

GISELLE XAVIER PERAZZO

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CICHLIDAE
(PERCIFORMES, PISCES) DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

Orientação: Prof^a Dr^a Marta Margarete Cestari

Co-orientação: Prof Dr Marcelo Ricardo Vicari

CURITIBA

2010

Espaço reservado para o termo de aprovação.

Aos pilares da minha vida,

Gilnei, Vera e Giovanni

"... Sirvam nossas façanhas de modelo a toda Terra..."

Francisco Pinto da Fontoura

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Marta Margarete Cestari por ter aceitado me orientar e por sua colaboração durante o mestrado. Agradeço também ao meu co-orientador Professor Doutor Marcelo Ricardo Vicari pelas muitas sugestões no meu trabalho, além da amizade.

Agradeço muito aos meus pais e irmão, pela confiança em mim depositada. O apoio e incentivo em meus estudos foram fundamentais para que pudéssemos suportar a distância física entre Curitiba e Rio Grande. E nesse período em que passamos afastados o aperto no peito a cada despedida ou telefonema, puderam comprovar que somos uma família unida e que sempre estaremos ligados por esse sentimento que nos uni, não importando a distância que nos separa! Amo vocês! E muito obrigada pela ajuda nas coletas! Atravessar o Rio Grande do Sul atrás de ciclídeos foi mais fácil e agradável com uma equipe de coleta como vocês!

Aos meus mais que colegas de laboratório, verdadeiros amigos com os quais pude contar sempre, o meu profundo agradecimento (incluindo os agregados do laboratório!). Sentirei uma enorme saudade de vocês e guardarei com muito carinho os momentos que vocês me proporcionaram, o ombro amigo nos momentos de saudade da terra natal, os passeios, as festas, os bares, as viagens, as coletas, enfim... Com toda certeza consegui superar as dificuldades que encontrei durante esse período porque sempre tive pessoas muito especiais ao meu lado. Muito obrigada gurizada!

Agradeço algumas pessoas que colaboraram de alguma forma com este trabalho, como ao Dr. Vinícius Abilhoa, do Museu de História Natural Capão da Imbuia, ao Dr. Luiz Malabarba e ao Ms Fernando Carvalho, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela identificação e tombamento dos peixes analisados nesse trabalho. Também agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande pelo empréstimo do espaço físico e dos equipamentos deste laboratório, além da colaboração em algumas coletas. Em especial aos Professores Dr. Cléber Palma Silva, Dr. Guassenir Born e Dra. Adriana Gava e a Ms. Patrícia Machado.

Agradeço a UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade de realização do mestrado, bem como à CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CAPÍTULO I	
Estudos cromossômicos em <i>Crenicichla lepidota</i> e <i>Australoheros facetus</i> (Cichlidae, Perciformes, Pisces) do extremo sul do Brasil.....	29
CAPÍTULO II	
Diversidade cariotípica em <i>Geophagus brasiliensis</i> Quoy & Gaimard, 1824 (Cichlidae, Perciformes) do sul do Brasil.....	45
CAPÍTULO III	
Polimorfismo de cromossomo B em <i>Crenicichla lepidota</i> Heckel, 1840 (Cichlidae, Perciformes) ..	69
CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS.....	99
MATERIAL E MÉTODOS	
Material Biológico	99
Coletas	101
Descrição dos Locais de Coleta	103
Procedimentos Citogenéticos.....	107
Obtenção de Metáfases Mitóticas - Tratamento “ <i>in vivo</i> ”	107
Coloração Cromossômica Convencional – Giemsa	108
Coloração com Nitrato de Prata – Ag-RONs	108
Banda C: Detecção da Heterocromatina Constitutiva	109
Hibridação fluorescente in situ (FISH) com sondas DNAr 18S e 5S.....	110
Dupla coloração com DAPI/CMA ₃	113

Estudos Cariotípicos	113
Identificação Cromossômica.....	114
LICENÇA PARA COLETAS (IBAMA).....	115
CERTIFICADO DO COMITÊ EM ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	116
QUEBRAS CROMOSSÔMICAS EM <i>CRENICICHLA LEPIDOTA</i>	117

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Distribuição mundial de Cichlidae.....	20
---	----

CAPÍTULO I

Figura 1. Cariótipos de <i>Australoheros facetus</i> e de <i>Crenicichla lepidota</i>	43
Figura 2. Destaque do primeiro par de <i>Crenicichla lepidota</i> e do segundo par de <i>Australoheros facetus</i> sob diferentes tratamentos: banda C, AgRON, FISH 18S e DAPI/CMA ₃	44
Figura 3. Cariótipo de <i>Crenicichla lepidota</i> , após procedimento de FISH com sonda de rDNA 5S.....	44

CAPÍTULO II

Figura 1. Locais de coleta.....	63
Figura 2. Citótipos I, II e III de <i>Geophagus brasiliensis</i>	64
Figura 3. Citótipos I após bandamento C.....	65
Figura 4. Citótipos II após bandamento C.....	66
Figura 5. Citótipos III após bandamento C.....	67
Figura 6. Pares cromossômicos portadores da RON marcados pela impregnação pelo nitrato de prata e pela FISH com sondas 18S e os portadores do gene ribossômico 5S marcados pela FISH com sonda de rDNA 5S nas diferentes populações analisadas.....	68

CAPÍTULO III

Figura 1. Frequência de cromossomos Bs em <i>Crenicichla lepidota</i>	79
Figura 2. Citótipos de <i>Crenicichla lepidota</i> com $2n=48$, $2n=48+2B$, $2n=48+3B$ e $2n=48+4B$	80
Figura 3. Destaque do primeiro par metacêntrico de <i>Crenicichla lepidota</i> após coloração com Giemsa, bandamento C, AgRON, dupla-coloração CMA ₃ /DAPI e FISH 18S.....	81
Figura 4. Metáfases após bandamento C indicando bandas heterocromáticas em alguns pares cromossômicos (setas).....	81

ANEXO

Figura 1. Exemplos de <i>Geophagus brasiliensis</i> , <i>Crenicichla lepidota</i> e <i>Australoheros facetus</i>	99
Figura 2. Mapa hidrográfico da região Sul do Brasil, com os locais de coleta.....	101
Figura 3. Locais de coleta.....	106
Figura 4. Metáfases de <i>Crenicichla lepidota</i> com quebras cromossômicas.....	118

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela I. Número de espécimes analisados nos dois diferentes pontos de amostragem.....	42
---	----

CAPÍTULO II

Tabela I. Frequências dos citótipos I, II e III e suas respectivas porcentagens do total amostrado.....	62
--	----

ANEXO

Tabela I. Número de exemplares coletados nos diferentes pontos de amostragem.....	111
--	-----

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar citogeneticamente peixes da família Cichlidae da região Sul do Brasil. Foram coletados espécimes do lago Polegar, arroios do Arraial (Rio Grande, RS), canal São Gonçalo (Arroio Grande, RS), lagoa do Peixe (Mostardas, RS), lagoa dos Quadros (Capão da Canoa, RS) e Parque Ecológico Costa (Curitiba, PR), sendo amostradas as espécies *Geophagus brasiliensis*, *Crenicichla lepidota* e *Australoheros facetus*. Todos os 55 exemplares amostrados apresentaram 48 cromossomos, variando, contudo, a fórmula cariotípica entre as espécies e no caso de *G. brasiliensis* também houve variação intra e interpopulacional. Três citótipos diferentes foram observados nessa espécie de acordo com a presença de um, dois ou três pares de cromossomos submetacêntricos. Além disso, foi observada uma variação na localização da RON entre as populações, bem como na posição do gene ribossômico rDNA 5S. As análises da heterocromatina apresentaram diferentes padrões de localização das bandas C entre os citótipos e entre as populações analisadas. São apresentados novos dados para *C. lepidota*, além da primeira descrição citogenética para *A. facetus*, provenientes do Sul do Brasil, apresentando NF=56 e 70, respectivamente. Em ambas, o bandamento C evidenciou marcações principalmente pericentroméricas, com um bloco heterocromático no primeiro par de *C. lepidota*. As colorações com AgRON, FISH 18S e DAPI/CMA₃ evidenciaram um único sítio no segundo par cromossômico de *A. facetus* e no primeiro de *C. lepidota*, coincidente com a constrição secundária no primeiro par desta espécie. Em *C. lepidota*, a FISH 5S evidenciou dois sítios intersticiais, nos pares 11 e 21. Quebras cromossômicas foram observadas em *C. lepidota* provenientes do canal São Gonçalo, sendo esse uma importante

fonte de água para abastecimento da região sul do Estado do Rio Grande do Sul. Ainda para a espécie *C. lepidota*, a caracterização citogenética para a população do litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, evidenciou a presença de $2n=48$ cromossomos com a presença de 0 a 4 cromossomos supranumerários. Possivelmente, estes cromossomos B têm origem recente por não-disjunção a partir de elementos do complemento A provavelmente decorrente da presença de agentes mutagênicos presentes na lagoa dos Quadros. A presença de 48 cromossomos nas três espécies analisadas corrobora com a característica considerada ancestral para a família Cichlidae. Contudo, a variação na morfologia cromossômica tanto inter como intraespecificamente, indica que rearranjos cromossomos não-Robertsonianos, como as inversões pericêntricas, foram o principal evento de diferenciação cromossômica durante o processo evolutivo desses ciclídeos. A variação observada na espécie *G. brasiliensis* corrobora com a hipótese proposta por outros pesquisadores, podendo este ser um complexo de espécies ou que espécies crípticas possam estar envolvidas nesse grupo.

PALAVRAS-CHAVE: citogenética - ciclídeos – sul do Brasil

ABSTRACT

The aim of this work was analyze cytogenetically Cichlidae fishes from the Southern region of the Brazil. Specimens were collected from Polegar Lake, Arroios do Arraial (Rio Grande, Rio Grande do Sul State), Canal São Gonçalo (Arroio Grande, Rio Grande do Sul State), Lagoa do Peixe (Mostardas, Rio Grande do Sul State), Lagoa dos Quadros (Capão da Canoa, Rio Grande do Sul State) and Parque Ecológico Costa (Curitiba, Paraná State), The sample corresponded to 55 animals from three cichlid species: *Geophagus brasiliensis*, *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus*. All specimens showed 48 chromosomes, but presenting variation in the karyotypic formula between the species, and in the case of *G. brasiliensis* a variation intra and interpopulacional was also observed. In the last one three different cytotypes were found according to the presence of one, two or three pairs of submetacentric chromosomes. Moreover, was observed a variation in the localization of the NOR between the populations, as well as in position of the 5S rDNA cluster. The analysis of the heterochromatin showed different patterns of the localizations of the C bands between the cytotypes and between the populations analyzed. New dates are presented to *C. lepidota*, beyond the first cytogenetic description to *A. facetus* from Southern Brazil, showing FN=56 and 70, respectively. In both, the C banding reveled preferentially pericentromeric bands, with a heterochromatic block in the first pair of the *C. lepidota*. The AgNOR staining, FISH 18S and DAPI/CMA₃ evidenced only sites in the second chromosomal pair of the *A. facetus* and in the first pair of the *C. lepidota*, coincident with the second constriction in the first pair of this specie. In *C. lepidota*, the 5S FISH evidenced two interstitials sites, in the pairs 11 and 21. Chromosomal break has observed in *C. lepidota* from Canal São Gonçalo, fact that indicate pollution in this aquatic environment. Still for the *C. lepidota*, the cytogenetic characterization

of the population from the North coast of the Rio Grande do Sul State, Brazil, showed the presence of $2n=48$ chromosomes and with the presence of the 0 to 4 supernumerary chromosomes. Possibility, these B chromosomes have a recent origin by non-disjunction from elements of the A complement, probably due to the presence of the mutagenic agents presents in the Lagoa dos Quadros. The presence of the 48 chromosomes in the three species analyzed represent the ancestral characteristic for the Cichlidae family. However, the chromosomal morphology variations inter and intraespecific, indicates that chromosomal rearrangements non-Robertsonians, like pericentrics inversions, had the main event of the chromosomal differentiation during the evolutive process in cichlid fishes. The variation observed in the *G. brasiliensis* corroborates with the hypothesis proposed for others researchers, like a complex of the species or criptic species can be involved in this group.

KEY-WORDS: Cytogenetic – Cichlidae – Southern Brazil

INTRODUÇÃO GERAL

Diversidade biológica, ou biodiversidade, significa a variedade de organismos vivos de todas as origens, incluindo, entre outros, os ecossistemas terrestre, marinho e outros sistemas aquáticos e o complexo ecológico dos quais eles fazem parte; isso inclui a diversidade dentro de espécies, entre espécies e do ecossistema (MAGURRAN, 2004). Assim, a diversidade é construída por três elementos chave: a diversidade genética, a de organismos/espécies e a ecológica. A primeira engloba os componentes da composição genética que estruturam os organismos (nucleotídeos, genes, cromossomos) e a variação genética dentro de uma população e entre populações (GASTON e SPICER, 2004), sendo o estudo sobre os cromossomos o objetivo deste trabalho.

