar excelentes resultados, sendo empregadas como rotina até o presente momento. Estes autores impulsionaram a realização de muitos trabalhos de citotaxonomia dos peixes neotropicais. Contudo, apesar do desenvolvimento desta área o uso das técnicas de bandamento cromossômico clássico em cromossomos de peixes é ainda restrito.

Vários autores relatam que são conhecidos os números diplóides e/ou haplóides de 706 espécies de peixes distribuídas em 207 gêneros e 38 famílias, o que representa aproximadamente 22% das espécies já identificadas, de ocorrência na região Neotropical (Almeida-Toledo *et al*, 2000, Oliveira *et al,* 2000). Segundo Almeida-Toledo *et al* (2000) a variabilidade em peixes neotropicais é extraordinária quanto ao número e fórmula cromossômica, sendo encontrados números diplóides que variam desde 2n=20 cromossomos em *Pterolebias longipinnis* a 2n=134 cromossomos em *Corydoras aeneus.* Outras características citogenéticas dos representantes deste grupo são a presença de cromossomos supranumerários, heteromorfismo ligado ao sexo, além de outros tipos de polimorfismo. Também é comum a ocorrência de grupos com pouca variação no número diplóide, sendo por isso denominados conservados, como os Parodontidae, Prochilodontidae, Chilodontidade, além de outros Characidae que possuem o número diplóide de 2n=54 cromossomos na maioria das espécies já estudadas. Outras variações envolvem a ocorrência de poliploidia (*Corydoras* cf. *simulatus*), a identificação de híbridos naturais (*Eigenmannia*) e de polimorfismos das regiões organizadoras de nucléolos.

1.4 - Citogenética de Cheirodontinae

Os dados citogenéticos disponíveis para os representantes de Cheirodontinae são escassos, e frequentemente representados apenas pela identificação do número diplóide de alguns gêneros como *Cheirodon*, *Paracheirodon*, *Odontostilbe* e *Holoshestes* deste grupo com 2n=52 cromossomos (Oliveira, *et* al. 1988, Nishiyama e Santos, 1995 e Wasko *et al*, 2001). Nenhuma descrição das características

cromossômicas com aplicação de técnicas de bandamentos foi apresentada até o presente. Wasko *et al* (2001) discutem a existência de um possível mecanismo de determinação sexual do tipo ZZ/ZW nas espécies *Odontostilbe paranensis* e *Holoshestes heterodon,* sendo a última reconhecida agora por Malabarba (1998) como *Serrapinnus heterodon.* No presente trabalho, foram realizadas análises citogenéticas em exemplares de *S. notomelas* capturados em seis diferentes localidades das bacias hidrográficas dos principais rios do estado de São Paulo (rio Tietê, Rio Paraitinguinha, rio Capivara, córrego Campo Novo, rio Piriquito, rio Paranapanema). Com o objetivo de caracterizar cromossômicamente a espécie *Serrapinus notomelas* e verificar se o isolamento geográfico poderia influenciar na estrutura cariotípica de exemplares identificados como pertencentes à mesma espécie, utilizou-se coloração convensional com Giemsa, técnicas de bandeamento cromossômico clássico (bandeamento C e detecção de regiões Ag-NOR positivas) e de citogenética molecular (FISH "hibridação 'in situ' fluorescente) com utilização de sonda DNAr 18S.

1.5 - Regiões Organizadoras de Nucléolo e DNAr 45S

Em eucariotos superiores, os genes RNA ribossômicos (RNAr) encontram-se organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e pelo DNAr 5S e compostas por unidades repetidas "em tandem", com centenas a milhares de cópias (Long & David 1980; Martins e Galetti, 2004).

O DNAr 45S consiste de unidades transcricionais que codificam os RNAs ribossômicos 18S, 5.8S e 28S, separadas por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não-transcritos (NTS) (Long & David 1980). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Diversos trabalhos têm demonstrado que várias espécies de peixes apresentam somente dois cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos (Galetti *et al.* 1984; Venere & Galetti 1989; Pauls & Bertollo 1990; Martins & Galetti 1997), enquanto

outras possuem múltiplos cromossomos portadores de RONs (Foresti *et al.* 1989; Sola *et al.* 1990, 1992; Wasko & Galetti 1999, Paintner-Marques *et al*, 2002, Gromicho *et al*, 2005).

Como as regiões organizadoras de nucléolos podem constituir excelentes marcadores citogenéticos em peixes (e.g. Galetti *et al*. 1984), estas têm sido comumente detectadas em várias espécies utilizando coloração com nitrato de Prata (Ag-NOR), mitramicina (MM) ou cromomicina A_3 (CMA_3) (Amemiya & Gold 1986; Phillips *et al*. 1989; Galetti & Rasch 1993; Sola *et al*. 1997). A coloração com nitrato de Prata tem sido a técnica mais utilizada em estudos de localização das regiões organizadoras de nucléolos, embora esta detecte somente RONs transcricionalmente ativas (Goodpasture & Bloom 1975; Hofgatner *et al*. 1979; Howell & Black 1980; Roussel *et al*, 1996; Zurita *et* al, 1998; Paintner-Marques *et al*, 2002; Gromicho *et al*, 2004). Os fluorocromos GC-específicos (MM, CMA_3), ao contrário, podem detectar tanto regiões de RONs ativas quanto inativas em peixes e anfíbios (Mayr *et al*. 1986; Schmid & Guttenbach 1988; Phillips & Hartley 1988), provavelmente como conseqüência do maior conteúdo de bases GC no DNAr (Schmid & Guttenbach 1988). Contudo, investigação realizada por Gromicho *et al*. (2005) revelaram que nem sempre regiões marcadas por fluorocromos correspondem a segmentos do DNA responsáveis pela transcrição de rRNA. Mais recentemente, a localização das regiões organizadoras de nucléolos tem sido confirmada com precisão pela aplicação de técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH), utilizando sondas de RNAr ou de DNAr 18S e 28S em cromossomos fixados de vários vertebrados, incluindo anfíbios, mamíferos (Long & David 1980) e peixes (Pendás *et al*. 1993 a, b; Castro *et al*. 1996; Viñas *et al*. 1996; Abuín *et al*. 1996; Martínez *et al.* 1996; Gornung *et al*. 1997, Martins & Galetti 1998; Fischer *et al*. 2000; Mantovani *et al*. 2005; Gromicho *et al*. 2005; Gromicho *et al*, 2006), entre outros.

Apesar da potencialidade da utilização dos DNAs ribossômicos como marcadores em peixes, a maioria dos dados de localização cromossômica dos genes RNA ribossômicos maiores (RNAr 45S) e menores (RNAr 5S), através de

hibridação “in situ” fluorescente, refere-se principalmente a espécies de Salmoniformes (Pendás *et al*. 1993 a, b; Almeida-Toledo *et al*, 2002; Morán *et al.* 1996; Abuín *et al*. 1996; Fujiwara *et al.* 1998; Sajdak *et al*. 1998) e a caracterização da seqüência nucleotídica do DNAr 5S também restringe-se a poucas espécies (Pendás *et al*. 1995; Sajdak *et al.* 1998; Martins *et al.* 2000; Almeida-Toledo *et al*, 2002). Assim, a ampliação de estudos envolvendo estes marcadores em espécies de peixes neotropicais mostra-se de grande interesse, tanto para ampliar conhecimentos sobre estes segmentos de DNA repetitivos, quanto pela sua utilização como elementos reveladores das alterações estruturais nos cromossomos e seu papel no processo de diversificação das espécies.

2 Justificativa e Objetivos

Segundo Malabarba (1998), a subfamília Cheirodontinae é subdividida em duas tribos, Cheirodontini e Compusurini, sendo o gênero *Serrapinnus* pertencente à tribo Cheirodontini. Esta tribo inclui ainda os gêneros *Cheirodon* (com seis espécies), *Spintherobolus* (com quatro espécies), um characideo fóssil, † *Megacheirodon unicus*, *Nanocheirodon* (uma espécie), *Heterocheirodon* (uma espécie), *Serrapinnus* (sete espécies) e um novo gênero. São de ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul do México até o Rio Grande do Sul. Os estudos citogenéticos deste grupo são escassos quando comparados a peixes de grande porte. Após extensiva revisão bibliográfica, foram encontrados apenas três trabalhos referentes a estudos cromossômicos para a sub-família Cheirodontinae, o trabalho de Oliveira *et al*. (1988), Nishiyama e Santos (1995) e Wasko *et al.* (2001) onde foram cariotipados exemplares dos gêneros *Cheirodon*, *Odontostilbe* e *Holoshestes*. Devido à grande distribuição geográfica e o poucos dados citogenéticos, foi realizado o estudo citogenético da espécie *Serrapinnus notomelas* buscando entender a macro-estrutura cariotípica dos exemplares coletados em diferentes localidades, bem como relacioná-las à distribuição das populações analisadas, com a finalidade de contribuir com as informações que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na diversificação cariotípica e nos processos de especiação neste grupo de peixes.

Com base na constatação da necessidade de informação sobre os componentes deste grupo, foram realizadas investigações sobre as características citogenéticas de *Serrapinnus notomelas*, tendo por objetivo específico:

a) caracterizar cariotipicamente, diferentes populações de *S. notomelas* de três diferentes bacias que compõe o lado leste da bacia do alto rio Paraná (bacia do rio Tietê, com quatro localidades amostradas: rios Tietê e Paraitinguinha

(Salesópolis-SP); Rio Capivara (Botucatu-SP); Córrego Campo Novo (Bauru-SP); Rio Piriquito (bacia do rio São José dos Dourados – Poloni-SP); Recanto dos Cambarás (bacia do rio Paranapanema – Rio Paranapanema).

b) identificar através de técnicas de bandeamento clássico e molecular, marcadores que possam fornecer informações comparativas entre as diferentes populações;

c) compreender quais os mecanismos cromossômicos envolvidos no processo de especiação;

d) contribuir com informações citogenéticas para o estabelecimento das relações as diferentes amostras desta espécie de peixe e dos prováveis mecanismos de especiação envolvidos no processo de sua diversificação.

3 Material e Métodos

No presente trabalho foram capturados exemplares da S. notomelas (Figura 1) relacionados na Tabela 1, em seis localidades correspondentes a componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê, São José dos Dourados e Paranapanema: rio Tietê (Salesópolis-SP); rio Paraitinguinha (Salesópolis-SP); rio Capivara (Botucatu-SP); córrego Campo Novo (Bauru-SP); rio Piriquito (Bacia do rio São José dos Dourados – Poloni-SP); Recanto dos Cambarás (rio Paranapanema – Itatinga) (Figura 2). Os animais foram transportados vivos para o Laboratório de Biologia e Genética de Peixes/IBB/UNESP e mantidos em aquários aerados até serem sacrificados para obtenção de cromossomos e para coleta de amostras de tecidos, para aplicação de técnicas de estudos moleculares. Para extração de DNA, foram coletadas amostras de fígado e de nadadeira caudal, que foram fixados e estocados em etanol 100%.

3.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica descrita por Egozcue (1971) e por Cestari (1973), e posteriormente utilizada em peixes por Foresti et al. (1981, 1993). A metodologia consiste em:

a) injetar solução aquosa de colchicina 0,025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) intra-abdominalmente nos animais com uma seringa, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Deixá-lo nadando livremente por 40 minutos. Este tempo foi padronizado para as espécies analisadas;
b) sacrificar o animal para retirada do rim, (região anterior), com o auxílio de tesoura e pinças;
c) colocar o tecido retirado em placa de Petri contendo 7ml de solução hipotônica (KCL 0,075M);

Figura 1- Exemplar de *Serrapinnus notomelas.*

d) dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, primeiro deve-se dissociar o material com pinças de ponta fina, depois, homogeneizar com o auxílio de uma pipeta Pasteur;

e) transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e manter em estufa a 37ºC, durante 21 minutos;

f) retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de solução fixadora (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente) gelada. Agitar levemente a mistura com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente;

g) adicionar cerca de 6ml do fixador, novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga 1000rpm por 10 minutos;

h) retirar o sobrenadante e ressupender o precipitado em 6ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a 1000rpm;

i) repetir o item h por 2 ou 3 vezes;

j) pingar o material em lâminas e secá-las ao ar livre.

OBS: os animais sacrificados, foram antes anestesiados em solução aquosa de benzocaína (5% - solubilizada em 1ml de etanol e diluído então em 1L de água destilada).

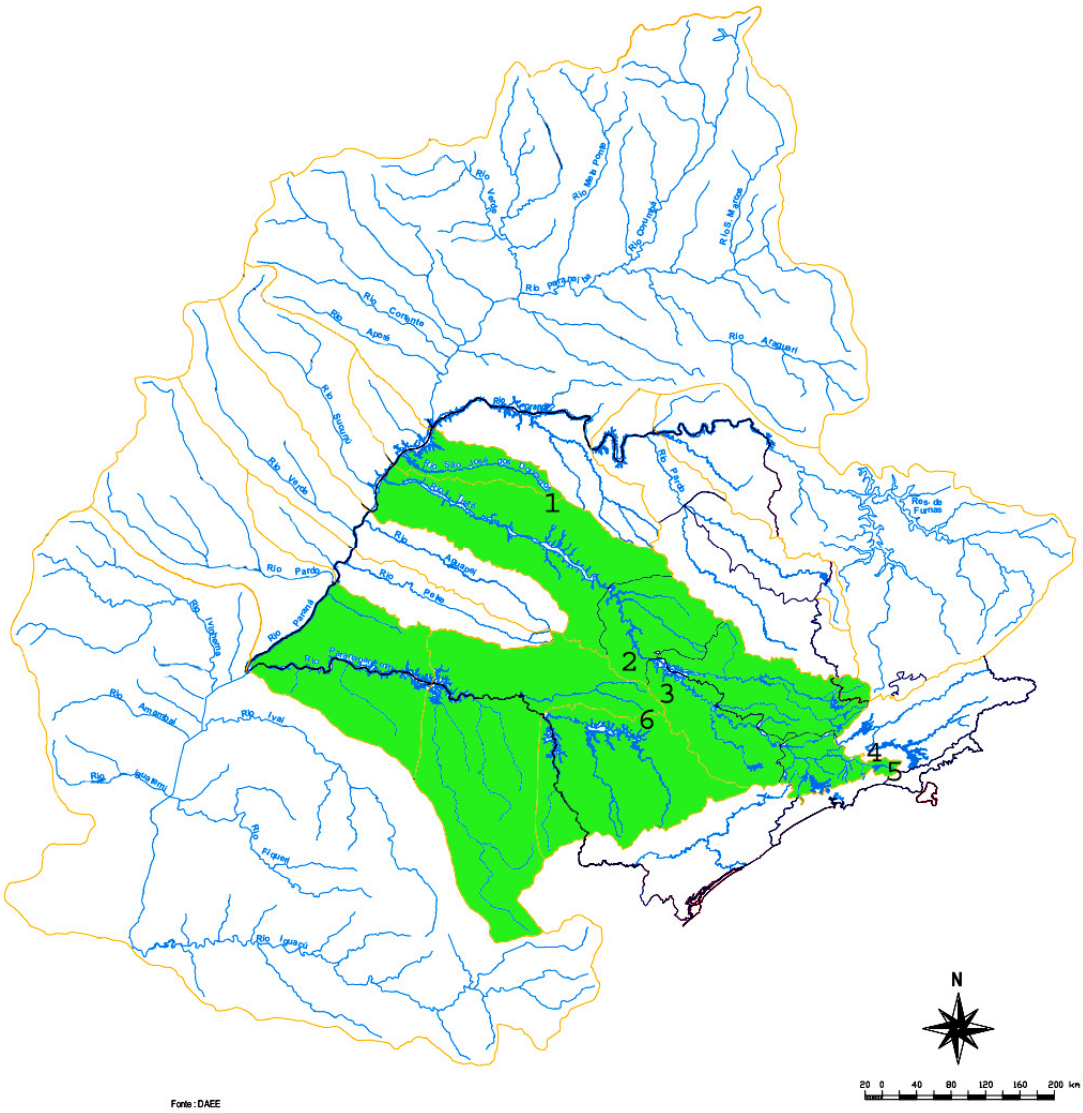


Figura 2 - Mapa da sub-bacia hidrográfica do Rio Paraná indicando as sub-bacias amostradas na região leste do estado de São Paulo/SP (em verde). Os números indicam os locais amostrados em 1) rio Piriquito/ bacia do rio São José Dos Dourados; 2) córrego Campo Novo/ bacia do rio Tietê; 3) rio Capivara/ bacia do rio Tietê; 4) rio Paraitinguinha/ bacia do rio Tietê; 5) rio Tietê e 6) Recanto dos Cambarás/ bacia do rio Paranapanema.