As investigações sobre diversidade biológica são de grande importância, pois contribuem com dados relevantes para a manutenção da biodiversidade, a qual tem como principais objetivos, além de outros, o uso potencial ou presente de elementos naturais como recursos biológicos, a manutenção da biosfera em um estado suportável para a espécie humana e a manutenção da diversidade biológica por questões éticas, uma vez que a nossa espécie não tem o direito de levar outras espécies à extinção (GROOMBRIDGE, 1992; FRANKHAN et al., 2008).

O aumento do conhecimento acerca da diversidade, principalmente dos vertebrados, foi um dos produtos da expansão e das explorações européias que tiveram início nos séculos XV e XVI (POUGH et al., 1999). Hoje, muitos estudos se concentram nas aproximadamente

55.000 espécies de vertebrados atualmente reconhecidas, as quais habitam praticamente todas as partes da Terra. E no ambiente aquático a forma que alcançou maior sucesso adaptativo foram os peixes (POUGH et al., 1999; NELSON, 2006).

De toda a quantidade de água do nosso planeta (70% de sua superfície), a maior parte corresponde às águas oceânicas, povoados em toda a sua extensão por vertebrados, especialmente os peixes ósseos. A água doce, presente em rios, lagoas e lagos, embora retenha uma porcentagem ínfima de toda a água da Terra (apenas 0,01%), apresenta uma riqueza biológica extraordinária (POUGH et al., 1999; MILLER e HARLEY, 2006).

O número atual de espécies válidas de peixes é de 27.977, divididas em 515 famílias, o que representa mais da metade de todas as espécies de vertebrados vivos no mundo. Esse número pode ser projetado para algo perto de, conservativamente, 32.500 espécies. A riqueza da biodiversidade observada nos ambientes de água doce pode ser refletida pelo número de espécies que o habitam: 12.457 (Nelson, 2006). Analisando esses dados em um âmbito mais específico, verifica-se que aproximadamente 25% de todas as espécies de vertebrados correspondem a peixes de água doce, ambiente este que possui 0,01% da água mundial (STIASSNY e RAMINOSOA apud VARI e MALABARBA, 1998).

Diante dessa enorme biodiversidade, uma maneira de compreender melhor a diversidade de peixes de água doce é dividir o planeta em regiões zoogeográficas, como propôs Alfred Russel Wallace, em 1876 – regiões essas reconhecidas até hoje. São elas: Neoártica, Neotropical, Peleoártica, Africana (ou Etiópica), Oriental e Australiana, definidas

de acordo com seus limites e suas faunas características (HELFMAN et al., 2009). A região mais rica em número de espécies é a Neotropical, cuja extensão compreende desde o Deserto de Sonora (na fronteira do México e dos Estados Unidos) até o limite sul da América do Sul (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Possui uma ictiofauna com 4.475 espécies válidas de peixes de água doce, com uma estimativa de haverem mais 1.550 espécies por serem ainda descritas (REIS et al., 2003). Em outras palavras, a região continental das Américas do Sul e Central, a qual engloba cerca de 0,003% de toda água do planeta, abriga 1/8 de toda a biodiversidade de vertebrados (VARI e MALABARBA, 1998).

Apesar da enorme diversidade ictiológica existente na região Neotropical, a estimativa é de que cerca de 30% a 40% de toda a biodiversidade de peixes dessa região ainda não tenha sido reconhecida. Essa situação é atribuída à escassez de informações filogenéticas e/ou dados desconhecidos, pois há enorme riqueza e complexidade de espécies em uma região de sistemas aquáticos de proporções epicontinentais (BÖHLKE et al., 1978; VARI e MALABARBA, 1998). Com essa ampla diversidade biológica, o estudo de caracteres genéticos acerca dos peixes é importante, pois esse grupo está na base da evolução dos vertebrados superiores e entender sua história evolutiva não só é importante por nos informar sobre o próprio grupo dos peixes, mas também por nos dizer sobre a evolução dos vertebrados, inclusive da nossa própria espécie (HELFMAN et al., 2009).

Tendo em vista a grande diversidade observada na ictiofauna mundial, uma das ordens mais representativa desse grupo é a Perciformes, a qual é a mais diversa entre os peixes e a maior entre os vertebrados, dominando o ambiente marinho. Pertencente a superordem

Achathomorpha, alocado na série Percomorpha, Perciformes compreende 20 subordens, 160 famílias, cerca de 1.540 gêneros e aproximadamente 10.033 espécies (NELSON, 2006; HELFMAN et al., 2009). A maioria das famílias dessa ordem não apresenta caracteres morfológicos derivados e compartilhados, o que caracteriza os Perciformes como um grupo não monofilético (NELSON, 2006). Como é basal entre os Teleostei, acredita-se que os demais grupos tenham derivado dos Perciformes (BRUM e GALETTI, 1997).

Entre as 160 famílias de Perciformes, Cichlidae é a segunda maior compreendendo mais de 1.350 espécies atualmente reconhecidas, apesar de serem estimadas mais de 2.000 (KULLANDER, 1998). Distribui-se pelas Américas Central e do Sul, África, Madagascar, Israel, Síria, costa da Índia e Sri Lanka (NELSON, 2006; CHAKRABARTY, 2004) (Figura 1). Compreendem os acarás e carás, micholas e joaninhas, apaiaris e tucunarés.

A posição taxonômica da família Cichlidae é a seguinte (NELSON, 2006):

Classe **Osteichthyes**

Subclasse **Actinopterygii**

Infraclasse **Teleostei**

Divisão **Euteleostei**

Infradivisão **Neoteleostei**

Superordem **Acanthopterygii**

Série **Percomorpha**

Ordem **Perciformes**

Subordem **Labroidei**

Família **Cichlidae**

Trata-se de um importante grupo de peixes da Região Neotropical, totalizando aproximadamente 400 espécies nessa região (KULLANDER, 2003), o que corresponde com cerca de 6-10% das espécies dessa região (KEENLEYSIDE, 1991). A família Cichlidae ocorre em uma grande diversidade de ambientes aquáticos e está representada em rios/riachos de todas as regiões do Brasil (BUCKUP, 1999). São identificados externamente pela presença de uma única narina de cada lado, linha lateral ininterrupta (20-50 escamas na linha lateral, podendo exceder esse número em até 100 escamas), 16 (excepcionalmente 14) raios na nadadeira caudal, espinhas nas nadadeiras dorsal, anal e pélvica. O tamanho de ciclídeos sulamericanos varia de 25-30 mm em adultos de *Apistogramma* até cerca de 1 m em *Cichla temensis*, com a maioria dos taxa variando no intervalo de 20-30 cm (KULLANDER, 2003).

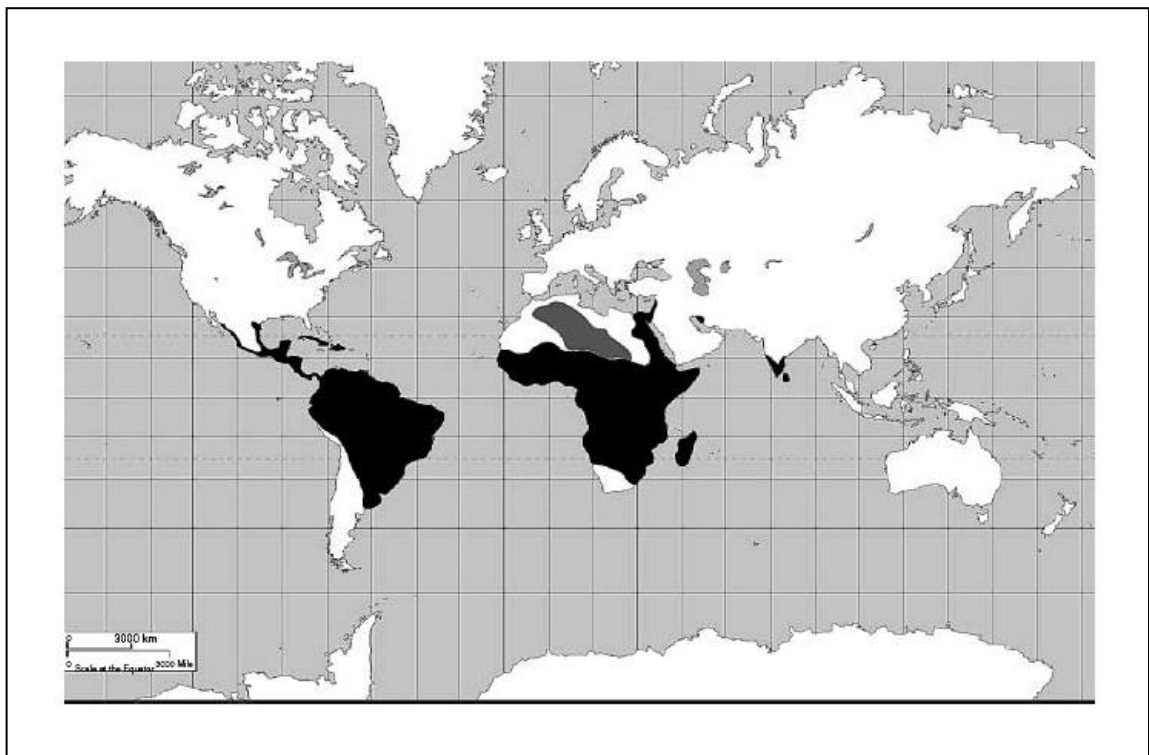


Figura 1. Distribuição mundial de Cichlidae (retirado de CHAKRABARTY, 2004).

Ainda entre os Cichlidae, há grande variabilidade na forma corporal, desde corpo moderadamente comprimido, como em *Cichlasoma*, com formato discóide extremamente alto como, por exemplo, em *Symphysodon*, ou também com formas alongadas, como em *Crenicichla* (NELSON, 2006). Também são bastante diversos no que diz respeito à alimentação, formando grupos com marcadas especializações tróficas particulares ou mesmo vivendo sob condições ambientais especiais (LOWE-MCCONNEL, 1991). Inclusive, a convergência evolucionária observada na morfologia da mandíbula, mostra que ecomorfos similares estão envolvidos repetidamente dentro de diferentes assembleias de ciclídeos. Dessa forma, a família Cichlidae é de interesse para o estudo evolutivo, pois apresenta a habilidade de explorar novos ambientes assumindo um leque de adaptações morfológicas, o que os torna um sistema ideal para estudar os fatores que são a base da diversidade morfológica (ALBERTSON e KOCHER, 2006).

Como uma ferramenta para estudos filogenéticos, a citogenética pode colaborar com dados específicos de espécies desconhecidas ou morfológicamente muito semelhantes. Além disso, as análises citotaxonômicas contribuem para o estudo da evolução pelo fato do material genético estar contido nos cromossomos (GUERRA, 1988). A citogenética possibilita inferências sobre a relação entre a diversidade taxonômica observada em alguns ambientes e a morfologia dos cromossomos das espécies em questão, podendo inclusive apontar possíveis alterações estruturais para explicar o caminho evolutivo da diversidade cariotípica observada (LOUREIRO, 1999). OLIVEIRA et al. (2008) destacam ainda que os estudos citogenéticos contribuem com informações para o entendimento da divergência genética entre espécies co-específicas, bem como da relação entre grupos, da ocorrência de espécies crípticas e de

complexos de espécies. Ainda, destacam a relevante contribuição que a citogenética provê acerca dos mecanismos de determinação sexual e evolução de cromossomos sexuais, da mesma forma com a descrição de cromossomos B e a ocorrência de poliploidia e suas relações com a evolução dos grupos.

Também conhecidos como supranumerários ou acessórios, os cromossomos Bs são cromossomos dispensáveis adicionais que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações de algumas espécies, os quais provavelmente se originaram de cromossomos A, mas que seguem seu próprio caminho evolutivo (CAMACHO e PARKER, em BEUKEBOOM, 1994). Ao longo do tempo, citogeneticistas tentaram definir os supranumerários, porém nem sempre as características estabelecidas para estes cromossomos estão presentes em todos os Bs analisados (KASAHARA, 2009). Contudo, de uma maneira geral, os cromossomos Bs não são homólogos, nem pareiam com os cromossomos A. Além disso, eles podem ser diferentes morfologicamente dos cromossomos A, apresentam um padrão de herança não-Mendeliano, não possuem regiões organizadoras de nucléolo e mostram mecanismos de acumulação (revisado em BEUKEBOOM, 1994).

Os cromossomos Bs têm sido encontrado em todos os maiores grupos de animais e de plantas (CAMACHO et al., 2000), de modo que estima-se que estejam presentes em 15% de todas as espécies vivas (BEUKEBOOM, 1994; KASAHARA, 2009). Entre os peixes, a partir dos anos de 1980 com as primeiras descrições para *Alburnus alburnus* (HAFEZ et al., 1981) e para *Prochilodus scrofa*, hoje denominado *P. lineatus* (PAULS e BERTOLLO, 1983), muitas descrições de supranumerários foram realizadas, principalmente em peixes da

região Neotropical (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Entre os Cichlidae, existem algumas evidências de cromossomos B, os quais foram descritos pela primeira vez em células germinativas de *Gymnogeophagus balzanii* (FELDBERG e BERTOLLO, 1984). Posteriormente foi observado em *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis* e *Crenicichla niederleini*, sendo descritos como “corpúsculos de cromatina” (MARTINS et al., 1995) e mais recentemente em *Cichla* sp., *Cichla monoculus*, *Crenicichla reticulata* (FELDBERG et al., 2004) e em *Crenicichla lepidota* (PIRES, 2008), como pequenos cromossomos B.

Como muitas espécies apresentam número e morfologia cromossômica semelhantes, além desses dados, marcadores cromossômicos têm sido buscados como uma ferramenta para comparação intra e interespecífica. Entre esses estão os bandamentos cromossômicos C, G, Q, R, localização das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação com nitrato de prata, clivagem com enzimas de restrição, localização de regiões ricas em pares de bases G-C ou A-T através de corantes base-específicos, além da localização de sequências particulares através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* - FISH.

Os primeiros estudos citogenéticos em peixes foram publicados por RETZIUS e KASTSCHENKO em 1890 (apud DENTON, 1973). Contudo, até a descoberta da aplicação dos tratamentos hipotonizantes para estudo das células em divisão, pouco foi feito nesta área. Somente após o início da década de 60, os trabalhos em citogenética de peixes puderam apresentar dados precisos a respeito do número e da forma dos cromossomos (KANTEK, 2005). O desenvolvimento geral da citogenética de peixes tem sido bastante grande nas

últimas décadas, alcançando os melhores níveis de competência, tanto pelo desenvolvimento e aplicação de técnicas e metodologias específicas, como pelos resultados teóricos e práticos obtidos (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). No Brasil, a citogenética de peixes teve seu início na década de 1970, com pesquisas em espécies de *Astyanax* (JIM e TOLEDO, 1975), em Pimelodidae (TOLEDO e FERRARI, 1976), em Cichlidae e Loricariidae (MICHELE e TAKAHASHI, 1977; MICHELE et al., 1977) e em Erythrinidae (BERTOLLO et al., 1978). A partir de então, alguns grupos de pesquisas se formaram, estando hoje presentes em vários estados brasileiros, alguns já bem consolidados, enquanto outros são mais recentes e/ou em estado de consolidação (ARTONI et al., 2000).

Dentro da ordem Perciformes, os ciclídeos são as espécies mais estudadas citogeneticamente. Contudo, dados acerca dos cromossomos são conhecidos para apenas 25% de suas espécies (OLIVEIRA et al., 2007). Os primeiros trabalhos citogenéticos com Cichlidae tiveram início em 1975 com OYHENART-PEREIRA et al. analisando *Cichlasoma facetum* e *Crenicichla sexatilis* e posteriormente com MICHELE & TAKAHASHI (1977) com *Tillapia rendalli* e *Geophagus brasiliensis*, THOMPSON (1979) com 41 espécies de ciclídeos neotropicais, VERVOORT (1980) com sete espécies de *Tillapia*, entre outros.

Para a região Neotropical, de acordo com a lista de espécies citogeneticamente analisadas, publicada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) no sítio eletrônico (http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/lab_pesq_biolgia_e_genetica_de_peixe_s.php) e atualizada periodicamente, até o momento existem dados para 1,154 espécies de peixes, tanto de água doce como marinhos, com números diplóides variando entre 24

cromossomos, em *Apteronotus albifrons*, até 134 cromossomos em *Corydoras aeneus*. Dentre esses, aproximadamente 15% são representantes da ordem Perciformes, sendo a família Cichlidae a mais estudada, porém com somente 112 espécies analisadas das 400 existentes nesta região (OLIVEIRA, 2005).

Com os dados disponíveis podemos observar um padrão no número diplóide para os ciclídeos Neotropicais, onde mais de 80% das espécies apresentam $2n = 48$ cromossomos, podendo variar de 38 cromossomos, como em *Apistograma borellii*, a 60 cromossomos, como em *Symphysodon discus*, destacando que 12% das espécies apresentam menos que 48 cromossomos e 7,5% mais que 48 cromossomos (OLIVEIRA, 2005). O número fundamental de braços varia entre 44 e 118. Dessa forma, atribui-se o número diplóide igual a 48 cromossomos como característica basal para a família Cichlidae na região Neotropical (THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a). Pode-se, assim, inferir que a distribuição modal do número diplóide entre os ciclídeos corresponde de certa forma com a distribuição geográfica da família, pois os ciclídeos africanos apresentam $2n=44$ cromossomos como número diplóide modal (variando de 32 a 48 cromossomos), enquanto que as espécies de Cichlidae da região Neotropical apresentam número diplóide modal de $2n = 48$ cromossomos (FELDBERG et al., 2003).

Apesar de muitos dados sobre diversas espécies da família Cichlidae no Brasil, poucos estudos foram conduzidos na região Sul do país, sendo esses focados principalmente no Estado do Paraná, havendo dessa forma uma deficiência no conhecimento acerca das características cromossômicas das populações do Sul do Brasil. A maioria dos ciclídeos dessa

região analisados citogeneticamente até o momento, corroboram com a característica fundamental dos Cichlidae Neotropicais, apresentando $2n=48$ cromossomos, em sua maioria subtelo-acrocêntricos (MARTINS et al., 1995; LOUREIRO et al., 2000; VICARI et al., 2006; MIZOGUCHI et al., 2007; PIRES et al., 2008).

Tendo em vista que a família Cichlidae representa um grupo interessante para o estudo de mecanismos cromossômicos/evolutivos com base na plasticidade morfológica que suas espécies assumem em contrapartida com a aparente conservação cromossômica observada nesse grupo, o estudo citogenético dessa família contribui na elucidação das questões evolutivas, de diversificação cromossômica e biogeográficas que envolvem esse grupo.

OBJETIVOS

a) **Objetivo Geral:** Analisar e comparar citogeneticamente espécies de peixes da família Cichlidae da região Sul do Brasil.

b) **Objetivos Específicos:**

- Caracterizar, comparar e analisar citogeneticamente as espécies/populações coletadas, com a utilização de procedimentos de coloração convencional (Giemsa), bem como a identificação das regiões de heterocromatina por bandamento C, a identificação da região organizadora de nucléolo por impregnação com nitrato de prata (RONs) e, mapeamento cromossômico por hibridização *in situ* fluorescente, com sondas de rDNA 18S e 5S.
- Discutir os resultados obtidos comparando-os com aqueles encontrados na literatura a fim de realizar inferências sobre aspectos citotaxonômicos e evolutivos da família Cichlidae.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em capítulos sob a forma de artigos que posteriormente serão submetidos aos periódicos citados na primeira página de cada capítulo.

CAPÍTULO I

Estudos cromossômicos em *Crenicichla lepidota* e *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes, Pisces) do extremo sul do Brasil

- Citogenética de ciclídeos -

Giselle Xavier Perazzo¹, Rafael Bueno Noletto¹, Marcelo Ricardo Vicari², Patrícia Coelho Machado³, Adriana Gava³, Marta Margarete Cestari¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, ²Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR e ³Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

Este artigo será submetido para o periódico *Genetics and Molecular Biology*.

Resumo

São apresentados novos dados para *Crenicichla lepidota*, além da primeira descrição citogenética para *Australoheros facetus*, provenientes do Sul do Brasil. Análises cromossômicas foram realizadas através de técnicas convencionais e moleculares com fluorocromos base preferenciais (DAPI/CMA₃) e Hibridização Fluorescente *in situ* com sondas de rDNA 18S e 5S. Para todos os exemplares foi observado $2n = 48$ cromossomos, com $NF = 70$ para *A. facetus* e $NF=56$ para *C. lepidota*. Em ambas, o bandamento C evidenciou marcações principalmente pericentroméricas, com um bloco heterocromático no primeiro par de *C. lepidota*. As colorações com AgRON, FISH 18S e DAPI/CMA₃ evidenciaram um único sítio no segundo par cromossômico de *A. facetus* e no primeiro de *C. lepidota*, coincidente com a constrição secundária no primeiro par desta espécie. Em *C. lepidota*, a FISH 5S evidenciou dois sítios intersticiais, nos pares 11 e 21. De modo geral, os dados aqui obtidos para *C. lepidota* e para *A. facetus* apresentam características cromossômicas consideradas basais para os ciclídeos, porém apresentando novos dados para ambas as espécies. Desse modo, este estudo corrobora a hipótese de que processos evolutivos tipo rearranjos não-Robertsonianos estão envolvidos na diversificação da maior parte dos Cichlidae Neotropicais.

Palavras-Chave: Citogenética de peixes – ciclídeos – RONs – FISH – DAPI/CMA₃

Introdução

Entre as 160 famílias da ordem Perciformes, Cichlidae é uma das mais numerosas compreendendo cerca de 1.350 espécies atualmente reconhecidas, contudo é estimado um número superior a 2.000 espécies (KULLANDER, 1998). Trata-se de um importante grupo de peixes da Região Neotropical, representando de 6% a 10% de peixes de água doce dessa fauna (KEENLEYSIDE, 1991), totalizando aproximadamente 400 espécies nessa região (KULLANDER, 2003).

Com relação ao número diplóide, podemos observar um padrão para os ciclídeos Neotropicais de forma que a maioria das espécies apresenta $2n = 48$ cromossomos, podendo variar de 38, como em *Apistograma borellii*, a 60 cromossomos, como no gênero *Symphysodon*, e com o número fundamental de braços (NF) variando entre 44 e 118 (FELDBERG et al., 2003). Para a família Cichlidae, atribui-se $2n = 48$ cromossomos acrocêntricos como característica ancestral (THOMPSON, 1979), de modo que alguma diferença dessa condição representa um estado evolutivo derivado (FELDBERG et al., 2003).

Apesar de muitos dados sobre diversas espécies da família Cichlidae no Brasil, poucos estudos foram conduzidos na região Sul do país, sendo esses restritos ao Estado do Paraná, havendo dessa forma, uma deficiência na caracterização cromossômica de populações do extremo Sul do Brasil. A maioria dos ciclídeos desta região analisados citogeneticamente até o momento, apresenta a característica fundamental dos Cichlidae, $2n = 48$ cromossomos, contudo, com variações em relação à morfologia cromossômica, bem como a diferentes marcadores citogenéticos, como, por exemplo, em relação as regiões organizadoras de

nucléolo (MARTINS et al., 1995; LOUREIRO et al., 2000; VICARI et al., 2006; MIZOGUCHI et al., 2007; BENZAQUEM et al., 2008, PIRES et al., 2008, entre outros).

Assim, o presente trabalho teve o objetivo de analisar o cariótipo de ciclídeos Neotropicais da região Sul do Brasil. São apresentados dados novos para *Crenicichla lepidota*, além da primeira descrição citogenética para *Australoheros facetus*.

Materiais e Métodos

Foram analisados 13 espécimes (8 *C. lepidota* e 5 *A. facetus*) de duas localidades do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: no canal São Gonçalo, cidade de Arroio Grande (32°08'S e 52°34'W), e no Lago Polegar, cidade do Rio Grande (32°11'S e 52°19'W) (Tabela I). Exemplares testemunhos foram depositados na coleção científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS11179, UFRGS11181, UFRGS11187) e os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná (N°378), baseado nos princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências do Guide for the Care and Use of Experimental Animals – CCAC (1993). Cromossomos mitóticos foram obtidos do rim anterior pelo método direto de *air drying* (BERTOLLO et al., 1978). As regiões organizadoras de nucléolo (AgRON) e bandas C foram obtidas pelas técnicas descritas por HOWELL e BLACK (1980) e SUMNER (1972), respectivamente. As sondas de 18S e 5S de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004) e de

Leporinus obtusidens (MARTINS e GALETTI, 1999), respectivamente, foram marcadas com biotin-14-dATP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (BioNick™ Labeling System, Invitrogen). A detecção e amplificação dos sinais de hibridização foram obtidas usando streptavidina-FITC conjugada (Molecular Probes™ – Invitrogen). A heterocromatina também foi analisada por dupla coloração com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) + 4'-6-diamin-2-phenlindole (DAPI) (SCHWEIZER, 1976). As metáfases foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axiophot e as imagens foram capturadas usando o software Case Data Manager Expo 4.0 (Applied Spectral Imaging).

A identificação cromossômica foi feita com base em Levan *et al.* (1964). Para cálculo do Número Fundamental de braços (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) foram considerados de dois braços, enquanto os subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a) constituídos por um único braço.

Resultados

Todos os espécimes analisados apresentaram cariótipo de $2n = 48$ cromossomos, sem a observação de heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 1).

A população de *Australoheros facetus* do lago Polegar apresentou cariótipo constituído de 22 sm e 26 st/a, com NF = 70 (Figura 1A). Foram evidenciadas poucas bandas

C, sendo essas preferencialmente pericentroméricas (Figura 1B). A impregnação com nitrato de prata, bem como a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) e a coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, coincidiram em marcação na região subterminal no braço curto do segundo par cromossômico (Figura 2e-h).