3.2 Caracterização das regiões heterocromáticas por Bandamento C

Para obtenção de bandas C utilizou-se a técnica descrita originalmente por Sumner (1972), que consiste em:

a) hidrolisar as lâminas por 30min em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
b) passar por uma solução de hidróxido de bário (Ba(OH)2) por 1min e lavar em água destilada;
c) lavar rapidamente em HCl 1N a 60°C e lavar novamente em água destilada;
d) incubar por 30min em 2xSSC (pH = 6,8), a 60°C;
e) corar por aproximadamente 30min com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (pH = 6,7).

3.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), através de impregnação com nitrato de Prata

As RONs serão detectadas utilizando a técnica descrita por Howell & Black (1980) que consiste em:

a) pingar sobre uma lâmina preparada conforme a técnica adotada para obtenção de cromossomos mitóticos, 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1ml para cada 100ml de solução), mantida em frasco escuro e em geladeira. Pode-se utilizar gelatina comercial sem sabor e incolor.
b) adicionar sobre a gota depositada anteriormente, 1 gota de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de Prata a 50% mantida em frasco escuro e a 4°C.
c) misturar bem e cobrir com uma lamínula. Incubar a preparação em estufa a 60°C sobre um suporte por 3 minutos, realizando um monitoramento da coloração da

d) lâmina e dos cromossomos ao microscópio.
e) após a preparação começar a apresentar coloração mais escura, quando os cromossomos assumem uma tonalidade amarelada e as RONs e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água destilada, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Pode-se corar com a preparação com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8), durante 20 a 30 segundos em seguida, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

3.4 Obtenção da sonda DNAr 18S

As seqüências de DNAr 18S utilizadas foram obtidas a partir de fragmentos de DNA com cerca de 1800 pares de bases obtidas de tilápia (Oreochromis niloticus) e clonados em p-GEMT, sendo marcadas e realizada a sua localização nos cromossomos, com seguinte processamento:

a) marcação por "nick translation" com biotina-14-dATP de acordo com as instruções do fabricante (Kit BionickTM Labelling - Invitrogen);
b) localização das seqüências de DNAr 18S nos cromossomos por Avidina-N-fluorescente Isotilcianato (FITC) conjugado;
c) amplificação do sinal utilizando Anti-avidina biotinilada, seguindo-se uma segunda vez de aplicação com Avidina-FITC;
d) utilização de Iodeto de Propídio (50 µg/ml) diluído em Antifade como contra-corante para os cromossomos.

3.4.1 Marcação da sonda

A sonda foi marcada pelo método de nick translation utilizando o Kit BioNickTM Labeling System (Invitrogen):

a) preparar um mix contendo: 1µL 10x dNTP mix; 1µL do DNA sonda 200ng/µL); 1µL do mix de enzima; 6µL de água Milli Q.

b) misturar bem, centrifugar brevemente e incubar a 16º C por duas horas;
c) adicionar 1µL de stop buffer, 1µL de acetato de sódio 3M e 22µL de etanol 100% gelado;
d) misturar, invertendo o tubo e centrifugar rapidamente, colocar então no freezer – 70º C por 1 hora;
e) centrifugar por 15 minutos a 15.000rpm a 4º C;
f) descartar o sobrenadante e adicionar 50µL de etanol 70% gelado;
g) centrifugar por 5 minutos a 15.000rpm a 4º C;
h) descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
i) ressuspender e 16µL de água Milli Q.

3.4.2 Tratamento das lâminas

As lâminas com as preparações cromossômicas podem ser preparadas com um dia de antecedência ou no momento do uso. Para cada lâmina:

a) colocar 100µL de RNAse 40µg/mL (0,4µL de RNAse 10mg/mL e 99,6µL de 2xSSC) sobre a lamínula, aderir a lâmina sobre esta lamínula e deixar em câmara úmida (umidecida com 2xSSC) a 37º C por 1 hora e 30 minutos;
b) lavar duas vezes em 2xSSC durante 10 minutos cada;
c) desidratar em série alcoólica a 70%, 85% e 100% durante 10 minutos cada passagem, utilizando soluções geladas;
d) mergulhar a lâmina em formamida 70% em 2xSSC por 4 minutos a 70º C (solução de formamida pode ser guardada para ser reutilizada no dia seguinte);
e) desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100% a – 20º C por 5 minutos cada (este passo é muito importante, pois as lâminas devem ser passadas rapidamente da formamida para o álcool). Deixar secar ao ar.

3.4.3 Solução de hibridação

Em um tubo Eppendorf contendo 16 ul da sonda adicionar 40µL de formamida (concentração final 50%), 16µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 8µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Desnaturar a sonda a 95º C por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo.

3.4.4 Hibridação

Colocar 80µL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina com a preparação sobre a lamínula.

Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37º C overnight.

3.4.5 Lavagens

a) lavar as preparações inicialmente em 2xSSC em temperatura ambiente apenas para tirar a lamínula e escorrer bem a lâmina, sem deixar secar. Deste momento em diante as lâminas não podem secar:
b) lavar em formamida 50% por 15 minutos a 37º C (utilizar a mesma solução do dia anterior – formamida 70% e transformá-la para 50%);
c) lavar em 2xSSC por 15 minutos a 37º C por uma vez;
d) lavar em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente;
e) lavar em 4xSSC à temperatura ambiente (só para enxaguar).

3.4.6 Detecção e amplificação do sinal da sonda

a) sobre uma lamínula, colocar 0,1µL de avidina-FITC 0,07% em 70µL de tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15M de NaCl);
b) inverter a lâmina com a preparação sobre esta lamínula e deixar por 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37º C;
c) após este tempo, lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada, com agitação em tampão de bloqueio (NaHCO3 1.26% / citrato de sódio 0,018% / Triton 0,0386%

em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1%) recém-preparado a 42º C. escorrer a lâmina e secá-la por baixo;

d) sobre uma lamínula depositar 80µL de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2µL de anti-avidina estoque em 78 µL de tampão de bloqueio), inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37º C por 30 minutos;

e) novamente lavar em tampão de bloqueio a 42ºC três vezes durante 5 minutos cada com agitação;

f) repetir os passos de (a) até (e);

g) aplicar novamente o FITC e fazer as lavagens como descrito no passo (e);

h) lavar em 4xSSC/Triton 2% duas vezes por 3 minutos cada, com agitação;

i) lavar em 4xSSC/Triton 0,2% duas vezes por 3 minutos cada, com agitação;

j) escorrer as lâminas e deixar secando ao ar;

k) secar a lâmina e montar com iodeto de propídio na proporção de 20µL de meio de montagem antifading com 0,7µL de solução de iodeto de propídio a 50µg/mL.

3.5 Processamento das imagens

Os cromossomos metafásicos foram capturados utilizando microscópio óptico Olympus BX-62, software de captura Image-Pro MC v 6.0 e processadas em Adobe Photoshop v 7.0. Os cariótipos foram obtidos a partir de medidas cromossômicas propostas por Levan et al. (1964).

4 RESULTADOS

As análises efetuadas resultaram na elaboração de artigos científicos que estão apresentados separadamente, na forma de capítulos. As citações bibliográficas não foram listadas nos mesmos e se encontram relacionadas no item Referências Bibliográficas.

Capítulo I: Evidências de rearranjos cromossômicos estruturais não numéricos em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontini) de três diferentes localidades componentes da bacia do alto rio Paraná

Capítulo II: Evidências de Especiação Cromossômica em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontinae) de Três Localidades do Rio Tietê

Capítulo I: Evidências de rearranjos cromossômicos estruturais não numéricos em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontini) de três diferentes localidades componentes da bacia do alto rio Paraná

Capítulo I

Evidências de rearranjos cromossômicos estruturais não numéricos em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontini) de três diferentes localidades componentes da bacia do alto rio Paraná

Resumo

O gênero *Serrapinnus* foi descrito como novo para a sub-família Cheirodontini, sendo caracterizado principalmente pela presença de caracteres sexuais secundários. A espécie *Serrapinnus notomelas* distribui-se por toda a bacia do Rio Paraná, é um peixe de pequeno porte medindo cerca de 30mm a 60mm, sua importância comercial relacionada à área da aquariofilia. Tem como importância ecológica a participação direta na cadeia trófica de espécies predadoras associadas à macrófitas. Os exemplares foram cariotipados e analisados por diferentes tratamentos como banda-C, NOR e FISH utilizando como sonda o rDNA 18S. Todos os indivíduos analisados apresentaram número diplóide de 2n= 52 cromossomos (5 pares de cromossomos do tipo metacêntrico, 16 pares de submetacêntricos, 3 pares subtelocêntricos e 2 de acrocêntricos). O padrão de regiões heterocromáticas ricas em GC demonstrou-se pouco conservado quanto a associação com as NORs, quando empregada a técnica de bandeamento C. As NORs foram identificadas através da impregnação pela prata demonstrando certa variação entre os cromossomos homólogos das populações do rio Paraitinguina e Paranapanema. As regiões organizadoras de nucléolos ativas ou não, foram identificadas através da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S, obtidas a partir do DNA extraído dos exemplares analisados, apresentando-se múltipla para os exemplares do rio Paranapanema e simples nas demais localidades. Foi possível observar que, em se tratando da mesma espécie, há diferenças citogenéticas expressivas quando analisadas populações que se encontram isoladas em diferentes bacias hidrográficas.

Introdução

Os peixes do gênero *Serrapinnus* se distribuem por toda a bacia do Rio Paraná, são facilmente encontrados em ambientes lênticos e semi-lênticos, associados à macróficas, participando diretamente da cadeia trófica de predadores quando associados à macrófitas (Lowe-McConnell, 1999), tendo importância comercial como espécie utilizada na área de aquariofilia. Segundo Malabarba (1998), este gênero é caracterizado por um conjunto de caracteres morfológicos primários e secundários como a presença de um pseudo-tímpano na parte mais anterior do corpo, raios procorrentes da nadadeira caudal e últimos raios da anal, voltados para frente nos machos e presença de mácula no pedúnculo caudal. Para *Serrapinnus notomelas*, inclui-se ainda presença de uma mácula no pedúnculo caudal, atravessando desde a base até a parte mais superior e pigmentação no primeiro raio da dorsal, desde sua base até sua região mais extrema. Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Serrapinnus* eram desconhecidos até a redescrição de espécies por Malabarba (1998), sendo que o gênero *Odontostilbe*, com número diplóide de 2n=52 caracterizado por Wasko *et al*, (2001), é agora reconhecido como *Serrapinnus*. O trabalho de Wasko *et al*, (2001) descreve o número diplóide de 2n= 52 cromossomos (18 pares de cromossomos do tipo meta- submetacêntricos, 6 subtelocêricos e 2 acrocêntricos) com possível polimorfismo cromossômico ligado ao sexo, nos exemplares analisados, o que não foi observado no presente trabalho.

Estudos citogenéticos populacionais em peixes podem oferecer valiosas informações sobre a história citogenética evolutiva de um determinado grupo ou espécie, com enfoque na estrutura e composição de cromossomos supranumerários, micro e macro-cromossomos do complemento A e presença de cromossomos sexuais, além de auxiliar na identificação de novas espécies (Koehler *et al*, 1997; Maistro *et al*, 2000; Ferro *et al*, 2003; Fontana *et al,* 2003; Diniz e Bertollo, 2006; Fernandes *et al,* 2005; Fernandes *et al,* 2006; Artoni *et al*, 2006). Este trabalho teve como proposta a avaliação da estrutura e composição cromossômica de exemplares de *Serrapinnus notomelas* de ocorrência em três diferentes bacias hidrográficas (bacia do rio São José

dos Dourados, bacia do rio Tietê e bacia do rio Paranapanema), que compõe parte das principais bacias do lado leste do rio Paraná, na região do estado de São Paulo.

Material e Métodos

Foram analisados 43 exemplares de *Serrapinnus notomelas* em três diferentes bacias que compõe a bacia do alto rio Paraná: 16 exemplares (6 fêmeas e 10 machos) provenientes do córrego Piriquito (bacia do rio São José dos Dourados); 14 exemplares (10 fêmeas e 4 machos) provenientes do rio Paraitinguinha (bacia do rio Tietê); 13 exemplares (8 fêmeas e 5 machos) provenientes do Recanto dos Cambarás (bacia do Rio Paranapanema) (Figura 1). As preparações cromossômicas foram obtidas de acordo com Foresti (1993), o padrão de heterocromatina constitutiva (Bandas-C) de acordo com Sumner (1972) e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NOR) foram evidenciadas através de impregnação pela prata (Howel and Black, 1980). Foi realizada também a hibridação "in situ" fluorescente (FISH segundo a técnica proposta por Pinkel *et al*. 1986), com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001). As seqüências de DNAr 18S, com cerca de 1800 pares de bases obtida de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Martins *et al*., 2000) e clonadas em p-GEMT foram marcadas por "nick translation" com biotina-14-dATP de acordo com as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System – Invitrogen). As seqüências de DNAr 18S foram localizadas nos cromossomos com o uso de Avidina-N-fluorescente Isotilcianato (FITC) conjugado, sendo o sinal amplificado com nova conjugação por Anti-avidina biotinilada seguida de novo tratamento com Avidina-FITC. Os cromossomos foram contracorados com Iodeto de Propídio (50 µg/ml) diluído em Antifade. As imagens das preparações foram capturadas utilizando microscópio óptico Olympus BX-62 e software de captura Image-Pro MC v 6.0, sendo processadas em Adobe Photoshop v 7.0. Os cariótipos foram montados a partir de medidas cromossômicas realizadas e os cromossomos classificados de acordo com a nomenclatura proposta por Levan *et al*. (1964).