Crenicichla lepidota apresentou cariótipo com 4m, 4sm e 40st/a e NF = 56 em ambas as populações (Figura 1C). O primeiro par do complemento apresenta constrição secundária no braço curto, local evidenciado pela Ag-RON e pela FISH com sonda de rDNA 18S (Figuras 2B e C, respectivamente). Esta região também se mostrou rica em pares de base G-C, evidenciado pela dupla-coloração com DAPI/CMA₃ (Figura 2D). Adjacente a essa constrição, uma banda C está presente na região telomérica do braço curto desses cromossomos (Figura 2A). Este mesmo par cromossômico também apresenta um grande bloco heterocromático na região intersticial do braço longo, além de pequenas bandas teloméricas nos braços longos (Figura 2A-D). Outras bandas C foram observadas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, bem como algumas teloméricas em cromossomos acrocêntricos (Figura 1B). A FISH com rDNA 5S evidenciou dois sítios sobre os pares 11 e 21, ambos intersticiais (Figura 3).

Discussão

Como observado para a maioria dos ciclídeos Neotropicais, o número diplóide $2n=48$ cromossomos, também foi constante em *C. lepidota* e *A. facetus* aqui analisados, corroborando com o conservadorismo da macroestrutura cromossômica como característica fundamental tanto para a família Cichlidae, como para a ordem Perciformes (THOMPSON, 1979; HONCATI et al., 2007). Contudo, a variação cariotípica observada entre as espécies *C. lepidota* e *A. facetus*, ambas apresentando cromossomos de dois braços, representam um estado de derivações desse suposto cariótipo ancestral dos ciclídeos, consequência de rearranjos não-Robertsonianos, principalmente inversões pericêntricas, durante o processo evolutivo dessa família.

O gênero *Australoheros* foi reconhecido recentemente por RÍCAN e KULLANDER (2006), a partir de análises de *Cichlasoma facetum*. Esses autores analisaram características morfológicas e moleculares do grupo de espécies 'Cichlasoma' facetum e concluíram pelo monofiletismo do grupo, diferentemente do que ocorre com outras espécies de *Cichlasoma*. Dessa forma, espécies anteriormente classificadas como *Cichlasoma facetum* hoje pertencem a um novo gênero, *Australoheros*, composto por aproximadamente 10 espécies. Análises filogenéticas por citocromo b indicam que *Australoheros* é mais proximamente relacionado com os gêneros: *Pterophyllum*, *Hypselecara*, *Hoplarchus*, *Mesonauta*, *Uaru*, *Symphysodon* e *Heros*, pertencendo à tribo dos ciclídeos Heroini (RÍCAN e KULLANDER, 2006).

Análises citogenéticas realizadas com espécies filogeneticamente próximas a *Australoheros* mostram que esse grupo é consideravelmente variável tanto quanto ao número

como quanto à morfologia cromossômica, de modo que *Uaru amphicantoides* apresenta $2n = 46$ cromossomos (THOMPSON, 1979) e as espécies do gênero *Symphysodon* possuem $2n = 60$ cromossomos (MESQUITA et al., 2008). Em uma análise de *Cichlasoma facetum* do lago Tarumã, Ponta Grossa, Brasil, VICARI et al. (2006) observaram $2n = 48$ cromossomos, sendo $10sm$ e $38st/a$. *Australoheros facetus* do presente trabalho apresenta $2n = 48$ cromossomos, grande parte deles submetacêntricos (22 cromossomos). Dessa forma, podemos observar que esse grupo de espécies proximamente relacionadas apresenta grande variabilidade cariotípica, de modo que as diferentes direções evolutivas propostas por FELDBERG et al. (2003) para os ciclídeos Neotropicais guiaram a evolução das espécies da tribo Heroini.

A descrição do primeiro cariótipo de *A. facetus* contribui com importante fonte de dados para inferências futuras sobre a citogenética comparativa desse gênero. Apesar da escassez de dados citogenéticos sobre a espécie, pode-se observar que grande parte dos pares cromossômicos são de dois braços, conferindo a *A. facetus* um alto NF, o que indica ocorrências de repetidos eventos de inversões pericêntricas durante a história evolutiva dessa espécie.

Com relação à *Crenicichlas lepidota*, alguns trabalhos foram realizados na região Neotropical (THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a,b; MARTINS et al., 1995, RONCATI et al., 2007), porém este é o primeiro com uma espécie do extremo Sul do Brasil. As análises cariotípicas de *C. lepidota* do rio Paraná, em Posadas, Argentina (RONCATI et al., 2007), bem como na região de Porto Rico, Brasil (MARTINS et al., 1995), em Miranda, no Estado de São Paulo, Brasil (FELDBERG e BERTOLLO, 1985a), além de

espécimes de origem comercial (THOMPSON, 1979), evidenciaram mesma fórmula cariotípica com seis cromossomos m/sm e 42 st/a. Dados esses que divergem do obtido no presente trabalho, onde foram observados oito cromossomos m/sm e 40 st/a (NF = 56). Essa diferença pode ser atribuída a rearranjos cromossômicos do tipo não-Robertsoniano, como as inversões pericêntricas. Contudo, erros na medida ou diferenças na condensação cromossômica das metáfases analisadas também podem estar envolvidos (MIZOGUCHI et al., 2007). Análises de um maior número de populações podem revelar qual o real motivo das variações observadas.

Diferentes padrões de bandas C também são observados entre essas populações. RONCATI et al. (2007) destacam que a população do rio Paraná, em Posadas, apresenta grandes blocos de heterocromatina sem a especificação de qual par cromossômico apresenta tal acúmulo, podendo ser o primeiro, como também ocorre em *C. lepidota* nas populações aqui estudadas. Porém, os autores descrevem a ocorrência de alguns cromossomos totalmente heterocromáticos naquela população, situação essa não observada neste trabalho, o que evidencia que essa espécie, apesar da conservação do número diplóide, apresenta diferenças com relação ao acúmulo e dispersão de heterocromatina, indicando que eventos de duplicação e rearranjo de blocos heterocromáticos podem estar envolvidos na diferenciação interpopulacional de *C. lepidota*.

A ocorrência de bandas C positivas adjacentes as RONS também foi reportada em *C. lepidota* do rio Paraná, nos dois pares portadores das RONS (MARTINS et al., 1995), como também em outras espécies de *Crenicichla*, como em *C. lugubris*, *C. cf. johana* e *C.*

britskii (BENZAQUEM et al., 2008). A ocorrência de RON e constrição secundária também foram observadas em outras espécies desse gênero, como em *Crenicichla* sp , *C. niederleinii* (LOUREIRO et al., 2000), *C. iguassuensis* (MIZOGUCHI et al., 2007), *C. cincta*, *C. inpa* (BENZAQUEM et al., 2008). Essa situação tem sido comumente encontrada em peixes (GALETTI, 1998), e a coloração das RONs por fluorocromos G-C específicos, como a cromomicina A₃ (CMA₃) e a mitramicina, podem estar relacionados com a presença de blocos heterocromáticos dentro dos sítios de RONs (PENDÁS et al., 1993; ARTONI et al., 1999). No caso de *C. lepidota* observa-se heterocromatina adjacente à constrição secundária, sítio da RON. Porém, a banda positiva de CMA₃ corresponde justamente com o sítio da RON, não sendo observada mais nenhuma banda para este fluorocromo, nem mesmo no grande bloco heterocromático do primeiro par cromossômico. Nesse caso, a coloração com CMA₃ não parece estar relacionada com a presença de bandas heterocromáticas intersticiais aos loci de rDNA, mas estritamente a região organizadora de nucléolo ser rica em pares G-C.

Para *C. lepidota*, já foram observadas RONs múltiplas na população do rio Paraná, na região de Porto Rico, Estado do Paraná (MARTINS et al., 1995), bem como RON simples na população de Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul (FELDBERG e BERTOLLO, 1985b). Em outras espécies do gênero, a observação de RONs simples foi predominante (FELDBERG e BERTOLLO, 1985b; LOUREIRO et al., 2000; MIZOGUCHI et al., 2007; RONCATI et al., 2007, BENZAQUEM et al., 2008), sem a ocorrência de RONs múltiplas em outras espécies de *Crenicichla*. No presente trabalho, observamos RONs simples no primeiro par na constrição secundária, tanto pela impregnação com nitrato de prata, como pela FISH com sonda de rDNA 18S, como foi observado em diversas outras

espécies de *Crenicichla* (FELDBERG e BERTOLLO, 1985a, b; MARTINS et al., 1995; LOUREIRO et al., 2000; FENOCCHIO et al., 2003; MIZOGUCHI et al., 2007; BENZAQUEM et al., 2008). Dessa forma, a ocorrência de RONS simples no primeiro par cromossômico em *C. lepidota* do lago Polegar e do canal São Gonçalo, corrobora com a idéia de que esta parece ser uma característica plesiomórfica desse gênero, sendo a presença de RONS múltiplas uma apomorfia da população de *C. lepidota* do rio Paraná (MARTINS et al., 1995).

Com relação à utilização da técnica de FISH, em *C. lepidota* estes são os primeiros dados. A hibridização com a sonda de rDNA 18S evidenciou um único sinal no primeiro par metacêntrico, local da constrição secundária, comprovando que em *C. lepidota* das duas populações do extremo Sul do Brasil observa-se a ocorrência de RONS simples. Com relação à utilização da sonda de rDNA 5S, entre os Perciformes existem poucos estudos sobre localização e número de locos desse gene (VICARI et al., 2006), não havendo dados até então para o gênero *Crenicichla*. Nos ciclídeos *Geophagus brasiliensis* e *Cichlasoma facetum* os sítios de rDNA 5S foram encontrados na região intersticial dos braços longos dos pares 10 e 11, respectivamente (VICARI et al., 2006), e em *Oreochromis niloticus* foi observado no braço curto de um par subtelocêntrico e intersticial no braço longo de outro par subtelocêntrico (MARTINS et al., 2000). Entre os Perciformes, em *Chromis insolata* e *C. flavicauda* os sítios para os genes de 5S foram localizados na região telomérica de dois cromossomos acrocêntricos para a primeira espécie e na região pericentromérica de um par metacêntrico para a segunda (MOLINA e GALETTI Jr., 2002). No presente trabalho, observamos a dispersão dos sítios de rDNA 5S intersticiais em dois pares cromossômicos de

C. lepidota (pares 11 e 21), o que contribui com a idéia de que a posição intersticial dos genes de rDNA 5S poderia implicar em alguma vantagem relacionada com a organização desses genes no genoma, já que esta localização tem sido encontrada na maioria das espécies de peixes (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). MARTINS e WASKO (2004) destacam que a conservação do padrão de distribuição do rDNA 5S geralmente em posição intersticial nos cromossomos, pode estar relacionada com uma proteção para que eventos de dispersão desse gene pelo genoma não ocorram. Em contrapartida, as sequências de localização terminal, como as de rDNA 45S, por exemplo, são propícias à transferência de material genético devido à proximidade dessas regiões no núcleo interfásico (SCHWEIZER e LOIDL, 1987).

Apesar de poucos dados sobre esse marcador, a localização física dos genes ribossômicos 5S é de utilidade em estudos citogenéticos comparativos, pois a identificação desses sítios podem ser variados ou conservados em diferentes populações de uma mesma espécie, em espécies distintas de um mesmo gênero ou pertencentes a gêneros relacionados (MARTINS e WASKO, 2004; KASAHARA, 2009). Dessa forma, os dados aqui apresentados poderão colaborar com análises comparativas futuras entre espécies de *Crenicichla*.

De modo geral, os dados aqui obtidos para *C. lepidota* e para *A. facetus* apresentam características cromossômicas consideradas basais para os ciclídeos, como $2n=48$ cromossomos, RON simples e bandas C preferencialmente pericentroméricas. Contudo, novos dados são apresentados para ambas as espécies. A descrição da localização e do número dos sítios de rDNA 5S de *C. lepidota* contribuem com importante marcador cromossômico para futuras inferências sobre citotaxonomia desse grupo. Adicionalmente, a atual organização

cromossômica de *A. facetus* sugere a ocorrência de diversos eventos de rearranjos cromossômicos durante a evolução dessa espécie, quando comparada ao suposto cariótipo ancestral para os Perciformes, de $2n=48$ cromossomos acrocêntricos, já que apresenta cerca de metade de seus cromossomos submetacêntricos. Desse modo, as análises citogenéticas EM populações de *C. lepidota* e de *A. facetus* do extremo Sul do Brasil corroboram com a hipótese de que processos evolutivos tipo rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos estão envolvidos na diversificação cariotípica dos Cichlidae Neotropicais.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas estão apresentadas em conjunto, no final desta dissertação.

Tabelas

Tabela I. Número de espécimes analisados neste estudo nos dois diferentes pontos de amostragem. (M=machos e F=fêmeas).

		<i>Crenicichla lepidota</i>	<i>Australoheros facetus</i>	Total
Lago Polegar	M	2	2	4
	F	1	3	4
Canal São Gonçalo	M	4	-	4
	F	1	-	1
Total		8	5	13

Figuras

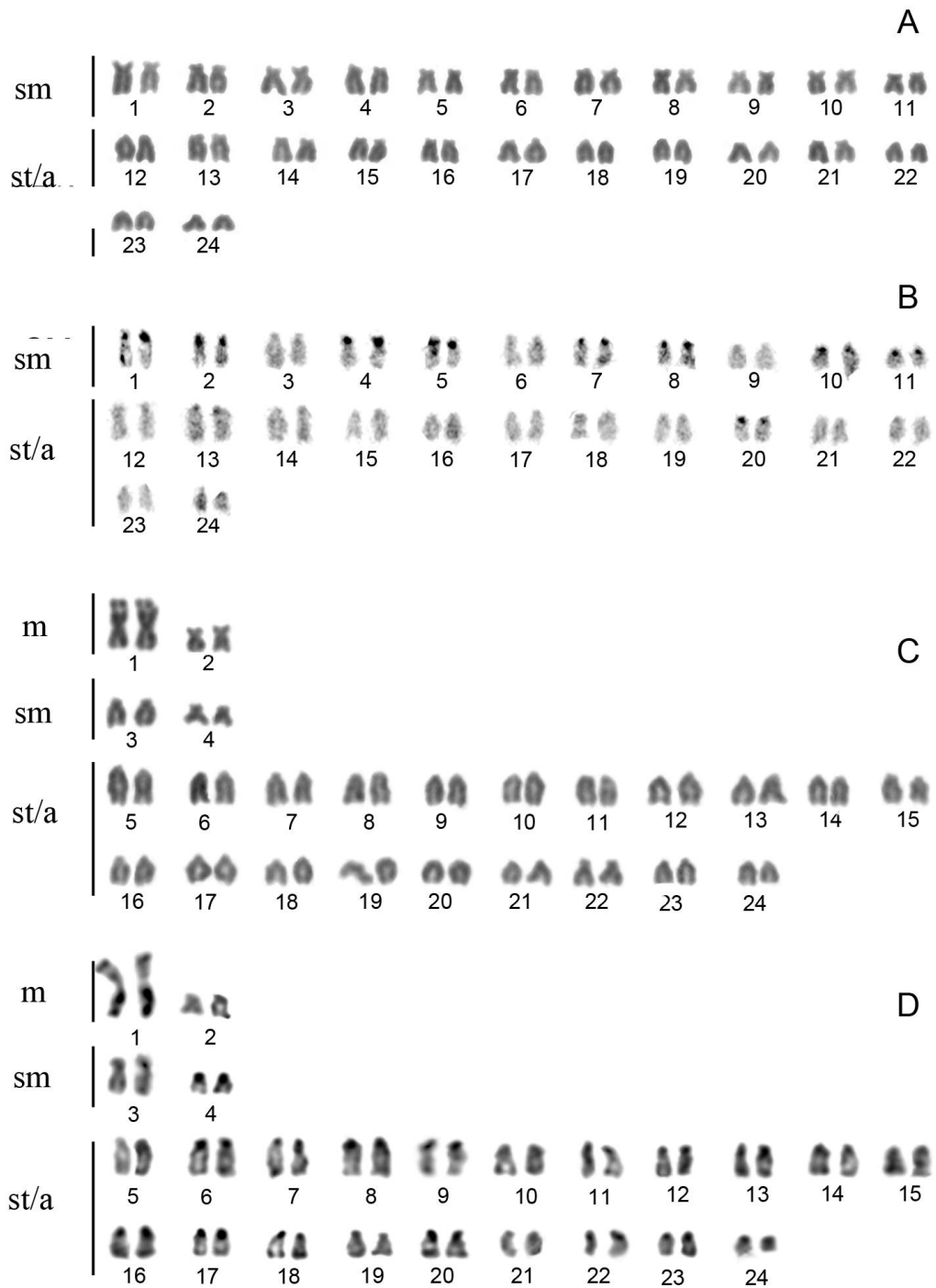


Figura 1. Cariótipos de *Australoheros facetus* (Giemsa em A e banda C em B) e de *Crenicichla lepidota* (Giemsa em C e banda C em D). Barra representa 5µm.

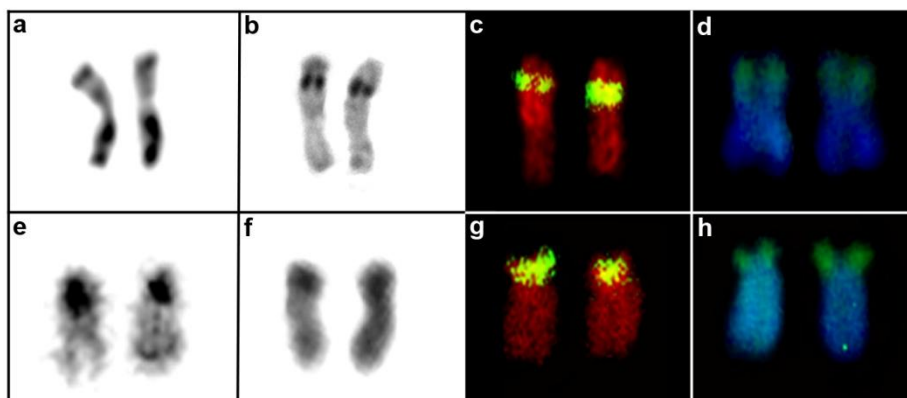


Figura 2. Destaque do primeiro par de *Crenicichla lepidota* (**a, b, c, d**) e do segundo par de *Australoheros facetus* (**e, f, g, h**) sob diferentes tratamentos: banda C (**a, e**), AgRON (**b, f**), FISH 18S (**c, g**) e DAPI/CMA₃ (**d, h**).

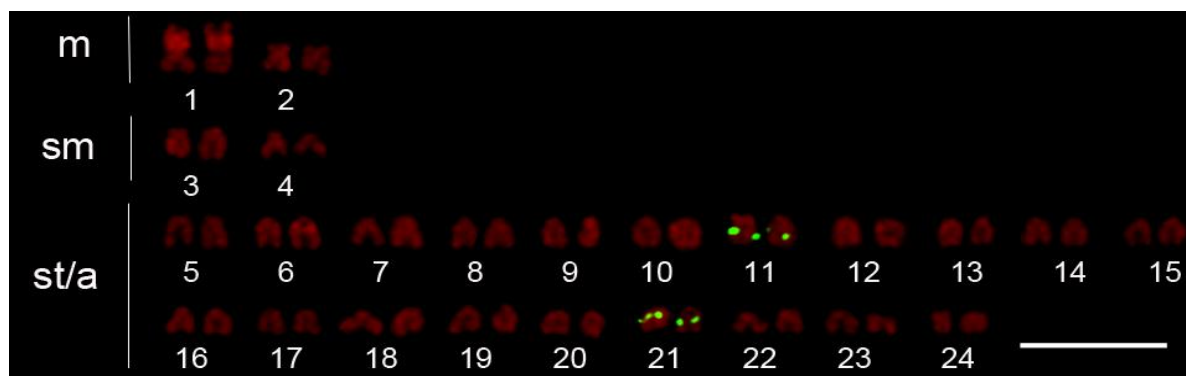


Figura 3. Cariótipo de *Crenicichla lepidota*, após procedimento de FISH com sonda de rDNA 5S, evidenciando os pares 11 e 21 com sítios intersticiais. Barra representa 5µm.

CAPÍTULO II

Diversidade cariotípica em *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 (Cichlidae, Perciformes) do sul do Brasil

- Polimorfismo cromossômico do peixe Cará –

G. X. Perazzo^{a§}, R. B. Noletto^a, M. R. Vicari^b, A. Gava^c, M. M. Cestari^a

^aUniversidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, PR, ^b Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Ponta Grossa, PR, e ^c Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Biociências, Rio Grande, RS.

Este artigo será submetido para o periódico *Journal of Fish Biology*.

Resumo

Tendo em vista as diferenças cariotípicas e morfológicas observadas para *Geophagus brasiliensis*, o presente trabalho teve por objetivo analisar citogeneticamente seis populações dessa espécie da região Sul do Brasil. Todos os espécimes apresentaram $2n = 48$ cromossomos, porém três citótipos diferentes foram observados de acordo com a presença de um, dois ou três pares de cromossomos submetacêntricos. Além disso, foi observada uma variação na localização das regiões organizadoras de nucléolos entre as populações, bem como na posição do gene ribossômico rDNA 5S. As análises da heterocromatina apresentaram diferentes padrões de localização das bandas C entre os citótipos e entre as populações analisadas. Ainda destacamos que *G. brasiliensis*, apesar de não apresentar variação quanto ao número cromossômico diplóide, possui uma ampla variação intrerpopelacional tanto com relação à fórmula cariotípica quanto à posição de marcadores cromossômicos, corroborando com as hipóteses de que este taxón representa um complexo de espécies ou de espécies crípticas.

Palavras-Chave

Cará – citótipos – FISH – RON – heteromorfismo

Introdução

A ictiofauna Neotropical é extremamente rica, incluindo cerca de 5,000 espécies (REIS et al., 2003), o que corresponde a um oitavo de toda a biodiversidade de vertebrados reconhecidos. Apesar da enorme diversidade ictiológica registrada para esta região, estima-se que esta represente de 60% a 70% da fauna de peixes Neotropicais que efetivamente habitam o neotrópico. Essa situação é atribuída à escassez de informações filogenéticas e/ou a dados desconhecidos, possivelmente reflexo da região Neotropical possuir sistemas aquáticos de proporções epicontinentais que comportam uma enorme riqueza e complexidade de espécies (BÖHLKE et al., 1978; VARI e MALABARBA, 1998).

Dentro dessa enorme biodiversidade, a família Cichlidae, com cerca de 400 representantes na ictiofauna Neotropical (NELSON, 2006), possui espécies de interesse para estudos evolutivos, pois algumas apresentam ampla distribuição bem como enorme plasticidade morfológica assumindo um leque de forma que os torna um sistema ideal para testar os fatores que são a base da diversidade morfológica (ALBERTSON e KOCHER, 2006). Ensaios de citogenética podem contribuir neste sentido oportunizando marcadores que são cada vez mais empregados em análises filogenéticas, especialmente em relação a caracterização cariotípica de espécies novas e com a citotaxonomia de espécies crípticas (BERTOLLO et al., 1986).

Com relação às análises citogenéticas, a família Cichlidae é considerada um grupo com uma macroestrutura cromossômica conservada. Mais da metade das espécies analisadas apresentam um número diplóide de 48 cromossomos em sua maioria com um braço, mas com

ocorrência de variações tanto no número diplóide, de 38 a 60 cromossomos, como no número fundamental de braços (NF), de 44 a 118 (FELDBERG et al., 2003). As variações que mantêm o número diplóide dentro da família Cichlidae têm sido atribuídas a mecanismos de rearranjos estruturais principalmente translocações e inversões pericêntricas, enquanto que os mecanismos que modificam o número cromossômico são atribuídos a translocações, fissões e fusões cêntricas (BRUM e GALETTI Jr., 1997; FEDBERG et al., 2003; MESQUITA et al., 2008; GROSS et al., 2009).

Geophagus brasiliensis é um ciclídeo comum no Sul e Sudeste do Brasil. É encontrado em uma grande variedade de biomas, evidenciando-se uma enorme variação morfológica, o que pode sugerir, muitas vezes, a existência de espécies diferentes (MARTINS et al., 1995; BRUM e GALETTI, 1997). Apesar da constância de $2n = 48$ cromossomos, heteromorfismos cromossômicos com relação ao tamanho da região organizadora de nucléolo (RON) bem como diferenças no número fundamental de braços, com conseqüente alteração do NF, já foram reportadas para esta espécie em diferentes localidades (THOMPSON, 1979; MICHELE e TAKAHASHI, 1977; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a; MARTINS et al., 1995; VICARI et al., 2006a; PIRES et al., 2008).

A fim de obter um panorama mais abrangente da região Sul do Brasil sobre a divergência cariotípica dessa espécie, o presente trabalho teve como objetivo analisar citogeneticamente *G. brasiliensis* em seis populações distribuídas nos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná.

Materiais e Métodos

Foram analisados 33 espécimes de *G. brasiliensis* de seis localidades da região Sul do Brasil. No estado do Rio Grande do Sul: no lago Polegar, cidade do Rio Grande (32°11'S e 52°19'W); arroios da localidade do Arraial, cidade do Rio Grande (32°27'S e 52°46'W); no canal São Gonçalo, cidade de Arroio Grande (32°08'S e 52°34'W); na lagoa do Peixe, cidade de Mostardas (31°08'S e 50°48'W) e na lagoa dos Quadros, cidade de Capão da Canoa (29°45'S e 50°03'W). E no estado do Paraná no Parque Ecológico Costa, cidade de Curitiba (25°50'S e 49°27'W) (Fig. 1). Exemplares testemunhos foram depositados na coleção científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS11182, UFRGS11183, UFRGS11184, UFRGS11185, UFRGS11186) e os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná (Nº 351), baseado nos princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências do Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care) (1993).