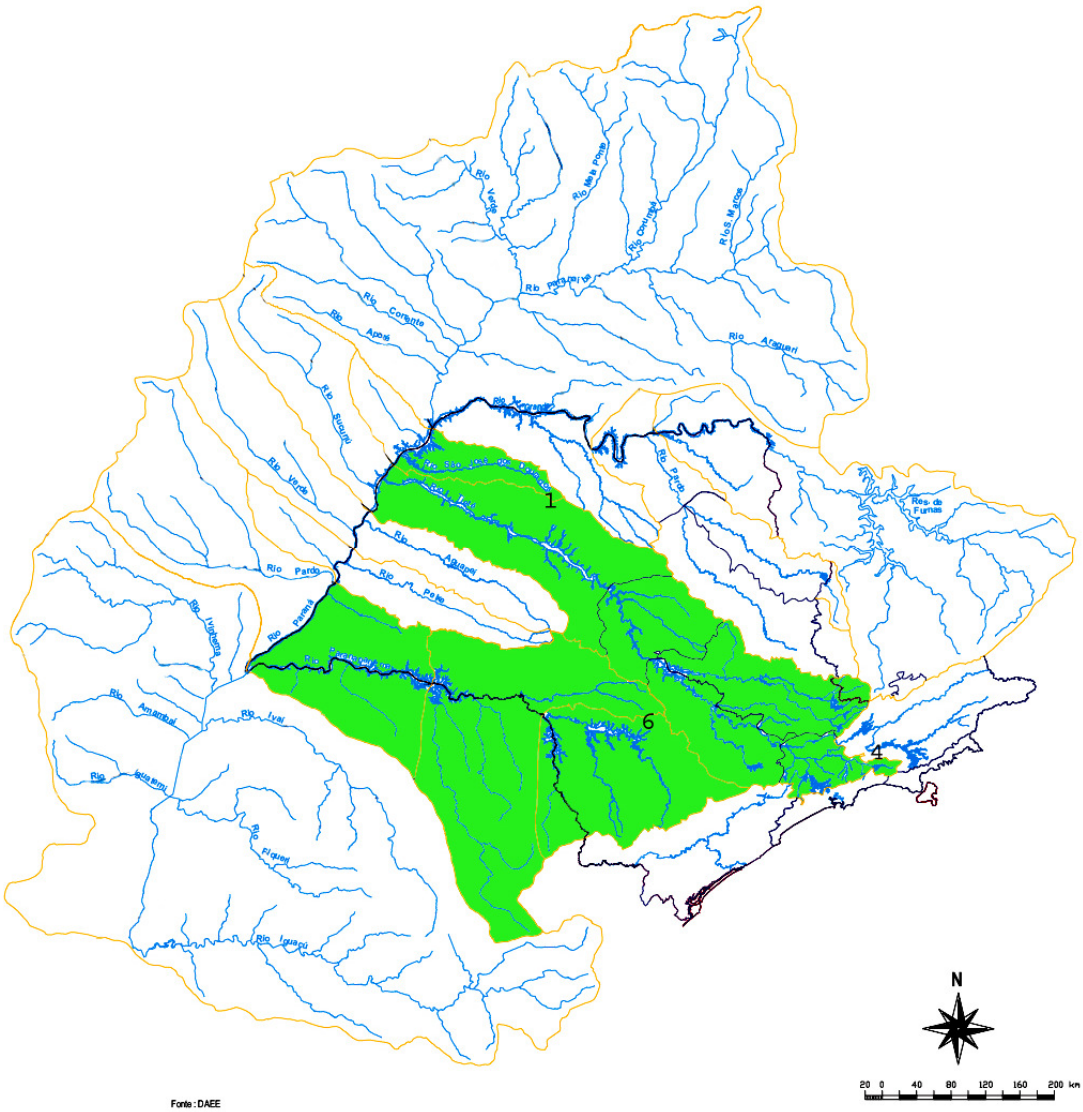


Figura 1) Mapa da sub-bacia hidrográfica do Rio Paraná indicando as sub-bacias amostradas na região leste do estado de São Paulo/SP (em verde). Os números indicam os locais amostrados, 1) rio Piriquito/ bacia do rio São José Dos Dourados, em 5) rio Paraitinguinha/ bacia do rio Tietê e em azul e em 6) Recanto dos Cambarás/ bacia do rio Paranapanema**.**

Resultados

Serrapinnus notomelas - **população do rio Piriquito (bacia do rio São José dos Dourados)**

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n= 52 cromossomos e número fundamental NF= 100, sendo seu cariótipo composto por 5 pares de cromossomos metacêntricos, 16 pares de cromossomos submetacêntricos, 3 pares de cromossomos subtelocêntricos e 2 pares de cromossomos acrocêntricos (Figura 2a). O padrão de heterocromatina constitutiva por bandeamento C revelou marcações nas regiões teloméricas, centroméricas, intersticiais e pericentroméricas, para braço curto e braço longo. Foram caracterizados os seguintes pares cromossômicos: pares 2, 12 e 14 (pericentromérica, braço longo) e pares 6 e 9 (intersticial, braço longo) e uma marcação mais evidente para um dos homólogos do par 26 de cromossomos acrocêntricos (braço curto), sendo ainda possível identificar marcações centroméricas em todos os cromossomos (Figura 3a). A Ag-NOR positiva foi detectada no braço curto do par 26 de cromossomos acrocêntricos (Figura 4a). A técnica de hibridação "in situ" fluorescente com a utilização de sonda DNAr 18S possibilitou a evidenciação de duas regiões ribossomais responsáveis pela organização nucleolar, as quais confirmaram com a marcação visualizada pela impregnação com nitrato Prata (região do braço curto do par 26) (Figura 4b).

Serrapinnus notomelas **- população do rio Paraitinguinha (bacia do Rio Tietê)**

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n= 52 com número fundamental NF= 100 cromossomos, sendo seu cariótipo composto por 5 pares de cromossomos metacêntricos, 16 pares de cromossomos submetacêntricos, 3 pares de cromossomos subtelocêntricos e 2 pares de cromossomos acrocêntricos (figura 2b). O bandeamento C possibilitou a investigação das regiões ricas em heterocromatina constitutiva, auxiliando na descrição e diferenciação desta população com as demais analisadas no presente trabalho. Assim como a população analisada

anteriormente, apresentaram marcações em posições teloméricas, centroméricas e pericentroméricas, sendo mais evidentes as marcações observadas nos cromossomos dos seguintes pares: 6 (pericentromérica, braço longo), 7 e 20 (pericentromérica, braço curto) e 12 (intersticial, braço longo) e uma marcação mais evidente para um dos homólogos do par 26 (p) de cromossomos acrocêntricos (Figura 3b). As marcações Ag-NORs foram detectadas ao longo do braço curto em ambos os cromossomos acrocêntricos do par 26 (Figura 5a). Em cerca de 37,5% (210/560) das metáfases analisadas, foi identificada a marcação em apenas um dos cromossomos homólogos desse par. Nestes casos, ambos os braços apresentaram marcação, sendo que no braço longo ocorreu em posição telomérica (Figura 5b). A hibridação "in situ" fluorescente com sonda DNAr 18S, confirmou as marcações obtidas pela técnica de Ag-NORs positivas para o par 26 e presentes ao longo do braço curto (Figura 5c). Nos casos em que as marcações pela Prata estiveram presentes em apenas um dos cromossomos homólogos deste par, a aplicação da técnica FISH com o uso de sonda DNAr 18S, foram identificadas marcações em ambos os cromossomos do par 26 e também uma fraca marcação telomérica no braço longo de um dos homólogos (Figura 5 c e d).

Serrapinnus notomelas - **população do Recanto dos Cambarás (bacia do rio Paranapanema).**

Assim como as demais populações analisadas no presente trabalho, os exemplares de *S.notomelas* coletados no Recanto dos Cambarás, apresentaram número diplóide de 2n=52 cromossomos e número fundamental NF= 100, sendo o cariótipo representado por 5 pares de cromossomos metacêntricos, 16 pares de cromossomos submetacêntricos, 3 pares de cromossomos subtelocêntricos e 2 pares de cromossomos acrocêntricos (Figura 2c). Os exemplares desta população apresentaram um padrão mais rico em regiões de heterocromatina constitutiva por bandeamento C. Com marcações mais evidentes identificadas nos pares 1, 12, 15 e 16 (intersticial, braço longo), 2 (pericentromérica, braço curto) 10 (braço curto) e uma

marcação mais conspícua em um dos homólogos do par 26 (braço curto) de cromossomos acrocêntricos (Figura 3c). As regiões Ag-NORs positivas evidenciaram marcações ao longo do braço curto do par 26 (Figura 6a). Em cerca de 25% (130/1040) das metáfases, foi possível observar marcação intersticial em um dos cromossomos deste par e para o seu homólogo a marcação ocorreu ao longo do braço curto (Figura 6b). Com a aplicação da técnica de FISH, utiizando a sonda DNAr 18S, foi visualizada marcação ao longo do braço curto de ambos os homólogos do par 26, não acorrendo marcação na região pericentromérica, detectada pela técnica de impregnação pela Prata (Figura 6c).

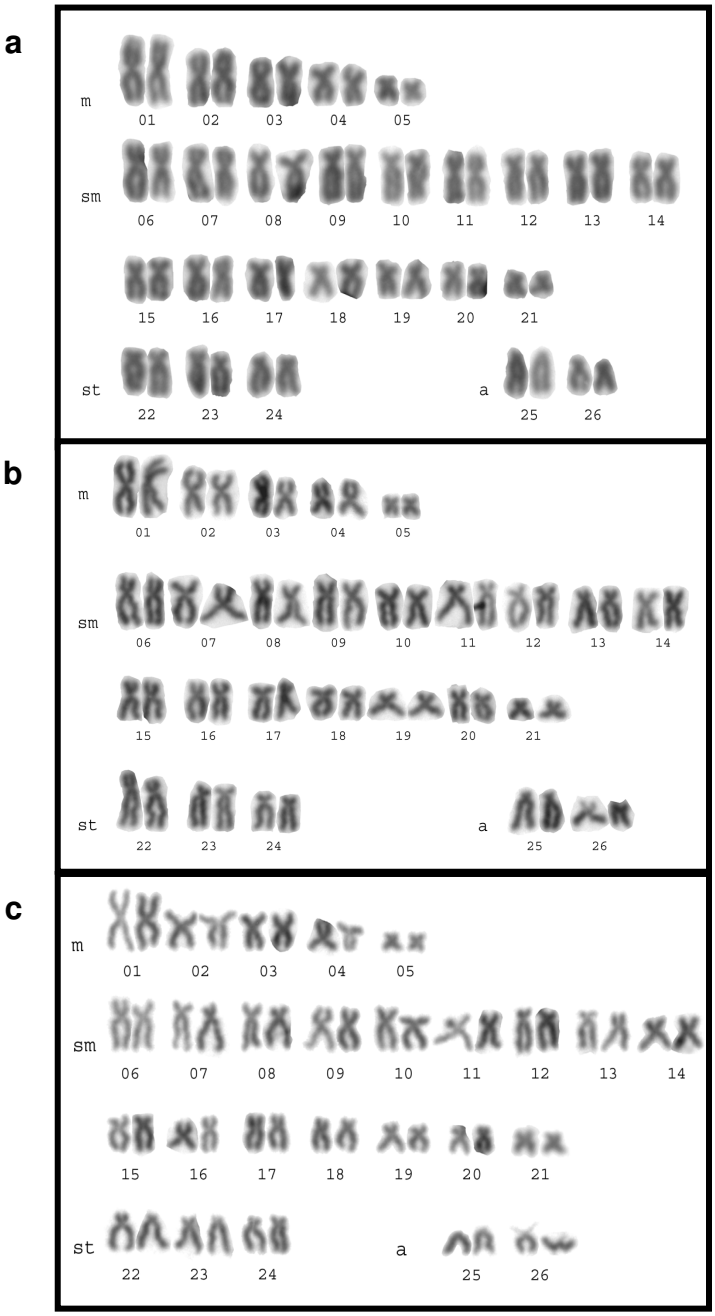


Figura 2 - Cariótipos de Serrapinnus notomelas de exermplares capturados em localidades de três bacias hidrográficas que compõe a bacia do Alto rio Paraná. a) rio Piriquito (bacia do rio São José dos Dourados; b) rio Paraitinguinha (bacia do rio Tietê); d) Recanto dos Cambarás (rio Paranapanema)

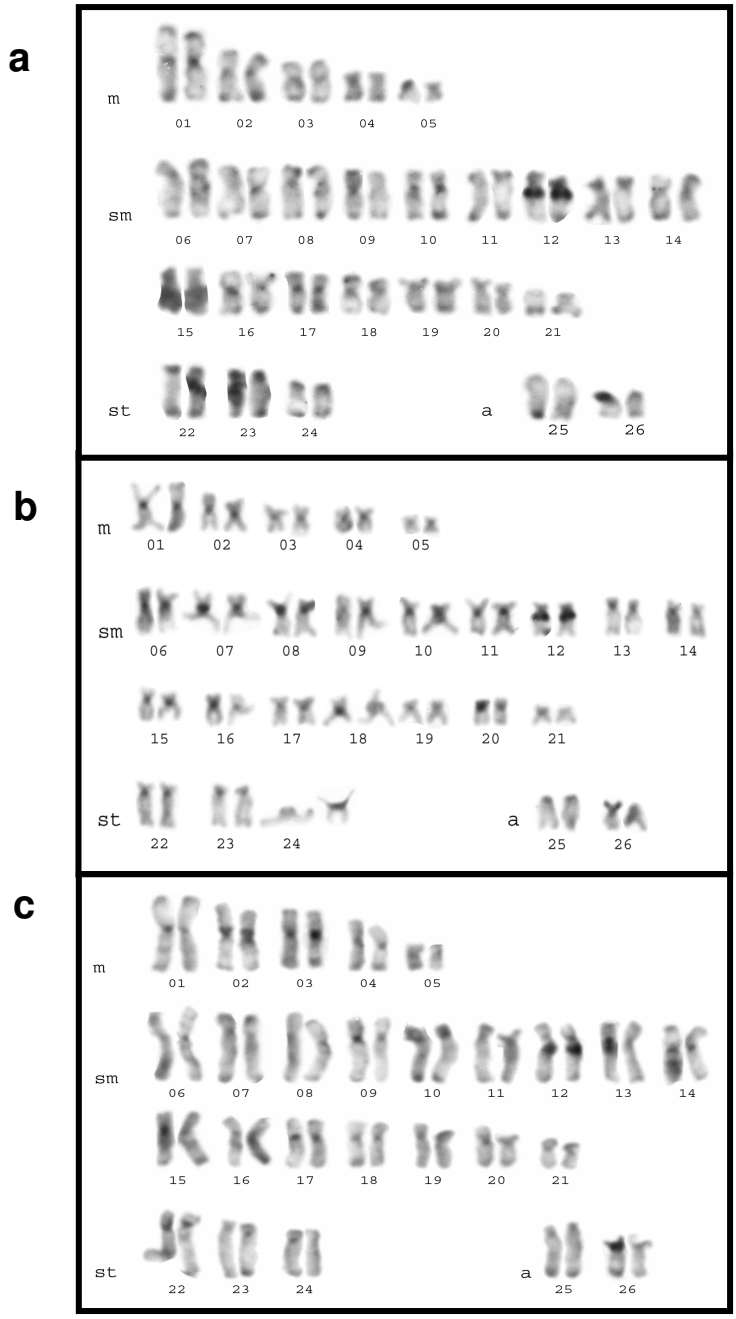


Figura 3 - Cariótipos de exemplares de três populações de Serrapinnus notomelas submetidos à técnica de Bandeamento C. As amostras analisadas correspondem a exemplares capturados no rio Piriquito (a); no rio Paraitinguinha (b) e no rio Paranapanema (Recanto dos Cambarás) (c), componentes da bacia do alto rio Paraná.

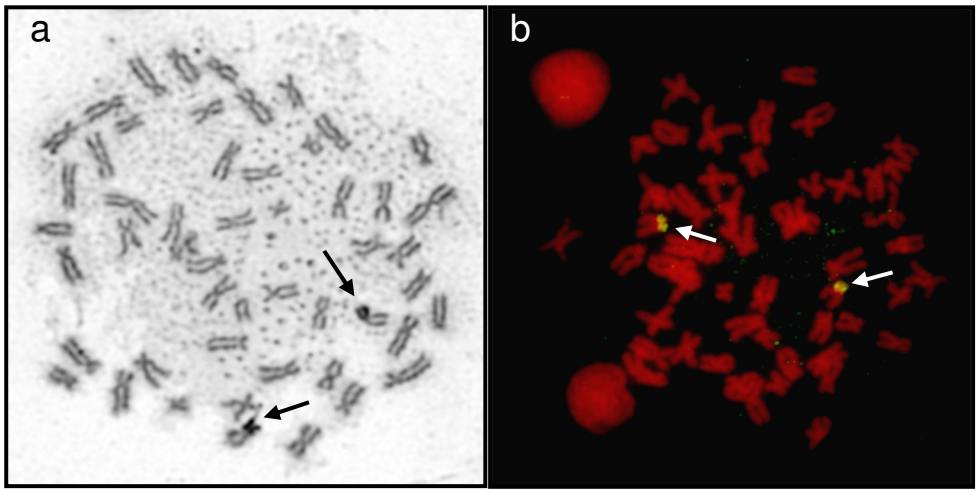


Figura 4 - Metáfases de *Serrapinus notomelas* de exemplares do rio Piriquito (bacia do rio São José dos Dourados): a- preparação obtida com a técnica Ag-NOR; b- preparação com aplicação de FISH; as setas indicam a marcação com a sonda de DNAr 18S.

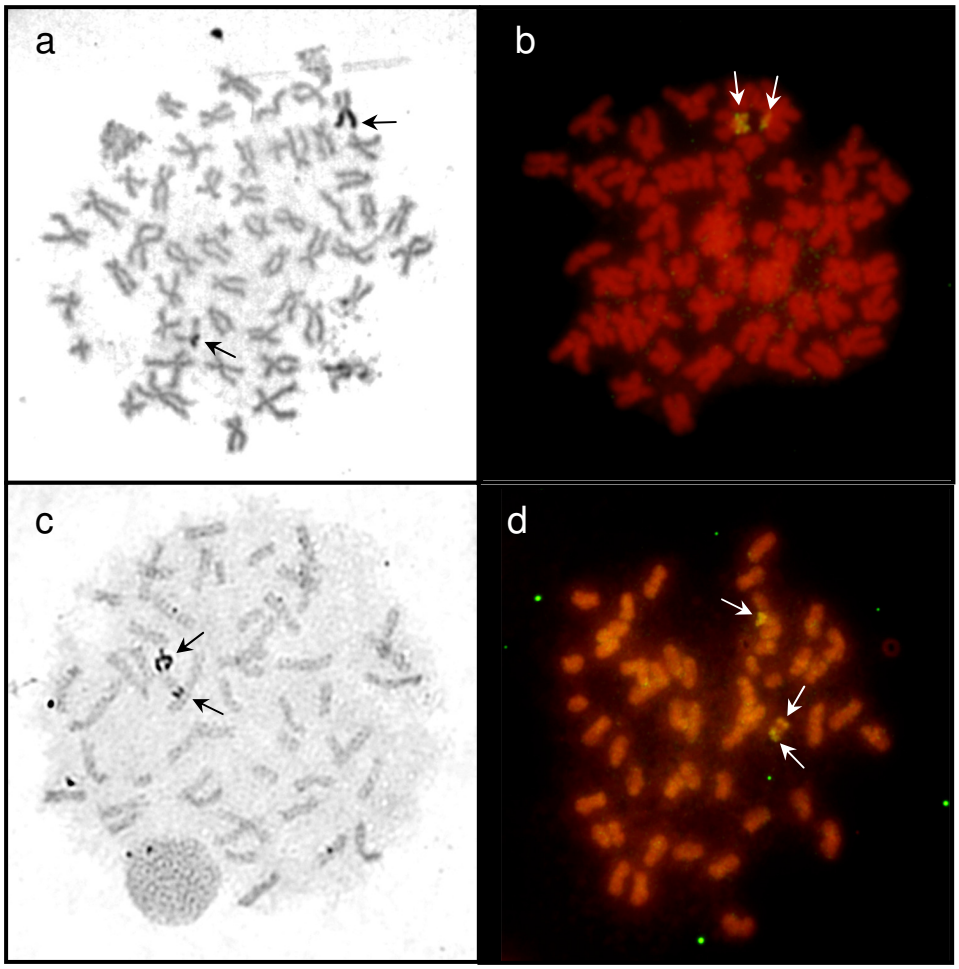


Figura 5 - Metáfases de *Serrapinnus notomelas* exemplares do rio Paraitiguinha (bacia do rio Tietê: a) setas indicam cromossomos portadores de NORs simples; b) seta indica cromossomo portadores de NORs em ambos os braços; c) setas indicam marcação com sonda DNAr 18S; d) setas indicam marcações em ambos os braços de um dos cromossomos homólogos do par 26 de acrocêntricos;

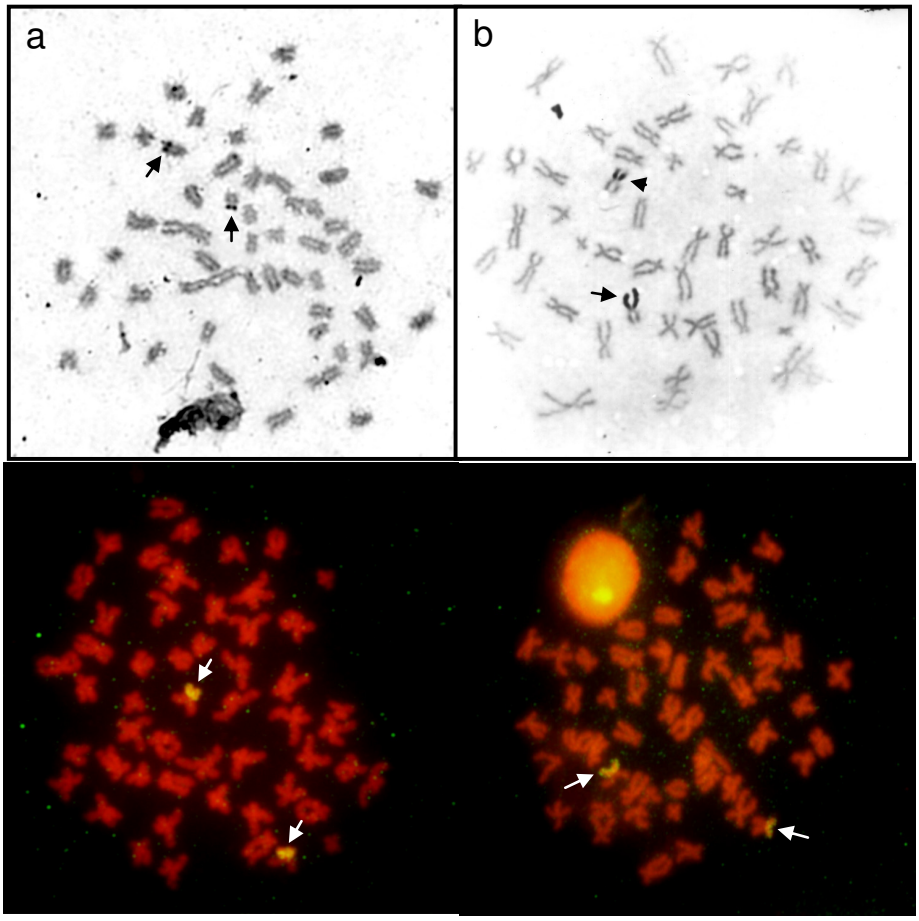


Figura 6 - Metáfases de Serrapinnus notomelas de exemplares Recanto dos Cambarás (bacia do rio Paranapanema. a) as setas indicam cromossomos portadores de NORs simples; b) a seta indica cromossomo portador de NOR,marcando todo o braço e a cabeça de seta indica cromossomo homólogo com marcação intersticial; c e d) setas indicam as regiões marcadas pela presença de sonda DNAr 18S.

Discussão

Os exemplares de *Serrapinnus notomelas* das três bacias hidrográficas amostradas, Paranapanema (Recanto dos Cambarás), São José dos Dourados (Ribeirão Piriquito) e Tietê (Rio Paraitinguinha), apresentaram uma alta conservação cariotípica com relação ao número diplóide e número fundamental (2n= 52 e NF= 100) dos cromossomos (Tabela 1). Essa característica cariotípica sugere que eventos determinantes de rearranjos cromossômicos numéricos como fusão e fissão não devam ter ocorrido nesta espécie (Nirchio e Oliveira, 2006), pelo menos em nível detectável pela metodologia utilizada.

Os exemplares de *S. notomelas* da bacia do Paranapanema apresentaram uma banda intersticial no braço longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos e do par 15 de submetacêntricos, não sendo esta característica observada nos cromossomos das demais populações (Figura 4c, Tabela 2). Para os espécimes da bacia do rio São José dos Dourados foi possível observar marcação intersticial nos cromossomos dos pares 6 e 9 submetacêntricos e marcação pericentromérica no par 14 submetacêntrico, o que não ocorreu nas demais populações (Figura 4a). Os exemplares estudados provenientes da bacia do rio Tietê apresentaram como marcador o par 20 formado por cromossomos submetacêntricos, com marcação em todo o braço curto (Figura 5, b).

Swarça *et al.* (2005) demonstram a ocorrência de diversificação cariotípica entre populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, quando analisaram os padrões de regiões ricas em GC por CMA_3 e DNAr 5S. Encontraram também diferenciação cariotípica numérica e morfológica entre os indivíduos das populações analisadas. No presente trabalho foi evidenciada a mesma tendência para a formação de rearranjos estruturais, porém não numéricos ou morfológicos. Através da técnica de bandamento C foi revelado marcações centroméricas, teloméricas, periteloméricas e intersticiais com divergências entre as populações amostradas (Tabala 2). As divergências encontradas para *S. notomelas* das três populações são consideradas aqui como marcadores populacionais, possibilitando identificar as diferentes

Localidade	2n	NF	metacêntrico	submetacêntrico	subtelocêntrico	acrocêntrico	Ag-NOR
Piriquito	52	100	10	32	06	04	Par 26
Paraitinga	52	100	10	32	06	04	Par 26
Paranapanema	52	100	10	32	06	04	Par 26

Tabela 1 - Representação das localidades amostradas para *Serrapinnus notomelas*, com número diplóide (2n), número fundamental (NF), morfologia cromossômica (meta- submeta- subtelo- e acrocêntrico) e pares portadores de Ag-NOR.

Local	Bandamento C																									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Piriquito	cen	cen, t	cen	cen	cen	cen in q	cen	cen in	cen	pc q	cen	pc q	cen	cen		cen	cen t q	cen	cen	cen	t q	cen t q	cen	cen		h p
Paraitin-guinha	cen	cen	cen	cen	cen	cen	pc,p	pc,q	cen	cen	cen	in, q	cen	cen	cen	cen	cen	cen	pc, p	p		cen	cen	cen	cen	h p
Paraná-panema	cen, in q	cen pc,p	pc,p	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen, t q	cen	in q	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	pc p	cen		cen t	h p

Tabela 2 - Representação das marcações por bandeamento C dos cromossomos de *Serrapinnus notomelas,* capturados em três localidades (rios Piriquito, Paraitinguinha e Paranapanema). **cen**= centromérica; **pc**= pericentromérica; **in**= intersticial; **t**= telomérica; **te**= peritelomérica; **p**= braço curto do cromossomo; **q**= braço longo do cromossomo; **h**= apenas um dos homólogos. De 1 a 26 representação dos pares cromossômicos.

populações de *S. notomelas* analisadas no presente trabalho. A conservação cariotípica em diferentes populações consideradas do mesmo gênero e/ou espécie foi também observada em outros trabalhos citogenéticos comparativos em peixes, conforme relatado por Feldberg *et al*. (1985) em *Crenicichla* e *Geophagus*, por Nakayama, (2006) em *Serrasalmus*, por Almeida-Toledo *et al.* (1987) em *Colossoma macropomum* e *C. mitrei*, por Pauls e Bertollo (1990) e Oliveira *et al.*(2003) para exemplares da família Prochilodontidae, por Pansonato-Alves, (2006) em *Characidium zebra*.

A marcação Ag-NOR intersticial em um dos cromossomos homólogos dos espécimes provenientes do Recanto dos Cambarás (Figura 6b), sugere que possa ter ocorrido rearranjo cromossômico do tipo inversão paracêntrica, conforme sugerido no Ideograma 7. Para espécimes do rio Paraitinguinha analisados, a dupla marcação em um dos cromossomos homólogos do par 26 de cromossomos acrocêntricos sugere possível ocorrência de inversão pericêntrica da região ribossomal (DNAr 45S) deste cromossomo, translocando do braço curto para a posição mais distal no braço longo (Ideograma 7 a,b e Figura 6b). Quando analisada as metáfases de *S. notomelas* do rio Paraitinguinha por impregnação por Nitrato de Prata, 37,5% das metáfases (210/560 metáfases) apresentaram marcação nos dois braços de um dos homólogos portadores das RONs, enquanto nas análises das preparaçoes dos exemplares do Recanto dos Cambarás, a proporção foi de 25% (130/1040) com a RON localizada em um dos homólogos portador da possível inversão paracêntrica.

A região de heterocromatina rica em GC associada às NORs é considerada comum para os peixes (Schmid e Guttenbach, 1988; Sola *et al*, 1992; Maistro, 2000; Molina e Galetti, 2006; Vicari *et al*, 2006) embora nem todas a regiões evidenciadas pela técnica de CMA_3 sejam determinantes da presença das RONs (Gromicho *et al*., 2005). Contudo, para as três populações analisadas houve uma intensa marcação apenas em um dos homólogos (Figura 3) ocorrendo também para as marcações Ag-NORs positivas. Mackenzie e Lubs (1973) sugerem que o bandamento C pode ser

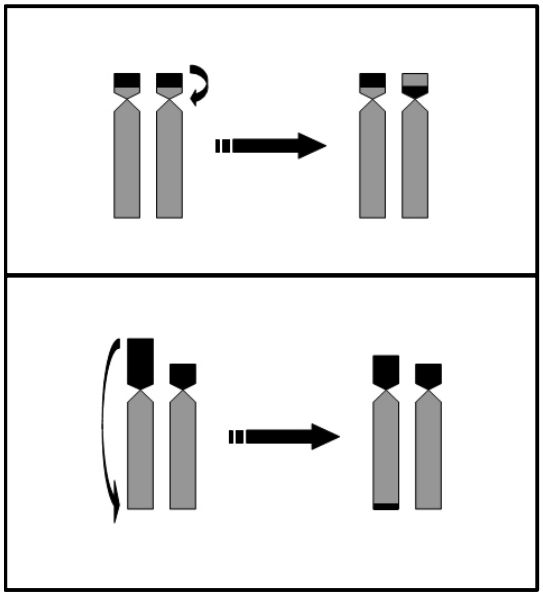


Figura 7 - Idiograma representando possíveis eventos por rearranjo cromossômico envolvendo as regiões de Ag-NORs; a) ocorrência de inversão paracêntrica envolvendo um dos cromossômos homólogos do par 26 de acrocêntricos, observado em espécimes de S. notomelas do Recanto dos Cambarás (rio Paranapanema); b) inversão pericêntrica envolvendo a porção mais distal do braço curto de um dos cromossômos do par 26 de acrocêntricos, observado em espécimes de S. notomelas do rio Paraitinguinha (rio Tietê).

influenciado pela quantidade de proteínas associadas a esta região, de forma que a fixação do material pelo ácido acético possibilitaria a retirada de tais proteínas da estrutura do material genético desta região. Esta hipótese parece ser suportada pelo fato de que não foi encontrada a condição homozigota para o caráter em questão.

A sonda de DNAr 18S mapeada no braço curto do par 26 de cromossomos acrocêntricos confirmou as marcações identificadas pela aplicação da técnica Ag-NOR para as três populações (Figuras 4, 5 e 6).

Contudo, a condição de localização da marcação em região pericentromérica identificada para os espécimes do Recanto dos Cambarás não foi confirmada pela marcação com a sonda de DNAr 18S, ocorrendo apenas fraca marcação de todo o braço curto dos cromossomos do par 26. Esta condição, segundo Dobigny *et al.*(2002) e Gromicho *et al.* (2005), poderia ser explicada pelo fato de que proteínas

associadas ao complexo transcricional poderem estar ativas ou não na interfase precedente do ciclo celular, proporcionando marcações diferenciadas entre os cromossomos homólogos. Com a utilização da marcação por sonda de DNAr 18S, os exemplares do rio Paraitinguinha que apresentaram a RONs apenas no braço curto do par 26 de cromossomos acrocêntricos, apresentaram também marcações em ambos os cromossomos do par 26 na região do braço curto, sendo esta condição comum a todos indivíduos analisados (Figura 5 c e d). Quanto à marcação em apenas um dos homólogos em ambos os braços cromossômicos, a aplicação da técnica por FISH com sonda DNAr 18S, confirmou com a descrição feita através da impregnação pelo nitrato de Prata, de marcação em ambos os braços de um dos homólogos do par 26 de cromossomos acrocêntricos, além da marcação normal do seu homólogo (Figura 7 c e d), com a marcação identificada somente ao longo do braço curto. Tal observação parece indicar que a ativação das duas regiões teloméricas do cromossomo em questão, parece ser suficiente para o funcionamento das atividades organizacionais nucleolares envolvidas com esta região, não havendo necessidade da ativação de seu homólogo (Dobigny *et al.*, 2002; Mais *et al.* 2004).

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a especiação cromossômica pode iniciar-se sob aspectos de rearranjos estruturais não determinantes das alterações numéricas ou morfológicas dos cariótipos, como translocações balanceadas, duplicações, inversões e deleções, uma vez que a espécie analisada presente em três diferentes bacias hidrográficas pode ser diferenciada com a aplicação da metodologia clássica de citogenética.

Referências

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo SA, Bernardino G, Ferrari W and Alcantara RCG (1987) Cytogentic Studies of Colossoma mitrei, Colossoma Macropomum and their Interspecific hybrid. Proc. World Symp. On Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux. 189-195.

Alves JCP. (2006) Dissertação: Estudos citogenéticos em espécies de Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) e ocorrência de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais / Botucatu : [s.n.],97 f. –0071152

Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes Evolution - *Genetica* 127:277–284.

Christine Mais, Jane E. Wright, José-Luis Prieto, Samantha L. Raggett and Brian McStay (2005) UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes & Development* 19:50–64.

Diniz D e Bertollo LAC (2006) Intra- and inter-individual chromosome variation in Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces, Erythrinidae). A population from the Brazilian São Francisco river basin - *Genetics and Molecular Biology*, 29, 3, 453-458.