As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior usando tratamento de colchicina *in vivo* (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva foi detectada usando o método de bandamento C (SUMNER, 1972) e as RONS foram detectadas usando coloração com nitrato de Prata (HOWELL e BLACK, 1980). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi usada para a localização dos sítios dos genes de rDNA seguindo PINKEL et al. (1986), com algumas modificações. Foram utilizadas duas sondas, uma para rDNA 18S (cerca de 1,800 pares de base) a qual foi obtida a partir do DNA

genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004). A outra sonda foi utilizada para localização do rDNA 5S (cerca de 120 pares de bases), a qual foi obtida a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999). Para marcação das sondas foi utilizado o procedimento de “nick translation” com uso dos kits Bionick Labeling System (Invitrogen) e Nick Translation Biotin (Roche) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

As metáfases com melhor morfologia e dispersão cromossômica foram capturadas por meio do sistema de captura digital Applied Spectral Imagem, acoplado ao microscópio Carl Zeiss Axiophot. As análises cromossômicas foram realizadas por meio do software Case Data Manager Expo 4.0 e as medições cromossômicas conforme Levan *et al.* (1964). O cálculo para o número fundamental de braços (NF) levou em consideração os cromossomos metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) como apresentando dois braços e os cromossomos subteloacêntricos (st) e acrocêntricos (a) com um braço cromossômico.

Resultados

Todos os espécimes analisados apresentaram $2n = 48$ cromossomos, independentemente do sexo. Contudo, a fórmula cariotípica variou com relação ao número de cromossomos submetacêntricos e subtelo/acrocêntricos, tanto inter quanto intrapopulacionalmente, suportando a existência de três citótipos com as seguintes fórmulas

cariotípicas: citótipo I (4sm + 44st/a, NF = 52), citótipo II (6sm + 42st/a, NF = 54) e citótipo III (8sm + 40st/a, NF = 56) (Fig. 2).

O citótipo I foi observado nas populações dos arroios do Arraial, do lago Polegar, da lagoa do Peixe, da lagoa dos Quadros, do canal São Gonçalo e do Parque Ecológico Costa, sendo o citótipo mais frequente no total amostrado (45,4%). O citótipo II teve ocorrência nas populações do lago Polegar, dos arroios do Arraial e do Parque Ecológico Costa. O terceiro citótipo foi observado nas populações do Arraial, do lago Polegar, da lagoa dos Quadros e do Parque Ecológico Costa (Tabela I).

A maioria das populações analisadas independentemente do citótipo apresentou RON simples localizada no braço curto do primeiro par submetacêntrico, evidenciada tanto pela impregnação com nitrato de prata como pela FISH com sonda de rDNA 18S. Pode-se observar um heteromorfismo de tamanho tanto quando corado com Giemsa como quando submetido às técnicas de Ag-RON e FISH (rDNA 18S). Por sua vez, a população da lagoa do Peixe apresentou a RON na região terminal do braço longo do primeiro par st/a (Fig. 6).

As populações apresentaram características peculiares relacionadas a heteromorfismos cromossômicos, diferentes padrões de bandas C e localização das regiões organizadoras de nucléolo e dos sítios de rDNA 18S e 5S para cada população, a saber:

População do Lago Polegar

G. brasiliensis do lago Polegar, um pequeno lago de origem antrópica do *campus* da Universidade Federal do Rio Grande, também apresentou ampla variação quanto à morfologia de seus cromossomos, sendo observados os três citótipos (Fig. 2). Em todos os casos, o primeiro par do complemento cromossômico apresentou heteromorfismo com relação ao tamanho dos cromossomos, situação também observada com relação a RON que se situa nesse mesmo par (Fig. 6). O bandamento C nesta população evidenciou bandas na região pericentromérica na maioria dos cromossomos e telomérica em alguns pares, contudo nos espécimes com NF=54, citótipo II, foi observada uma banda na região intersticial próxima ao centrômero do par 19 (Figs. 3D, 4B e 5C). O sítio para o rDNA 5S foi localizado no par 5 do complemento, na região intersticial do braço longo destes cromossomos (Fig. 6).

População dos arroios do Arraial

Esta população apresentou grande diversidade cariotípica, englobando os três citótipos (Fig. 2). O primeiro par submetacêntrico apresentou heteromorfismo de tamanho em todos os citótipos observados. Esse heteromorfismo também foi observado com relação à RON quando submetido à coloração com nitrato de prata e a FISH com sonda rDNA 18S (Fig. 6). O bandamento C revelou a existência de blocos heterocromáticos pericentroméricos na maioria dos cromossomos com alguns pares portadores de bandas teloméricas. Porém nos exemplares com citótipo III, foi observado um padrão diferenciado no primeiro par st/a, que é

destacadamente heteromórfico, onde o maior cromossomo do par apresenta banda pericentromérica e o menor uma banda telomérica do braço longo (Figs. 3B, 4C e 5D).

População do canal São Gonçalo

No canal São Gonçalo todos os espécimes analisados apresentaram o citótipo I (Fig. 2A). A característica heteromórfica do primeiro par cromossômico observada em outras populações desse estudo, também foi encontrada nessa população. E nesse caso também foi coincidente com o heteromorfismo para a RON, observado nesse mesmo par tanto pela impregnação com prata como pela FISH com rDNA 18S (Fig. 6). O bandamento C evidenciou bandas pericentroméricas em alguns pares cromossômicos, bem como na região telomérica de outros (Fig. 3C). O gene ribossomal 5S foi localizado na região intersticial do braço longo do 5º par cromossômico (Fig. 6).

População da Lagoa do Peixe

A população da lagoa do Peixe apresentou uma única fórmula cariotípica: o citótipo I. Porém características peculiares foram observadas como um padrão diferente de bandas C, com poucas bandas na região pericentromérica e nenhuma telomérica, característica presente nas demais populações (Fig. 3D). Além disso, a localização da RON foi observada

na região terminal do braço longo do primeiro par st/a, evidenciada tanto pela impregnação com nitrato de prata quanto pela FISH com sonda de rDNA 18S. O sítio do rDNA 5S foi observado na região terminal do braço curto do segundo par submetacêntrico (Fig. 6).

População da Lagoa dos Quadros

Os indivíduos analisados pertencentes a lagoa dos Quadros apresentaram os citótipos I e III (Fig. 2A e C). Em ambos, observam-se bandas C positivas pericentroméricas, bem como pequenos blocos heterocromáticos presentes na região telomérica de diferentes pares cromossômicos dos dois citótipos (Figs. 3A e 5B). O sítio do rDNA 18S foi observado no braço curto do segundo par submetacêntrico em ambos citótipos dessa população. O sítio do rDNA 5S foi localizado na região terminal do braço longo do segundo par submetacêntrico, mesma localização observada na população da lagoa do Peixe (Fig. 6).

População do Parque Ecológico Costa

Os exemplares da população de *G. brasiliensis* amostrada no Parque Ecológico Costa também apresentaram variação quanto a morfologia dos cromossomos dos indivíduos analisados, apresentando os citótipos I, II e III (Fig. 2). O primeiro par mostra-se heteromórfico no tamanho. O bandamento C evidenciou marcações próximas ao centrômero,

bem como nas regiões teloméricas na maioria dos cromossomos, sendo diferente a distribuição dessas bandas nos cromossomos dos citótipos presentes nessa população (Figs. 3F, 4A e 5A). A RON foi localizada no braço curto do segundo par submetacêntrico, sendo observada associação entre os pares portadores nas metáfases analisadas (Fig. 6).

Discussão

As populações de *G. brasiliensis* analisadas neste trabalho apresentaram $2n=48$ cromossomos correspondendo a uma característica considerada ancestral ou primitiva para a ordem e para a família as quais pertence (THOMPSON, 1979). Contudo, uma gama de variedades cromossômicas tanto morfológicas quanto com relação a marcadores cromossômicos foram observadas, indicando que essa espécie representa um estado evolutivo derivado entre os Cichlidae.

A presença de três citótipos provavelmente é devida a ocorrência de rearranjos cromossômicos durante a história evolutiva dessa espécie, com destaque para as inversões pericêntricas, pois não foi observada variação no número cromossômico. Segundo KASAHARA (2009), esse tipo de rearranjo é relativamente comum entre os vertebrados, principalmente se não resultam na perda ou ganho de material genético relevante a seus portadores, sendo responsável pelas diferenças cariotípicas interespecíficas ou interindividuais, como observado aqui com *G. brasiliensis*.

Estudos moleculares bem como morfológicos apontam *G. brasiliensis* como um complexo de espécies (KULLANDER, 1998; FARIAS et al., 2000; FELDBERG et al., 2003). Os dados citogenéticos obtidos até o momento corroboram com essa complexidade, pois observamos ampla variação no número de cromossomos SM entre localidades, ocorrendo de dois a oito cromossomos deste tipo (MICHELE e TAKAHASHI, 1977; THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a; MARTINS et al., 1995; VICARI et al., 2006a; PIRES et al., 2008). Neste trabalho, além de variações entre populações, divergências cariotípicas entre indivíduos de uma mesma população também foram encontradas. Essas diferenças foram apontadas como indicando a ocorrência de espécies crípticas no grupo '*Geophagus brasiliensis*', além da possibilidade de estarem englobando raças cromossômicas em um recente processo de especiação (FELDBERG et al., 2003). Hipótese semelhante foi apontada por MARTINS et al. (1995) os quais salientam que a ampla distribuição de *G. brasiliensis* acompanhada pelas diferenças cariotípicas observadas em vários locais pode ser um sinal de que diferentes espécies estão envolvidas.

Cabe destacar que em duas populações, onde foram observadas as maiores variações cariotípicas, é provável que as espécies tenham sido introduzidas. Tanto o lago Polegar como o Parque Ecológico Costa são de origem antrópica e, por isso, a introdução de espécies de diferentes populações pode ter levado a ocorrência dos três citótipos nesses locais. Contudo, na localidade do Arraial, formada por arroios que fazem a conexão entre lagos e lagoas da região, também foram encontrados os três citótipos. Devido ao baixo número de exemplares analisados, não podemos ter uma opinião conclusiva sobre a diversidade observada nesse local, porém o fato de tratar-se de uma região que interliga diferentes

ambientes pode indicar que essa região realmente apresente alta variabilidade cariotípica para *G. brasiliensis*. Assim, essa conexão natural entre diferentes corpos d'água, poderia estar colocando em contato populações que possivelmente diversificaram em alopatria, como também demonstrado por ARTONI et al. (2009) em outra região do sul do Brasil.

A presença de diferentes citótipos indicam que a variação no número de braços pode ser um bom marcador cromossômico para essa espécie, como destacaram VICARI et al. (2006a). Porém, pode-se observar que outras características também podem ser utilizadas como marcadores. Como é o caso do par portador da RON. Todas as populações estudadas nesse trabalho apresentam o primeiro par cromossômico submetacêntrico como o portador da RON, exceto a população da lagoa do Peixe, a qual apresenta RON na região telomérica do braço longo do primeiro par *st/a*. Em outros estudos a posição da RON também foi variável, sendo localizada no sexto par *st/a* (VICARI et al., 2006a; PIRES et al., 2008) bem como no décimo par *st/a* (MARTINS et al., 1995). Essas variações podem ser atribuídas a rearranjos cromossômicos, como também a diferenças na condensação da cromatina, levando a diferentes classificações cromossômicas para os pares em questão. Contudo, em todas as análises realizadas pelos autores acima citados, a presença da RON está condicionada à região telomérica do braço curto desses cromossomos, bem como ocorre nas populações analisadas no presente trabalho, exceto para da lagoa do Peixe. Essa situação pode ser relacionada com o cariótipo considerado ancestral, tanto para a família quanto para a ordem as quais *G. brasiliensis* pertence, composto por 48 cromossomos acrocêntricos (THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a). A localização da RON na região terminal do braço longo em um par cromossômico *st/a*, indica que a população da lagoa do Peixe representa um

estado mais primitivo quando comparado com as demais populações de *G. brasiliensis* analisadas, em que os genes organizadores nucleolares localizam-se em cromossomos de dois braços, considerados, evolutivamente, derivados nesse grupo. Portanto, a presença de RON no braço longo de um par ST/A na população de *G. brasiliensis* da lagoa do Peixe pode ser considerada uma característica plesiomórfica dessa espécie. Além do marcador cromossômico de localização da RON, a situação homomórfica para a população da lagoa do Peixe com $2n=48$ cromossomos, $4sm + 44st/a$, $NF=52$, ou seja, um maior número de cromossomos unibraquiais, também pode ser considerado em um estágio de menor diferenciação em relação as demais populações estudadas.