Dobigny G, Ozouf-Castaz C, Bonillo C and Volobouev V (2002) “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenet Genome Res* 98: 75-77.

Feldberg E, and Bertollo LAC (1985) Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38: 257-268.

Fernades FM, Albert JS, DanielSilva MFZ, Lopes CE, Craptom WGR and Almeida-Toledo LF (2005) A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) fromthe Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa* 933: 1–14.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 3, 464-468

Ferro DAM, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis Genetica* 119: 147–153.

Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M and Rossi R (2003) Chromosomal mapping of 18S–28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome* 46: 473–477.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49 (810-813).

Gromicho M, Ozouf-Costaz C and Collares-Pereira MJ (2005) Lack of correspondence between CMA3-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. *Cytogenet Genome Res* 109:507–511.

Howell, WM and Black, DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti Jr PM & M. Schmid (1997) Cytogenetics of the genus Leporinus (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chromosome Research* 1997, 5, 12–22.

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

Lowe-McConnell RH (1999) Parte IV – Respostas dos peixes às condições em águas tropicais - *in:* Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. Editora da Universidade de São Paulo – 243-268.

Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) *Genetics and Molecular Biology, 23, 2, 365-369.*

Makenzie WH and Lubs HA (1973) An Analysis of the technical variables in the production of C bands. *Chromosoma* (Berl.) 41: 175-182.

Malabarba LR 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). En Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Malabarba LR, RE Reis, RP Vari, ZM Lucena & CAS Lucena (Eds). Porto Alegre, Edipucrs, pp. 193-233.

Martins,C and Galetti Jr,PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in Schizodon (Pisces, Anostomidae) chromosomes. Chromosome Res 8: (4) 353-355.

Nakayama CM, Porto JIR and Feldberg E (2006) A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin *Genetica* 114: 231–236.

Nirchio M and C Oliveira. 2006. Citogenética de peces, 216 pp. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S.(2003) Karyotypic characterization of Prochilodus mariae, Semaprochilodus kneri and S. laticeps (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. Neotropical Ichthyology, Porto Alegre, RS, v. 1, n. 1, p. 47-52.

Pauls E and Bertollo LAC (1990) Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 81 (2): 1171-123.

Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2934–2938 (1986).

Schmid M and Guttenbach, M (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma 97*: 101-114.

Sola L, Rossi AR, Iaselli V, Rasch EM and Monaco PJ (1992). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of Poecilia. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in Poecilia mexicana mexicana by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining. *Cytogenet. Cell Genet*. 60: 229-235.

Sumner, AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res*. 75: 304-306.

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM and Dias AL (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish p*seudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 16, No. 4, pp. 325-330.

Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O and Artoni RF (2006) Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae) *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 621-625.

Wasko AP, Cesar ACG, Martins C and Galetti Jr PM (2001) A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. *Chromosoem Science* 5: 145-148.

Capítulo II: Evidências de Especiação Cromossômica em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontinae) de Três Localidades do Rio Tietê

Capítulo II

Evidências de Especiação Cromossômica em *Serrapinnus notomelas* (Characidae: Cheirodontinae) de Três Localidades do Rio Tietê

Resumo

O gênero Serrapinnus é ainda pouco descrito citogeneticamente, apresentando número diplóide de 2n= 52 cromossomos. Nesta espécie ainda não há descrição de estudos cariotípicos aplicando técnicas de bandamentos cromossômicos que poderiam auxiliar no entendimento da estrutura cromossômica deste grupo. No presente trabalho foram investigadas três populações de *Serrapinnus notomelas* pertencentes à bacia do rio Tietê e os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n= 52 cromossomos, com variação morfológica para as três localidades (rio Tietê, rio Capivara e córrego Campo Novo). A técnica de bandamento C foi empregada com o objetivo de mapear regiões de heterocromatina constitutiva ricas em GC, possibilitando uma diferenciação entre as populações analisadas. A técnica de impregnação pela prata, identificou as regiões Ag-NORs ativas, que se apresentaram simples para os exemplares do rio Tietê e múltiplas para os exemplares do rio Capivara e córrego Campo Novo. Quando empregada à técnica de FISH, buscando localizar sítios de DNAr 18S, verificou-se que os dados foram congruentes com as Ag-NORs do rio Tietê e córrego Campo Novo. Os resultados do presente trabalham são indicadores de como poderia ocorrer a diferenciação cromossômica em indivíduos da mesma espécie quando isolados. Há uma tendência para a ocorrência primária de alterações estruturais não-numéricas, indicando que eventos como inversões, deleções e duplicações de segmentos cromossômicos e translocações devam ser os primeiros eventos a ocorrer, porém conservando o número diplóide dos indivíduos.

Introdução

A subfamília Cheirodontinae compreende um grupo de peixes de ampla distribuição na América do Sul. Está subdividida em duas tribos, Cheirodontini e Compusurini, sendo que o gênero *Serrapinnus*, pertencente à tribo Cheirodontini, foi identificado com base em caracteres relacionados ao dimorfísmo sexual secundário observado nos raios procorrentes ventrais da nadadeira caudal e raios da nadadeira anal dos machos (Malabarba *et al*, 1998). Esta tribo inclui os gêneros *Cheirodon* com seis espécies, *Spintherobolus* com quatro espécies, *Nanocheirodon* uma espécie, *Heterocheirodon* uma espécie, *Serrapinnus* sete espécies, um novo gênero além de um characideo fóssil, † *Megacheirodon unicus*.

Os dados citogenéticos para os representantes deste grupo são escassos, sendo caracterizados apenas pelo número diplóide de espécimes deste grupo com 2n=52 cromossomos (Oliveira, *et* al. 1988, Nishiyama e Santos, 1995 e Wasko *et al*, 2001). Como as regiões organizadoras de nucléolos podem constituir excelentes marcadores citogenéticos em peixes (e.g. Galetti *et al*. 1984), estas têm sido comumente detectadas em várias espécies utilizando coloração com nitrato de Prata (Ag-NOR), mitramicina (MM) ou cromomicina A_3 (CMA_3) (Amemiya & Gold 1986; Phillips *et al*. 1989; Galetti & Rasch 1993; Sola *et al*. 1997). A coloração com nitrato de Prata tem sido a técnica mais utilizada em estudos de localização das regiões organizadoras de nucléolos, embora esta detecte somente RONs transcricionalmente ativas (Goodpasture and Bloom 1975; Hofgatner *et al*. 1979; Howell & Black 1980; Roussel *et al*, 1996; Zurita *et* al, 1998; Paintner-Marques *et al*, 2002; Gromicho *et al*, 2004). Com o objetivo de caracterizar citogeneticamente espécimes da Tribo Cheirodontini, foram amostrados quatro pontos de coleta, compreendendo localidades da região do Alto Tietê (Rio Tietê/ Salesópolis) e do Médio Tietê (Botucatu, Rio Capivara/ Botucatu e Córrego Campo Novo/ Bauru).

Material e Métodos

Foram coletados 73 exemplares de *Serrapinnus notomelas* em três diferentes localidades que compõe a bacia do alto rio Paraná, sendo 26 exemplares (14 fêmeas e 12 machos) provenientes do rio Tietê (Salesópolis-SP), 22 exemplares (10 fêmeas e 12 machos) provenientes do rio Capivara (Botucatu-SP) e 28 exemplares (17 fêmeas e 11 machos) provenientes do córrego Campo Novo (Bauru-SP) (Figura 01). As preparações cromossômicas foram obtidas de acordo com Foresti (1993), o padrão de heterocromatina constitutiva de acordo com a metodologia proposta por Sumner (1972) e as regiões organizadoras de nucléolos, foram evidenciadas através da impregnação pela prata Ag-NORs por Howel and Black (1980). A técnica de hibridação "in situ" fluorescente (FISH) foi aplicada de acordo com Pinkel *et al*. (1986), com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001). As seqüências de DNAr 18S com cerca de 1800 pares de bases foram extraídas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Martins *et al*., 2000) clonadas em p-GEMT e marcadas por "nick translation" com biotina-14-dATP, de acordo com as instruções do fabricante (Kit Bionick™ Labelling System - Invitrogen). As seqüências de DNAr 18S foram localizadas nos cromossomos por Avidina-N-fluorescente Isotilcianato (FITC) conjugado, sendo o sinal foi amplificado com adição de Anti-avidina biotinilada, seguindo-se uma segunda de Avidina-FITC. Os cromossomos foram contracorados com Iodeto de Propídio (50 µg/ml) diluído em Antifade. Os cromossomos metafásicos foram capturados utilizando microscópio óptico Olympus BX-62, software de captura Image-Pro MC v 6.0 e processadas em Adobe Photoshop v 7.0. A classificação dos cromossomos foi obtida a partir de medida cromossômica proposta por Levan *et al*. (1964).

Resultados

Serrapinnus notomelas - população do rio Tietê (Salesópolis-SP)

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n=52 cromossomos sendo 7 pares metacêntricos, 15 pares submetacêntricos, 2 pares

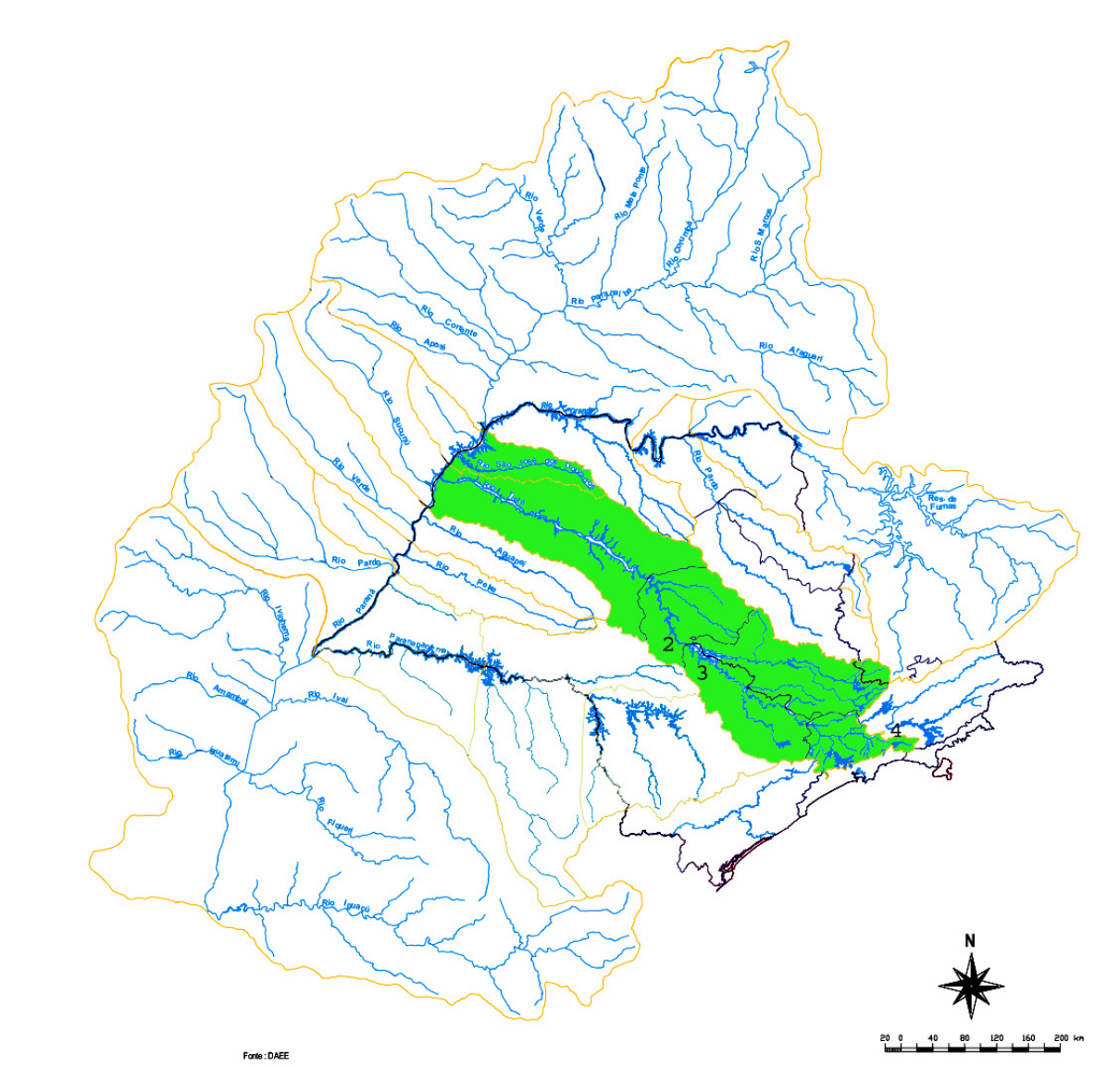


Figura 1 - Mapa da sub-bacia hidrográfica do Rio Paraná indicando os locais amostrados pertencentes a bacia do rio Tietê, pertencente ao estado de São Paulo/SP. Os números indicam os locais amostrados; em 2) córrego Campo Novo; em 3) rio Capivara; e em 4) Rio Paraitinguinha.

subtelocêntricos e 2 pares acrocêntricos, com número fundamental de NF= 100 (Figura 3a). O bandamento C evidenciou marcações centroméricas em todos os cromossomos e uma marcação intersticial nos cromossomos submetacêntricos do par 17 (Figura 3b). As marcações das regiões Ag-NORs apresentaram-se de forma simples, sendo identificada no braço curto dos cromossomos acrocêntricos do par 26 (Figura 4a). A hibridação "in situ" fluorescente com sonda para o DNAr 18S identificou as regiões ribossomais presentes no par 26 formado por de cromossomos acrocêntricos (Figura 4b).

Serrapinnus notomelas **- população do rio Capivara (Botucatu-SP)**

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n=52 cromossomos 5 pares metacêntricos, 15 pares submetacêntricos, 4 pares subtelocêntricos e 2 pares acrocêntricos, com número fundamental NF= 100 (Figura 5a). O bandamento C evidenciou marcações centroméricas em todos os cromossomos, marcações pericentroméricas no braço curto dos pares 7 e 19 de cromossomos submetacêntricos, fracas marcações pericentroméricas no braço longo dos pares 8 e 9 de cromossomos submetacêntricos e marcações intersticiais no braço longo dos pares 14 e 16 de cromossomos submetacêntricos (Figura 5b). As marcações das regiões Ag-NORs apresentaram-se de forma múltipla, sendo marcado um dos homólogos dos pares 11 em posição peritelomérica no braço longo, no braço curto dos cromossomos dos pares 23 e 26 (Figura 6a). A hibridação "in situ" fluorescente com a sonda DNAr 18S identificou regiões ribossomais presentes apenas no braço curto dos cromossomos acrocêntricos do par 26 (Figura 6b).

Serrapinnus notomelas **- população do córrego Campo Novo (Bauru-SP)**

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 2n=52 cromossomos, porém com três diferentes citótipos. No citótipo I foi possível identificar; 12 cromossomos metacêntricos, 34 cromossomos submetacêntricos, 4

cromossomos subtelocêntricos e 2 cromossomos acrocêntricos (Figura 7a) com número fundamental NF= 102; o citótipo II apresentou 12 cromossomos metacêntricos, 33 cromossomos submetacêntricos, 4 cromossomos subtelocêntricos e 3 cromossomos acrocêntricos (Figura 7b) e número fundamental NF= 101; o citótipo III apresentou 12 cromossomos metacêntricos, 32 cromossomos submetacêntricos, 4 cromossomos subtelocêntricos e 4 cromossomos acrocêntricos (Figura 7c) e número fundamental NF= 100. Para o citótipo I a técnica de bandamento C revelou marcações centroméricas para todos os cromossomos, marcações pericentroméricas para os pares 2, 3 e 19 localizados no braço curto, além de marcações intersticiais para os pares 7, 10, 12, 14 e 17 localizadas no braço longo e marcações peritelomérica (Figura 8a). As marcações das regiões Ag-NORs apresentaram-se de forma múltipla para 26% dos indivíduos analisados e simples para os 64% restantes. Quando múltipla, foi identificada em um dos homólogos dos pares 2 (braço curto em posição peritolérica), 23 e 26 (no braço longo em posição peritelomérica), e presente também nos pares 7, 22 (braço curto), esta observada somente para indivíduos dos citótipos II e III (Figura 9b). Quando simples, a marcação pode ser observada apenas nos cromossomos do par 22 (braço curto), para todos os indivíduos dos citótipos I (Figura 9a). A hibridação “in situ” fluorescente com sonda para DNAr 18S, identificou as regiões ribossomais simples e múltiplas correspondentes às marcações Ag-NOR positivas (Figura 9c e d).

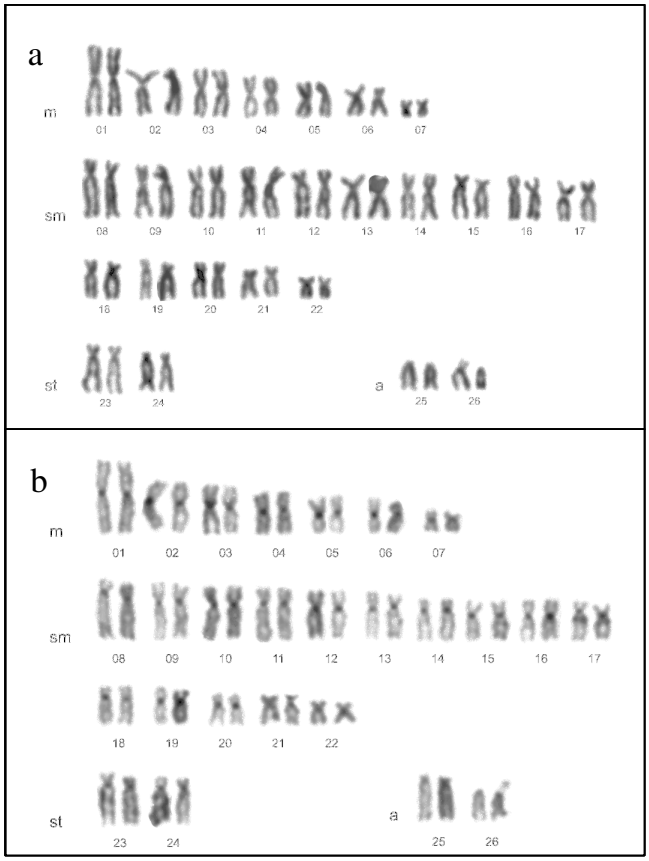


Figura 3 - a)Cariótipo de *Serrapinnus notomelas,* exemplares do rio Tietê, apresentando 2n=52 cromossomos com 7 pares metacêntricos, 15 pares submetacêntricos, 2 pares subtelocêntricos e 2 pares acrocêntricos; b) Cariótipo de *S. notomelas*, com os cromossomos submetidos à técnica de bandeamento C.

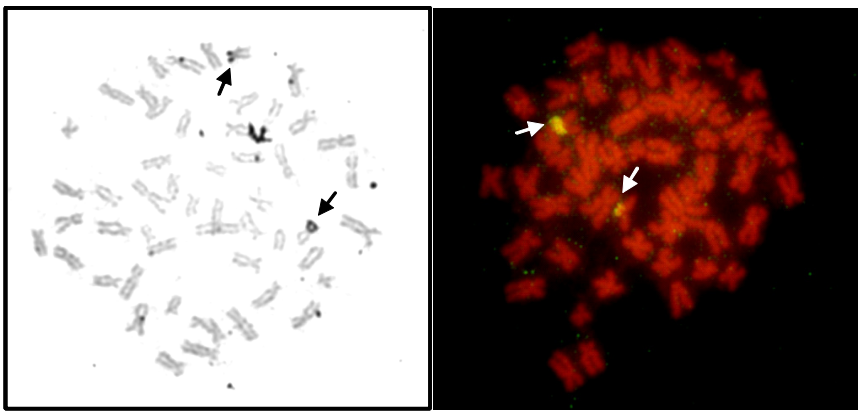


Figura 4 - Cromossomos metafásicos de S. notomelas do rio Tietê a) setas indicam as regiões Ag-NORs positivas; b)setas indicam cromossomos portadores de regiões DNAr 18S, obtidas pela técnica de FISH.

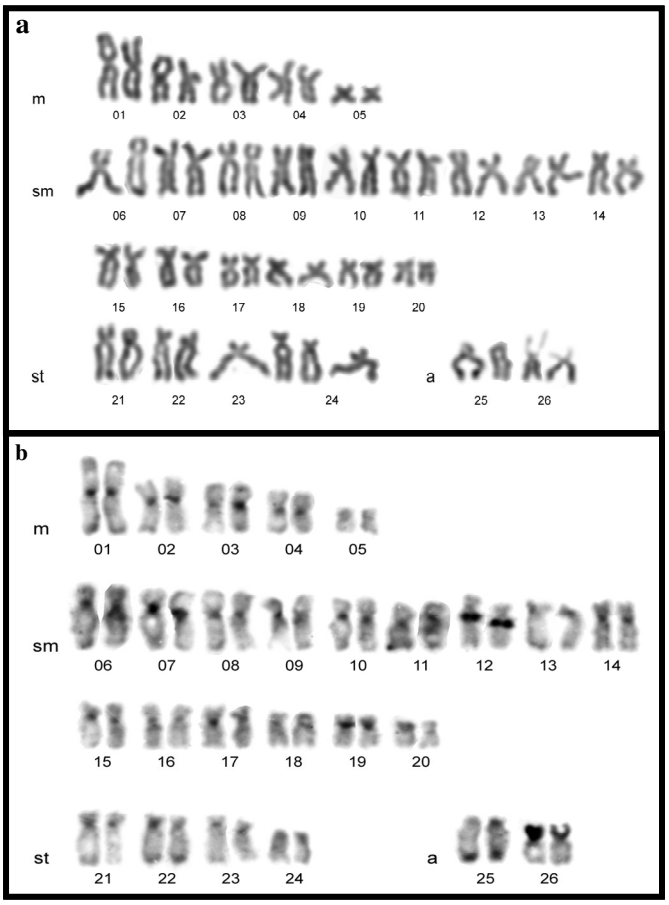


Figura 5 - Análise dos cromossomos de *Serrapinnus notomelas* do rio Capivara, 2n=52 cromossomos a) cariótipo utilizando coloração com giemsa; b) cariótipo com os cromossomos submetidos a técnica de bandeamento C.

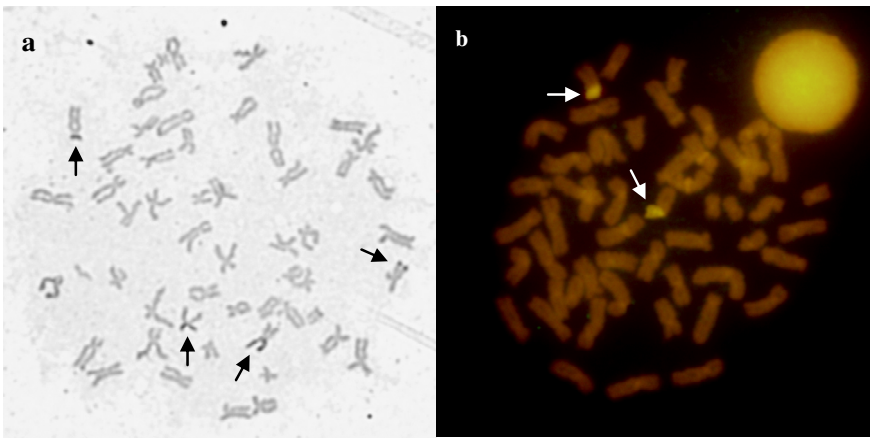


Figura 6 - Cromossomos metafásicos de exemplares de *S. notomelas* do rio Capivara.) As setas indicam as regiões Ag-NORs positivas em (a) e os cromossomos portadores de regiões DNAr 18S, identificadas pela técnica de FISH em (b).

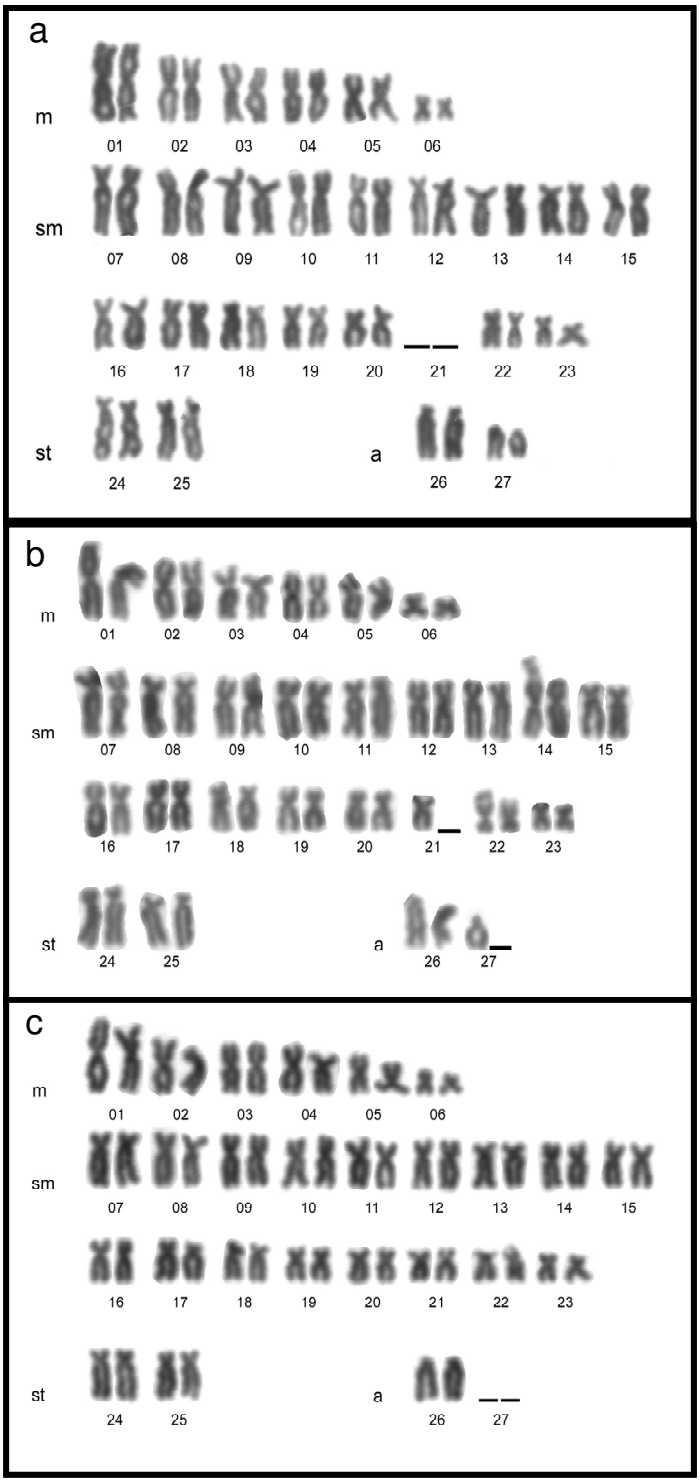


Figura 7 - Cariótipos de *Serrapinnus notomelas,* exemplares do córrego Campo Novo. a) citótipo I com 2n=52 cromossomos; b) citótipo II com 2n= 52 cromossomos; c) citótipo III com 2n=52

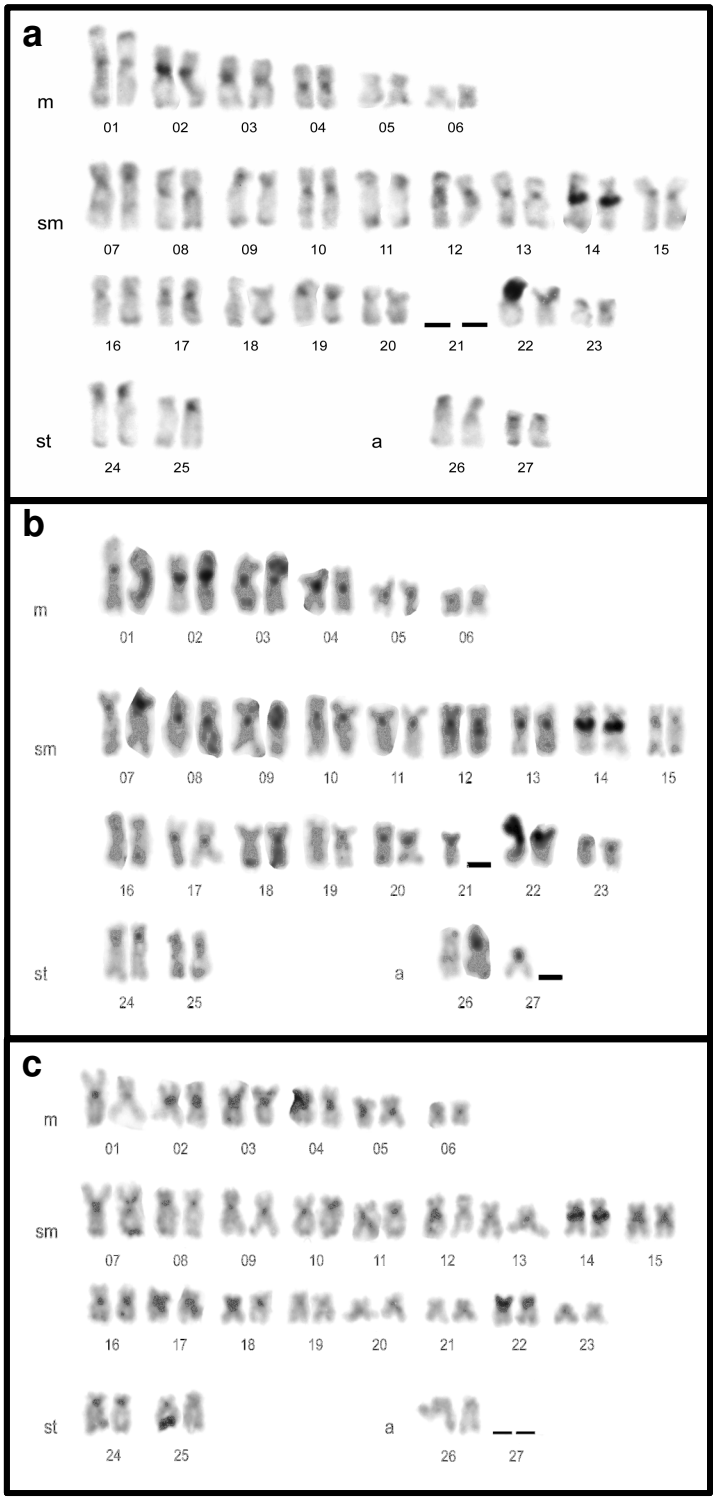


Figura 8 - Cariótipos de *Serrapinnus notomelas* de exemplares do córrego Campo Novo, obtidos após tratamento por bandeamento C para identificação das regiões de heterocromatina constitutiva. a) citótipo I com 2n=52 cromossômos; b) citótipo II com 2n= 52 cromossômos; c) citótipo III com 2n=52 cromossômos.