Uma situação comumente reportada para *G. brasiliensis* é o heteromorfismo dos homólogos portadores da RON. Nas populações analisadas no presente trabalho também observamos essa ocorrência, exceto nos exemplares da lagoa do Peixe. FELDBERG e BERTOLLO (1985b) destacam que esse heteromorfismo pode indicar tanto uma diferença na quantidade de cístrons ribossômicos entre essas RONs como também uma diferença na atividade desses genes. Aqui a utilização da técnica de FISH com sondas de rDNA 18S indica que o heteromorfismo da RON é devido a diferentes quantidades de cístrons ribossômicos entre os homólogos portadores da RON, o que reforça a idéia de que esse é o principal motivo para heteromorfismo de RON (CASTRO et al., 1998). Essas diferenças podem ser devidas a permutas desiguais durante a meiose, transposições, deleções ou duplicações que envolvam as sequências repetitivas dessa região (CASTRO et al., 1998; VICARI et al., 2006a, b).

O bandamento C apresentou blocos positivos principalmente na região pericentromérica de todos os citótipos aqui analisados. Contudo, diferenças dentro de cada citótipo de cada população foram observadas nas bandas teloméricas e intersticiais em alguns pares. Essa característica também foi observada não somente em *G. brasiliensis* (MARTINS et al. 1995; VICARI et al., 2006a; PIRES et al., 2008) como também em outras espécies de Cichlidae (FELDBERG et al., 2003). A variação na quantidade e localização das bandas C indica que eventos de duplicação e rearranjos da heterocromatina foram importantes durante a evolução dessa espécie, como foi destacado para outros grupos de Cichlidae (RONCATI et al., 2007).

Estudos sobre a localização do gene ribossômico rDNA 5S são escassos para a família Cichlidae. Dados para *G. brasiliensis* foram apresentados por VICARI et al. (2006a), os quais descreveram a localização do gene 5S na região intersticial do braço longo do décimo par st/a. Em outra espécie de Cichlidae, *Oreochromis niloticus*, a localização do gene 5S foi dispersa ocorrendo em um par submetacêntrico e um par subtelocêntrico (MARTINS et al., 2000). Neste trabalho, observamos uma variação na distribuição do gene ribossômico 5S para *G. brasiliensis*, nas populações em que a aplicação da FISH com sonda de rDNA 5S foi possível. Nas populações do canal São Gonçalo e no lago Polegar sua localização foi intersticial no quinto par st/a. Já nas populações da lagoa dos Quadros e lagoa do Peixe foi localizado na região terminal do braço longo do segundo par submetacêntrico. Segundo MARTINS et al. (2002), a localização do rDNA 5S ocorre em uma posição intersticial nos cromossomos da maioria das espécies de peixes, como também ocorre em mamíferos e anfíbios, sugerindo que essa posição confira alguma vantagem adaptativa na organização do

genoma dos vertebrados. Contudo, a localização do rDNA 5S na posição terminal de um par submetacêntrico indica que esse possa ser um estado derivado presente nas populações da lagoa do Peixe e lagoa dos Quadros, considerando que a posição intersticial é mais observada tanto entre os peixes como entre os vertebrados de maneira geral. Assim, um evento de rearranjo cromossômico do tipo inversão pericêntrica a partir da condição basal de um par acrocêntrico com sítios 5S intersticiais pode ter dado origem à posição divergente desse cístron ribossômico em *G. brasiliensis* dessa região, antes da formação das lagoas dos Quadros e do Peixe. Além disso, os cromossomos de dois braços são evolutivamente mais recentes para os Cichlidae, de modo que a localização do rDNA 5S em cromossomos submetacêntricos confere as populações da lagoa do Peixe e da lagoa dos Quadros um estado evolutivo mais derivado quando comparadas com as populações do lago Polegar e canal São Gonçalo, cujas marcações ocorrem em cromossomos st/a.

Concluindo, pode-se demonstrar que *G. brasiliensis* da região Sul do Brasil apresenta a característica basal de $2n=48$ cromossomos da família Cichlidae. Contudo, a ocorrência de três citótipos entre e dentro das populações analisadas indicam que durante o processo evolutivo dessa espécie, rearranjos cromossômicos, como as inversões pericêntricas, foram o principal evento que levou à diversidade cariotípica observada. Além disso, a diferença na localização da RON entre a população da lagoa do Peixe e as demais sugere que possivelmente um evento de rearranjo estrutural esteve envolvido na formação dessa divergência. Do mesmo modo, a localização do gene ribossômico 5S, em diferentes posições de dois pares cromossômicos, indica que outros eventos de rearranjos estiveram envolvidos durante a evolução dessa espécie. Segundo OLIVEIRA et al. (2009), espécies de peixes

Neotropicais caracterizadas por mobilidade reduzida e baixa densidade populacional geralmente apresentam ampla variabilidade cariotípica interspecífica e intraespecífica, e este parece ser o caso de *G. brasiliensis*.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas estão apresentadas em conjunto, no final desta dissertação.

Tabelas

Tabela I. Frequências dos citótipos I, II e III e suas respectivas porcentagens do total amostrado.

Citótipo Local	I	II	III	Total
Arraial, Rio Grande, RS	2	1	2	5
Lagoa dos Quadros, Capão da Canoa, RS	1	-	1	2
Lago Polegar, Rio Grande, RS	2	4	2	8
Parque Ecológico Costa, Curitiba, PR	2	5	3	10
Canal São Gonçalo, Arroio Grande, RS	3	-	-	3
Lagoa do Peixe, Mostardas, RS	5	-	-	5
Total	15 (45,4%)	10 (30,3%)	8 (24,3%)	33 (100%)

Figuras

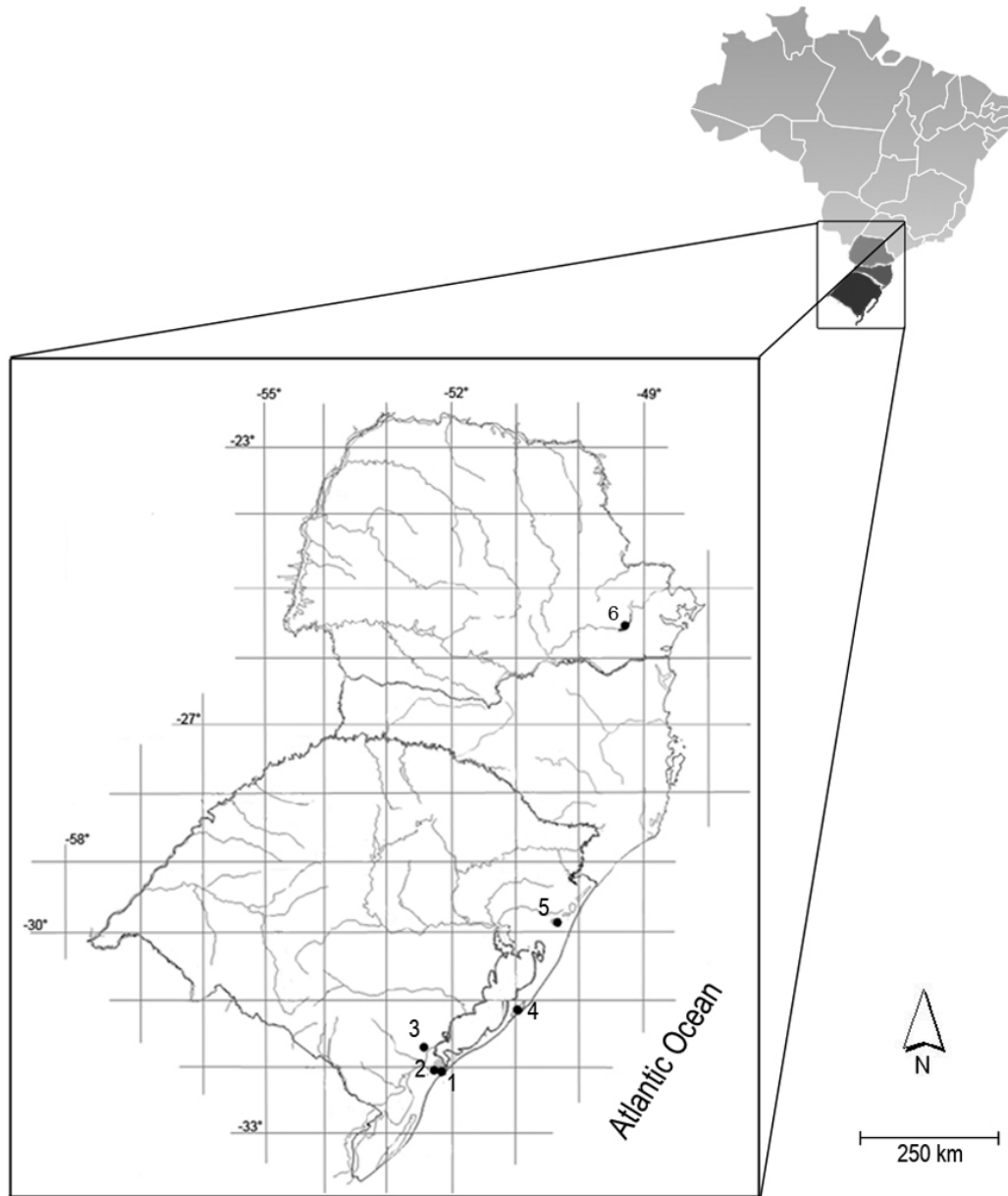


Figura 1. Locais de coleta: (1) Lago Polegar, Rio Grande; (2) Arraial, Rio Grande; (3) Canal São Gonçalo, Arroio Grande; (4) Lagoa do Peixe, Mostardas; (5) Lagoa dos Quadros, Capão da Canoa; (6) Parque Ecológico Costa, Curitiba.

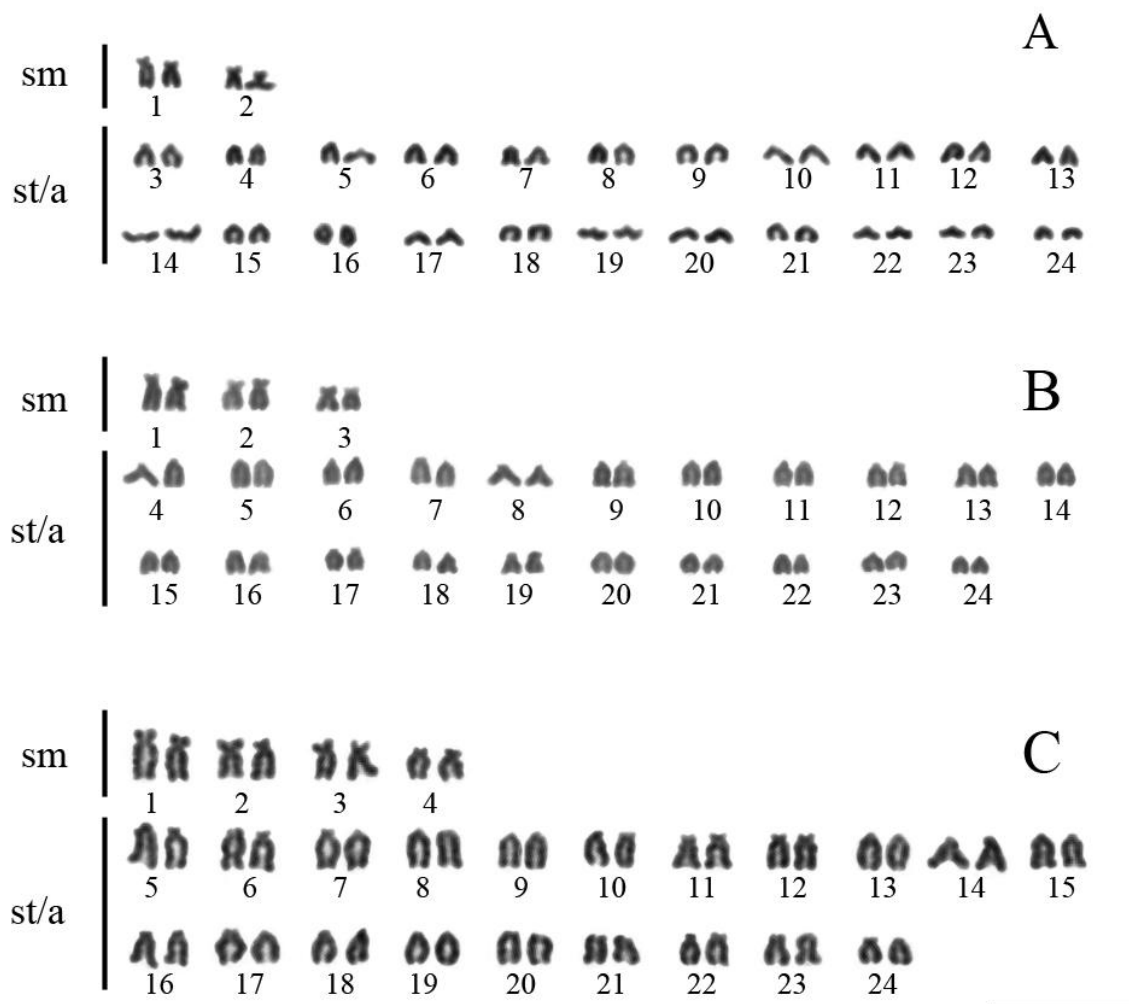


Figura 2. Citótipo I, II e III (A, B, C, respectivamente). Barra representa 5µm.