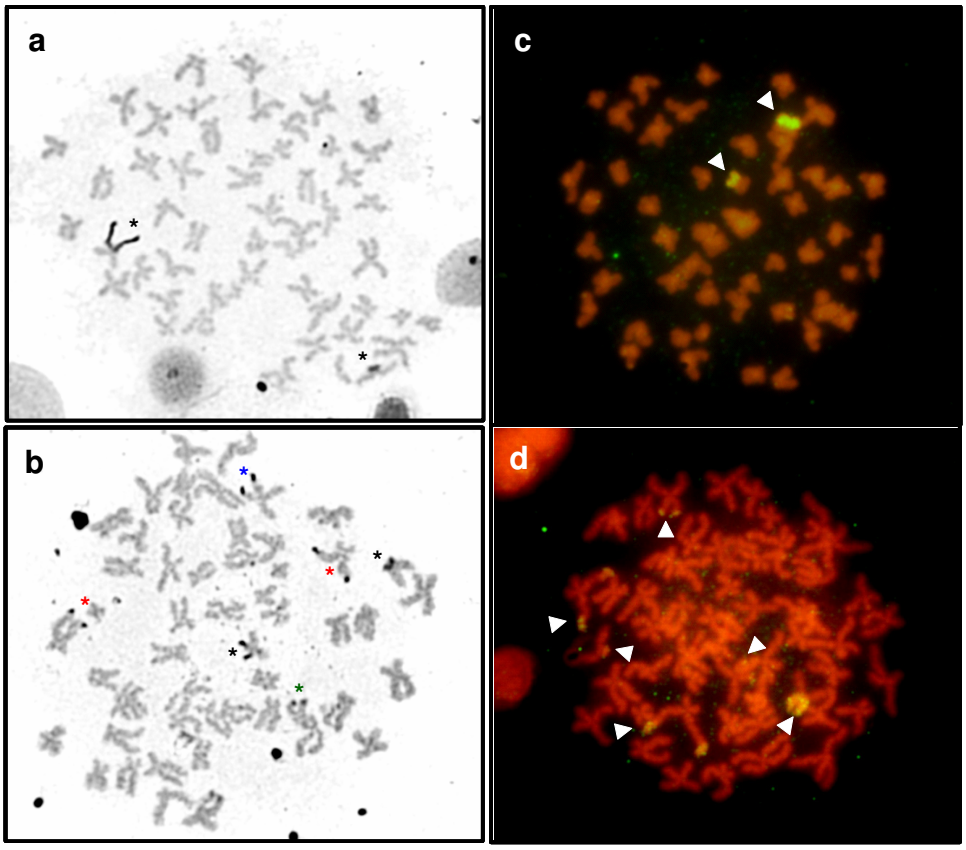


Figura 9 - Metáfases de *Serrapinnus notomelas,* exemplares do córrego Campo Novo a) citótipo I, setas indicam Ag-NOR simples presente no par 22; b) citótipos II e III, asteriscos representam cromossomos portadores de Ag-NORs (azul = cromossomo par 02, verde= cromossomo par 25, vermelho = cromossomos par 07, preto= cromossomos par 22); c) cromossomos submetidos a FISH por sonda DNAr 18s, cabeças de setas indicam cromossomos portadores, par 22; d) cromossomos submetidos a FISH por sonda DNAr 18s, cabeças de setas indicam cromossomos portadores (cromossomos 02 e 25 – pares 07 e 22).

Discussão

Os exemplares de *Serrapinnus notomelas* das três localidades amostradas componentes do complexo da parte leste da bacia superior do rio Paraná, no estado de São Paulo, apresentaram uma grande divergência cariotípica quando foram relacionadas às estruturas cariotípicas obtidas através de bandamentos cromossômicos (Tabela 2). Apesar das três populações (Rios Tietê, Capivara e Córrego Campo Novo) apresentarem o mesmo número diplóide de 2n=52 cromossomos, a morfologia dos cromossomos nos cariótipos, bem como as variações encontradas com relação ao o número fundamental indicam que eventos de rearranjos cromossômicos estruturais devam ter ocorrido (Tabela 1).

Pelas análises citogenéticas realizadas nos indivíduos do citótipo destas populações pode-se supor que eventos como inversões pericêntricas, translocações entre pares cromossômicos não homólogos, deleções e duplicações podem estar levando à alterações na forma dos cromossomos sem, contudo alterar o número diplóide. Netas populações ocorreram alterações no número de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, sem alterar o número diplóide (2n=52 cromossomos) (Tabela 1). Esta hipótese é ainda reforçada pelo fato de que o número de cromossomos acrocêntricos não foi alterado entre os exemplares dos rios Tietê, Capivara e córrego Campo Novo, citótipo I (Figuras 3a, 5a e 7a), mantendo assim o número fundamental (NF=100) (Tabela 1). Os exemplares desta localidade demonstram ter maior relação cromossômica com as demais populações analisadas do que os citótipos II e III. Eventos de rearranjos cromossômicos em peixes também foram observados por Maistro *et al.* (2000) em *Astyanax scabrippinis*; por Molina e Galetti (2002) em peixes recifais do gênero *Chromis*, por Bertollo *et al.* (2004) em *Erythrinus erythrinus*; por Fernandes e Martins-Santos (2004) em *Astyanax altiparanae* e por Fernandes *et al.* (2005) em espécies do gênero *Gymnotus*, demonstrando que estes eventos são de certa forma freqüentes ocorrendo em diferentes espécies e não restritos a um grupo.

Localidade	2n	NF	metacêntrico	submetacêntrico	subtelocêntrico	acrocêntrico	Ag-NOR
Tietê	52	100	14	30	04	04	Par 26
Capivara	52	100	10	30	08	04	Par 26
Campo Novo Citótipo I	52	100	12	32	04	04	Par 22
Citótipo II	52	101	12	33	04	03	Par 22
Citótipo III	52	102	12	34	04	02	múltipla

Tabela 1 - Representação das localidades amostradas para *Serrapinnus notomelas*, com número diplóide (2n), número fundamental (NF), morfologia cromossômica (meta- submeta- subtelo- e acrocêntrico) e pares portadores de Ag-NOR.

Local	Bandamento C																										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Tietê	cen	cen	pc, p	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen, in, p	cen	cen	cen	-	cen	cen	cen	cen	cen	-
Capivara	cen	cen	cen, pc	cen	-	cen	pc,p	pc,q	pc, q	cen	cen	in, q	cen	cen	cen	cen in q	cen	cen	pc, p	cen	cen	cen te,q	cen	cen	cen te,q	p	-
Campo Novo Citótipo I	cen, te,p	pc,p	pc,p	cen	-	-	cen, in,q	cen	cen, te,q	cen, in,q	cen te,q	pc, q	cen	in,q	cen	cen	cen ,pc, q	-	cen	-	x	p	cen	cen	cen	cen	cen ,te, q

Tabela 2 - Representação das marcações por bandeamento C dos cromossomos de *Serrapinnus notomelas,* capturados em três localidades (rios Tietê e Capivara e córrego Campo Novo)cen= centromérica; pc= pericentromérica; in= intersticial; te= peritelomérica; p= braço curto do cromossomo; q= braço longo do cromossomo; h= apenas um dos homólogos; x= par de cromossomos não presente. De 1 a 27 representação dos pares cromossômicos.

Córrego Campo Novo	Bandamento C																										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Citótipo I	cen, te,p	pc,p	pc,p	cen	-	-	cen, in,q	cen	cen, te,q	cen, in,q	cen te,q	pc, q	cen	in,q	cen	cen	cen, pc,q	-	cen	-	x	p	cen	cen	cen	cen	cen, te, q
Citótipo II	cen	pc,p	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen	cen, in,q	cen	Cen , in,q	cen	in, q	cen , te,q	te, q	cen	-	cen , in,q	cen	h,p	p	cen	cen	cen , te,q	cen	h, cen
Citótipo III	cen	pc,p	cen	cen	cen	cen	cen, te,q	cen	cen	cen	cen	cen	cen in,q	in,q	pc, q	cen	cen	cen	cen	-	-	p	-	cen	h,te ,q	-	x

Tabela 3 - Representação das marcações por bandeamento C dos cromossomos de *Serrapinnus notomelas* portadores dos citótipos I, II e III capturados do córrego Campo Novo. cen= centromérica; pc= pericentromérica; in= intersticial; te= peritelomérica; p= braço curto do cromossomo; q= braço longo do cromossomo; h= apenas um dos homólogos; x= par de cromossomos não presente. De 1 a 27 representação dos pares cromossômicos.

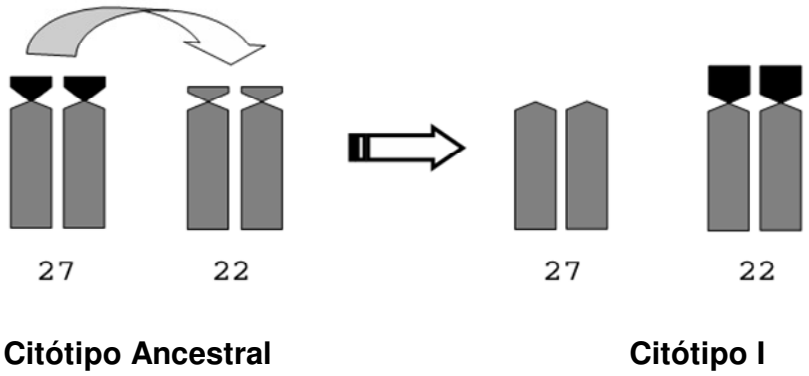
A utilização da técnica de bandamento C permitiu observar que a marcação intersticial identificada nos cromossomos do par 17 da população analisada do rio Tietê (Figura 3b) é semelhante à dos pares 12 do rio Capivara (Figura 5b) e 14 do córrego Campo Novo, citótipo I (Figura 8a), indicando uma possível origem comum. O mesmo ocorre para a marcação pericentromérica existente no par 3 das três populações analisadas (Figuras 3b, 5b e 8a) e também para os pares portadores de Ag-NOR, par 26 nos exemplares dos rios Tietê (Figura 4a) e Capivara (Figura 6a) e par 22 do córrego Campo Novo, citótipo I (Figura 09b). Estes eventos e outras marcações independentes identificadas nos cromossomos do exemplares das populações analisadas sugerem que possam ter ocorrido eventos de heterocromatinização, inversões paracêntricas e translocações, que seriam então iniciadores do processo de especiação (Tabela 02). A ocorrência de eventos similares foi descrita por Swarça *et al.* (2005) em *Pseudoplatystoma corruscan* e por Almeida-Toledo *et al.*(1987) em *Colossoma mitrei* e *Colossoma macropomun*.

Os cromossomos portadores de Ag-NOR demonstraram certa estabilidade quando foram comparados exemplares provenientes das populações dos rios Tietê e Capivara (Figuras 4a e 6a, respectivamente), mostrando marcação consistente no par 26. Porém, o bandamento C revelou que a região rica em GC associada à NOR estava presente somente na população do rio Capivara, demonstrando a possível ocorrência de evento de heterocromatinização desta região (Figura 05b). O mesmo ocorreu para os exemplares analisados do córrego Campo Novo, onde o bandamento C foi positivo para a posição da NOR identificado no par 22 (Figura 8a).

Segundo Gromicho e Colares-Pereira (2004) as regiões Ag-NORs podem estar envolvidas em eventos de hibridação entre espécies diferentes, originado uma nova espécie. De modo similar, o presente trabalho demonstra que há eventos simultâneos de dispersão de regiões ribossomais 45S e de inversões pericêntricas, quando analisados os citótipos encontrados na amostra da população do córrego Campo Novo. Nesta localidade, os exemplares coletados apresentaram três citótipos, indicando que rearranjos cromossômicos estruturais não-númericos devem

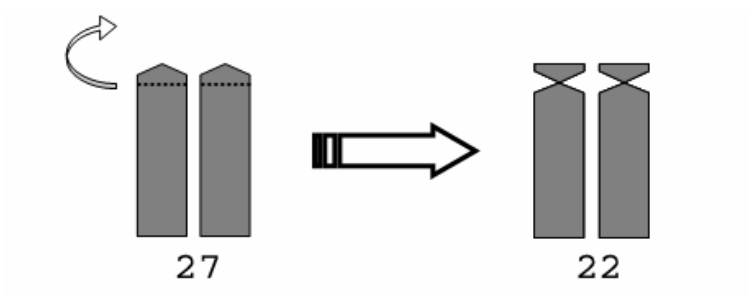
ter ocorrido (Figuras 7 a, b e c), uma vez que o número diplóide encontrado permaneceu constante com 2n= 52 cromossomos; porém, o número fundamental variou de NF=100, 101 e 102, para os citótipo I, II e III, respectivamente (Figuras 7 a,b e c), sendo o citótipo I o mais freqüente. As regiões Ag-NORs estiveram presentes no par 22 para os três citótipos (Figura 9a e b), sendo estas posições confirmadas pela aplicação da técnica de FISH com sonda DNAr 18S (Figura 9 c e d). Além do par 22, os citótipos II e III apresentaram também marcações em outros cromossomos, caracterizando-se como NORs múltiplas.

De acordo com o padrão de regiões Ag-NORs obtidas das populações do rio Tietê e Capivara, o par cromossômico 27 do citótipo I pode ter se originado a partir de um ancestral comum a estas populações. Assim, o evento mais provável seria translocação da região ribossomal 45S do segundo par de cromossomos acrocêntricos do citótipo I (reconhecido como par 26 para as populações do rio Tietê e Capivara), para o par 22 de cromossomos submetacêntricos, dando origem ao citótipo I atual (Ideograma 1). Esta instabilidade das regiões de DNAr 18S levando à alta variabilidade de posições e tamanhos destes segmentos cromossômicos, pode ser explicada pelo fato de que essa regiões poderiam segregar independentemente e randomicamente, proporcionando variabilidade intra- e interespecífica, segundo Gromicho *et al*. (2006).



Ideograma 1 - Representação do possível evento de rearranjo cromossômico ocorrido a partir de um citótipo ancestral comum aos exemplares da bacia do rio Tietê. Ocorrência de inversão pericêntrica envolvendo as regiões Ag-NORs positivas par 27 e braço curto par 22, originando o citótipo I.

Considerando-se como primeira hipótese, pela qual a origem do citótipo II a partir do citótipo I, poderia ter ocorrido a partir de possível inversão pericêntrica em apenas um dos cromossomos do par 27 (Ideograma 2), deve-se imaginar a necessidade de ocorrência de interações envolvendo indivíduos portadores destes dois citótipos de forma a originar mais tarde o citótipo III. O mesmo poderia ter ocorrido entre indivíduos do citótipo I e III, de forma a originar mais tarde o citótipo II. Porém, quando analisada a região portadora de DNA ribossomal, tanto por impregnação pela Prata quanto por FISH com sonda DNAr 18S (Figura 9), pode-se especular que a origem mais parcimoniosa seria através da combinação dos citótipos I e III. Esta origem pode ter se dado por eventos de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica, ocorreria no par cromossômico 27 do citótipo I, para formar o par 21 do citótipo III (Ideograma 2). Assim, exemplares portadores do citótipo III poderiam interagir com indivíduos portadores do citótipo I, originado os indivíduos portadores do citótipo II, já que este apresenta-se com apenas um cromossomos dos pares 21 e 27 e também com múltiplas marcações Ag-NORs e DNAr com sonda 18S (Figura 8).



Ideograma 2 - Representação do possível evento de inversão pericêntrica, envolvendo os cromossômos do par 27, originando os cromossomos submetacêntricos do par 22.

As regiões GC ricas identificadas pelo bandamento C na região de DNAr 18S confirmaram a diferença estrutural entre os três citótipos (Figura 8 a, b e c). Os

resultados obtidos por bandamento C reforçam a idéia deste evento, pois algumas marcações encontradas nos citótipos parentais I e III, podem ser observadas no citótipo II (Tabela 2). Marcações como as identificadas nos cromossomos 10, 23 e 26 do citótipo I, foram reconhecidas no citótipo II, porém não identificadas nos para exemplares pertencentes ao citótipo III. Da mesma forma ocorre para os cromossomos 1, 3, 9 e 17 do citótipo III, onde as marcações estão presentes no citótipo II e ausentes no citótipo I (Tabela 2).

O presente trabalho demonstrou que os estudos citogenéticos populacionais são fundamentais para a compreensão do processo de evolução cromossômica das espécies de peixes, dos mecanismos que regem esta evolução, quais se manifestam primeiro. São importantes também para estabelecer quais os níveis de alterações são suficientes para bloquear o fluxo gênico entre indivíduos identificados como pertencentes à mesma espécie e presentes na mesma população, de forma a estabelecer se estes grupos constituem espécies diferentes ou não. Por fim os dados citogenéticos sugerem que os exemplares analisados do córrego Campo Novo, possuem polimorfísmo estrutural populacional, onde o citótipo II provavelmente não tenha fluxo gênico em relação aos citótipos I e III. Dessa forma, indivíduos pertencentes aos citótipo II talvez sejam formados unicamente pela hibridação dos citótipos I e III.

Referências

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo SA, Bernardino G, Ferrari W and Alcantara RCG (1987) Cytogentic Studies of *Colossoma mitrei*, *Colossoma Macropomum* and their Interspecific hybrid. Proc. World Symp. On Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux. 189-195.

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

Goodpasture, C. and Bloom, S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma 53*: 37-50.

Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão JN and Fenocchio AS (2004) Chromosome evolution in the Erythrinid fish,Erythrinus erythrinus (Teleostei: Characiformes) *Heredity* (2004) 93, 228–233.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 3, 464-468

Fernades FM, Albert JS, DanielSilva MFZ, Lopes CE, Craptom WGR and Almeida-Toledo LF (2005) A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) fromthe Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa* 933: 1–14.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49 (810-813).

Galetti Jr., P.M. and Rasch, E.M. (1993). Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A_3 (Teleostei, Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters 4*: 269-277.

Bloom SE and Goodpasture C (1976) An Improved Technique for Selective Silver Stainingof Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes. Hum. Genet. 34, 199—206

Gromicho M and Collares-Pereira MJ (2004) Polymorphism of major ribosomal gene chromosomal sites (NOR-phenotypes) in the hybridogenetic fish Squalius alburnoides complex (Cyprinidae) assessed through crossing experiments *Genetica* 122: 291–302.

Gromicho M, Coutanceau JP, Ozouf-Costaz C and Collares-Pereira MJ (2006) Contrast between extensive variation of 28S rDNA and stability of 5S rDNA and telomeric repeats in the diploid-polyploid Squalius alburnoides complex and in its maternal ancestor Squalius pyrenaicus (Teleostei, Cyprinidae) *Chromosome Research* (2006) 14:297–306.

Hofgatner, F.J., Krone, W. and Jain, K. (1979). Correlated inhibition of ribosomal RNA synthesis and silver staining actinomycin D. *Hum. Genet. 47*: 329-333.

Howell, WM and Black, DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

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

Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) *Genetics and Molecular Biology, 23, 2, 365-369.*

Malabarba LR 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). En Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Malabarba LR, RE Reis, RP Vari, ZM Lucena & CAS Lucena (Eds). Porto Alegre, Edipucrs, pp. 193-233.

Martins,C and Galetti Jr,PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in Schizodon (Pisces, Anostomidae) chromosomes. Chromosome Res 8: (4) 353-355.

Martins C, Galetti JR (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes. Genetica (The Hague), v. 111, p. 439-446

Molina WF and Galetti Jr PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol* 25:373-377.

Nakayama CM, Porto JIR and Feldberg E (2006) A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin *Genetica* 114: 231–236.

Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S (2003) Karyotypic characterization of Prochilodus mariae, Semaprochilodus kneri and S. laticeps (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. Neotropical Ichthyology, Porto Alegre, RS, v. 1, n. 1, p. 47-52.

Paintner-Marques TR, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2002) Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae) *Hereditas* 137: 107–112

Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2934–2938.

Philips RB, Pleyte KA and Ihssen PE, (1989). Patterns of chromosomal nucleolar organizer regions (NOR) variation in fishes of the genus Salvelinus. *Copeia* 1: 47–53.

Roussel, P., Andre, P., Comai, L. and Hernández-Verdún, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell Biol.* 133, 235-246.

Sola, L., Galetti Jr., P.M., Monaco, P.J. and Rasch, E.M. (1997). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. VI. Additional nucleolus organizer region of *Poecilia formosa* (Amazon molly) from Texas, with a survey of chromosomal clones detected in Amazon molly. *Heredity 78*: 612-619.

Sumner, AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res*. 75: 304-306.

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM and Dias AL (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish p*seudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 16, No. 4, pp. 325-330.

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

Wasko AP, Cesar ACG, Martins C and Galetti Jr PM (2001) A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. *Chromosoem Science* 5: 145-148.

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recentemente Malabarba (1998) descreveu o gênero *Serrapinnus* como novo para os peixes da sub-família Cheirodontinae, propondo sete espécies a princípio. Com os dados do presente trabalho pode-se observar a alta plasticidade cariotípica para a espécie *S. notomelas*, demonstrando que a sistemática morfológica a citogenética populacional, bem como outros instrumentos de estudos populacionais devem ter um limiar mais estreito para que se possa ampliar o entendimento da distribuição, biologia e evolução deste grupo de peixes.

O presente trabalho demonstrou ainda que estudos citogenéticos populacionais como os apresentados por Almeida-Toledo *et al*. (1987) e Swarça *et al.* (2005), podem ser considerados ferramentas relevantes quando se analisa diferentes grupos populacionais de peixes. Tais estudos possibilitam a caracterização de grupos distintos a nível cromossômico presentes ou não na mesma bacia hidrográfica, de tal forma a auxiliar na identificação de grupos que possivelmente não mais possuam fluxo gênico, sem que, contudo devam ser caracterizados como novas espécies. Estes aspectos foram discutidos no Capítulo I, que descreve as modificações cromossômicas observadas nos exemplares analisados das diferentes populações sem que, contudo tivesse sido encontrado um mecanismo suficientemente forte de modificação estrutural que fosse determinante para a identificação de distintas populações presentes no mesmo ambiente.

Contudo, o estudo de indivíduos de diferentes populações do rio Tietê (Capítulo II) permitiu estabelecer diferenças entre os cariótipos, indicando a possibilidade de início de um processo de diversificação mais acentuado, com o aparecimento de três citótipos bem diferenciados nos exemplares coletados no córrego Campo Novo. Na análise dos exemplares desta população, pode-se observar a existência de polimorfísmo cromossômico populacional a partir das regiões mapeadas por sonda de DNAr 18S, Ag-NORs e bandamento C, onde aparentemente ocorre hibridação entre os exemplares portadores dos citótipos I e III,

originando exemplares portadores do citótipo II. Contudo, exemplares portadores do citótipo II aparentemente não interagem com exemplares portadores dos citótipos I e III, indicando talvez que se tratem de duas espécies (citótipo I e citótipo III), já que não foram encontrados indivíduos portadores de citótipos híbridos entre os citótipos I e III com o citótipo II.

Uma consideração que também poderia ser discutida refere-se aos eventos cromossômicos necessários que levariam à formação de novas espécies. O presente trabalho demonstra que há uma tendência primeira para a ocorrência de alterações na macro-estrutura cromossômica das diferentes populações de bacias hidrográficas distintas (Capítulo I), mas sem ocorrência de alterações numéricas. Porém, quando analisados os exemplares pertencentes à mesma bacia hidrográfica (Capítulo II) observa-se que a alteração ocorreu tanto na macro-estrutura cariotípica quanto na micro-estrutura dos cromossômos. Entende-se que a pressão seletiva nos exemplares de diferentes bacias deve ter sido menor e diferenciada, pois as alterações cariotípicas foram mais sutis quando comparadas àquelas ocorridas nos exemplares de uma da mesma bacia hidrográfica.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

Abuín M, Clably C, Martínez, P (1996) A NOR-associated repetitive element present in the genome of two Salmo species (Salmo salar and Salmo trutta). Genome 39: 671-679.

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo SA, Bernardino G, Ferrari W and Alcantara RCG (1987) Cytogentic Studies of Colossoma mitrei, Colossoma Macropomum and their Interspecific hybrid. Proc. World Symp. On Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux. 189-195.

Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonilho C, Porto-Foresti F, and Daniel-Silva MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of Astyanax (Pisces, Characidae) . Animal Cytogenetics and Comprative Mapping. Vol: 97, 229-233.

Almeida-Toledo LF, Foresti F and Toledo-Filho SA (2000) Karyotipic evolution in Neotropical freshwater fish – Chromosoma Today – vol. 13: 169-182

Alves JCP. (2006) Dissertação: Estudos citogenéticos em espécies de Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) e ocorrência de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais / Botucatu : [s.n.],97 f. –0071152

Amemiya CT and Gold JR (1986). Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. Copeia 1986: 226-231.

Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes Evolution - Genetica 127:277–284.

Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão JN and Fenocchio AS (2004) Chromosome evolution in the Erythrinid fish,Erythrinus erythrinus (Teleostei: Characiformes) Heredity (2004) 93, 228–233.

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

Bloom SE and Goodpasture C (1976) An Improved Technique for Selective Silver Stainingof Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes. Hum. Genet. 34, 199—206

Cestari A N (1973) Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. IN: Azevedo, T.L. de e Costas, S.O.P. da org. Exercícios Práticos de Genética, 29-31. Compahia Editora Nacional – Editora da Universidade de São Paulo, SP.

Mais C, Wright JE, Prieto JL, Raggett SL and McStay B (2005) UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. Genes & Development 19:50–64.

Diniz D and Bertollo LAC (2006) Intra- and inter-individual chromosome variation in Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces, Erythrinidae). A population from the Brazilian São Francisco river basin - Genetics and Molecular Biology, 29, 3, 453-458.

Dobigny G, Ozouf-Castaz C, Bonillo C and Volobouev V (2002) “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. Cytogenet Genome Res 98: 75-77.

Egozcue J (1971). Técnicas em Citogenética. Editorial Espaxs, Barcelona, pp. 144

Feldberg E, and Bertollo LAC (1985) Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). Caryologia 38: 257-268.

Fernades FM, Albert JS, DanielSilva MFZ, Lopes CE, Craptom WGR and Almeida-Toledo LF (2005) A new Gymnotus (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) fromthe Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. Zootaxa 933: 1–14.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. Genetics and Molecular Biology, 29, 3, 464-468

Ferro DAM, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, Astyanax scabripinnis. Genetica 119: 147–153.

Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau, L, Bonillo, C, Weissenbach, J and Bernot, A 2000. Karyotype and chromosomal localization of characteristic tandem repeats in the pufferfish Tetraodon nigroviridis. Cytogenet. Cell Genet. 88: 50-55

Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M and Rossi R (2003) Chromosomal mapping of 18S–28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. Genome 46: 473–477.

Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo Filho AS, (1989). Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characteryzation and multiple nucleolus organizer regions in Moenkhausia sanctaefilomenae (Pisces, Characidae). Genetica 79: 107–114.

Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo SA (1981) – Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogen. Cell Genet. 31: 137-144.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. Experientia 49 (810-813).

Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F and Yoshida MC, (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. Chromosome Res. 6: 463-471.

Galetti Jr PM and Rasch EM (1993). Chromosome studies in Poecilia latipunctata with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei, Poeciliidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters 4: 269-277.

Galetti Jr PM, Foresti F, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (1984). Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. Caryologia 37: 401-406.

Goodpasture C and Bloom SE (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53: 37-50.

Gornung E, Gabrielli I, Cataudella S and Sola L (1997). CMA3-banding pattern and fluorescence in situ hybridization with 18S rDNA genes in zebrafish chromosomes. Chrom. Res. 5: 40-46.

Gromicho M and Collares-Pereira MJ (2004) Polymorphism of major ribosomal gene chromosomal sites (NOR-phenotypes) in the hybridogenetic fish Squalius alburnoides complex (Cyprinidae) assessed through crossing experiments. Genetica 122: 291–302.

Gromicho M, Coutanceau JP, Ozouf-Costaz C and Collares-Pereira MJ (2006) Contrast between extensive variation of 28S rDNA and stability of 5S rDNA and telomeric repeats in the diploid-polyploid Squalius alburnoides complex and in its maternal ancestor Squalius pyrenaicus (Teleostei, Cyprinidae) Chromosome Research (2006) 14:297–306.

Gromicho M, Ozouf-Costaz C and Collares-Pereira MJ (2005) Lack of correspondence between CMA3-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. Cytogenet Genome Res 109:507–511.

Hofgatner FJ, Krone W and Jain K (1979). Correlated inhibition of ribosomal RNA synthesis and silver staining actinomycin D. Hum. Genet. 47: 329-333.

Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.

Kligerman e Bloom (1976) Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (Umbra limi) after in vivo exposure to 5-bromodeoxyuridine. Chromossoma – 56: 101-109

Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti Jr PM & M. Schmid (1997) Cytogenetics of the genus Leporinus (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. Chromosome Research 1997, 5, 12–22 .

Levan A, Fredga K and Sandberg AA, (1964). Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201–220.

Long EO and David ID (1980). Repeated genes in eukaryotes. Annu. Rev. Biochem. 49: 727-764.

Lowe-McConnell RH (1999) Parte IV – Respostas dos peixes às condições em águas tropicais - in: Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. Editora da Universidade de São Paulo – 243-268.

Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of Astyanax scabripinnis (Characiformes, Characidae). Genetics and Molecular Biology, 23, 2, 365-369.

Makenzie WH and Lubs HA (1973) An Analysis of the technical variables in the production of C bands. Chromosoma (Berl.) 41: 175-182.

Malabarba LR 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). En Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Malabarba LR, RE Reis, RP Vari, ZM Lucena & CAS Lucena (Eds). Porto Alegre, Edipucrs, pp. 193-233.

Martínez JC, Morán P, Garcia-Vázquez E and Pendás A.M. (1996). Chromosomal localization of the major and 5S rDNA genes in the European eel (Anguilla anguilla). Cytogenet. Cell Genet. 73: 149-152

Martins C and Galetti JR PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes. Genetica (The Hague), v. 111, p. 439-446

Martins C and GalettiI Jr PM (1997) . Narrow chromosome diversity in fishes of the genus Schizodon Anostomidae, Characiformes. Cytobios, Grã-Bretanha, v. 92, p. 139-147.

Martins C and Galetti Jr PM (1998). Karyotype similarity between two sympatric Schizodon fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. Genet. Mol. Biol. 21: 355-360.

Martins C and Galetti Jr PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in Schizodon (Pisces, Anostomidae) chromosomes. Chromosome Res 8: (4) 353-355.

Mayr B, Rab P and Kalat M (1985). Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Perca fluviatilis (Pisces, Percidae). Genetica 67: 51-56.

Mcphail JD and Jones, RL (1966) A simple technique for obtaining chromosome from teleost fish. J. Fish Res. Bd. Canad. 23:767-769.

Molina WF and Galetti Jr PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish Chromis (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. Genet Mol Biol 25:373-377.

Morán P, Martinez JL, Garcia-Vázquez E, and Pendas AM 1996. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Cytogenet. Cell Genet. 75: 145–150.

Nakayama CM, Porto JIR and Feldberg E (2006) A comparative cytogenetic study of five piranha species (Serrasalmus, Serrasalminae) from the Amazon basin. Genetica 114: 231–236.

Nirchio M and C Oliveira. 2006. Citogenética de peces, 216 pp. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S (2003) Karyotypic characterization of Prochilodus mariae, Semaprochilodus kneri and S. laticeps (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. Neotropical Ichthyology, Porto Alegre, RS, v. 1, n. 1, p. 47-52.

Paintner-Marques TR, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2002) Multiple NORs in Bryconamericus aff. exodon (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae) Hereditas 137: 107–112

Pauls E and Bertollo LAC (1990) Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus Prochilodus (Pisces, Prochilodontidae). Genetica 81 (2): 1171-123.

Pendás AM, Morán P and Garcia-Vázquez G (1993b). Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. Chrom. Res. 1: 63-67.

Pendás AM, Morán P and Garcia-Vázquez G (1993a). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. Cytogenet. Cell Genet. 63: 128-130.

Phillips R, Pleyte KA and Hartley SE (1988). Stock-specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in artic char (Salvelinus alpinus). Cytogenet. Cell Genet. 48: 9-12.

Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83, 2934–2938.

Roussel P, Andre P, Comai L and Hernández-Verdún D (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. J. Cell Biol. 133, 235-246.

Sajdak SL, Reed KM, Phillips RB (1998) Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. J Mol Evol 46: 680±688.

Schmid M and Guttenbach, M (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. Chromosoma 97: 101-114.

Sola L, Rossi AR, Iaselli V, Rasch EM and Monaco PJ (1992). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of Poecilia. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in Poecilia mexicana mexicana by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining. Cytogenet. Cell Genet. 60: 229-235.

Sola, L., Galetti Jr., P.M., Monaco, P.J. and Rasch, E.M. (1997). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of Poecilia. VI. Additional nucleolus organizer region of Poecilia formosa (Amazon molly) from Texas, with a survey of chromosomal clones detected in Amazon molly. Heredity 78: 612-619.

Sumner, AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM and Dias AL (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish pseudoplatystoma corruscans (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. Ichthyol. Explor. Freshwaters, Vol. 16, No. 4, pp. 325-330.

Vazzoler, AEAM (1996) Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática, Maringá – EDUEM – São Paulo – SBI

Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O and Artoni RF (2006) Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae) Genetics and Molecular Biology, 29, 4, 621-625.

Viñas, A, Gómez, C, Martínez, P and Sánchez, L (1996). Localization of rDNA genes in European eel (Anguilla anguilla) by FISH. Genome 39: 1220-1223.

Wasko AP and Galetti Jr. PM, (1999). Extensive NOR variability in fishes of the genus Bryconamericus (Characidae). Cytologia 64: 63–67.

Wasko AP, Cesar ACG, Martins C and Galetti Jr PM (2001) A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. Chromosoem Science 5: 145-148.

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