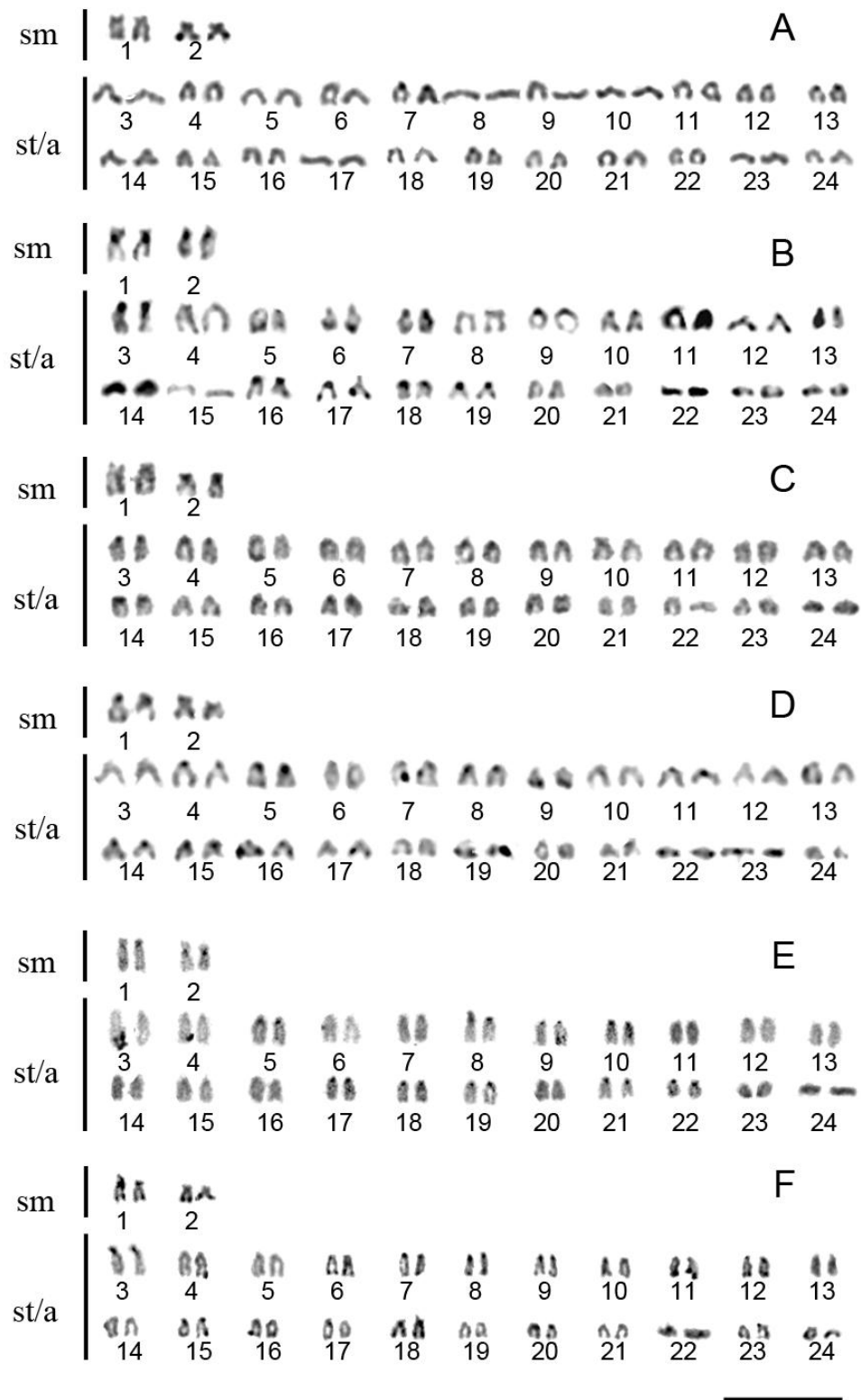


Figura 3. Citótipos I após bandamento C observado nas populações da lagoa dos Quadros (A), nos arroios do Arraial (B), no canal São Gonçalo (C), no lago Polegar (D), na lagoa do Peixe (E) e no Parque Ecológico Costa (F). Barra representa 5 μ m.

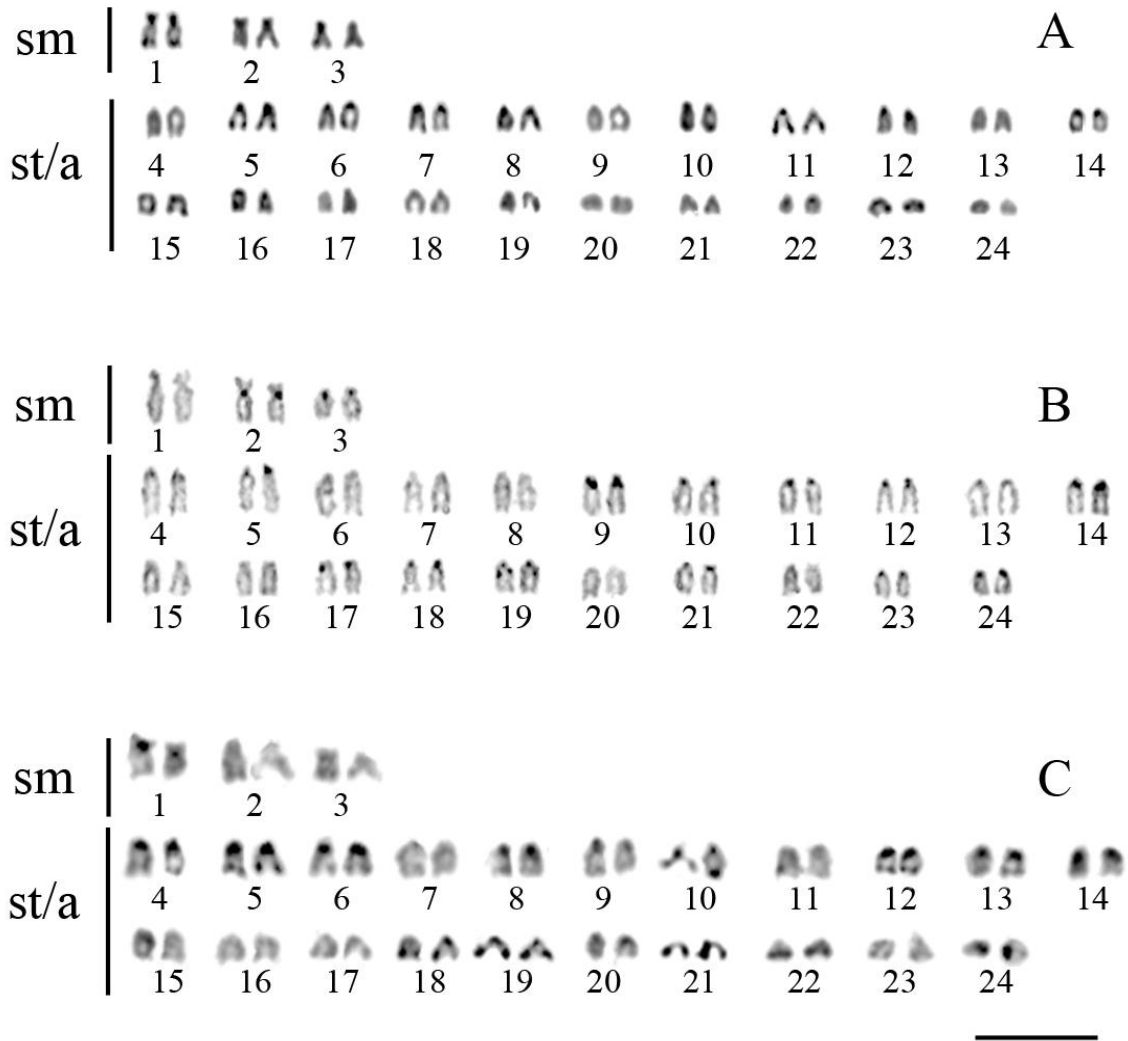


Figura 4. Citótipos II após bandamento C observado nas populações do Parque Ecológico Costa (A), do lago Polegar (B) e dos arroios do Arraial (C). Barra representa 5 μ m.

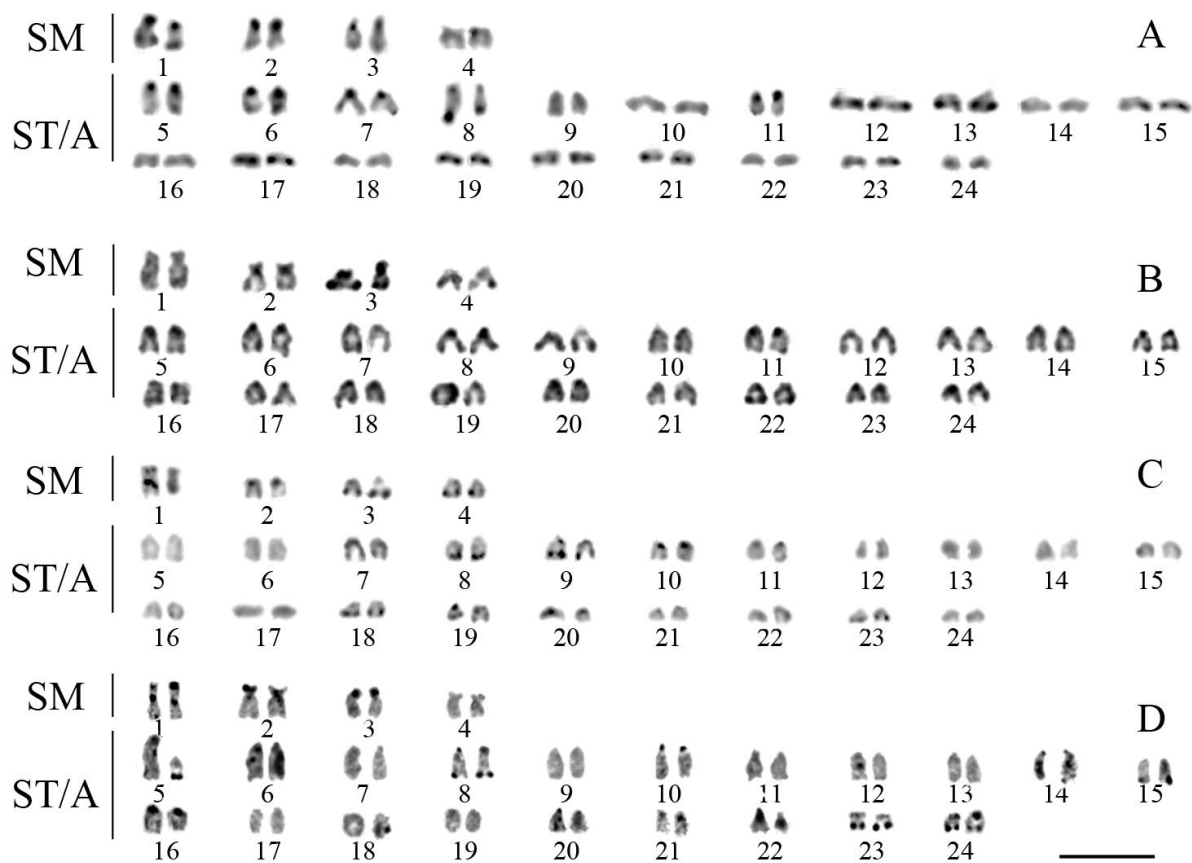


Figura 5. Citótipos III após bandamento C observado nas populações do Parque Ecológico Costa (A), da lagoa dos Quadros (B), do lago Polegar (C) e dos arroios do Arraial (D). A barra representa 5µm.


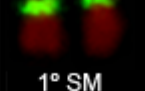

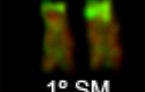
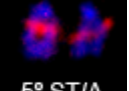


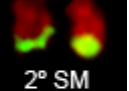

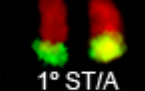
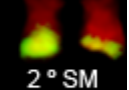





Marcador População	RON	FISH 18S	FISH 5S
Arroios do Arraial	 1° SM	 1° SM	
Lago Polegar	 1° SM	 1° SM	 5° ST/A
Lagoa dos Quadros	 1° SM	 1° SM	 2° SM
Lagoa do Peixe	 1° ST/A	 1° ST/A	 2° SM
Parque Costa	 1° SM	 1° SM	
Canal São Gonçalo	 1° SM	 1° SM	 5° ST/A

Figura 6. Pares cromossômicos portadores da RON marcados pela impregnação pelo nitrato de prata e pela FISH com sondas 18S e os portadores do gene ribossômico 5S marcados pela FISH com sonda de rDNA 5S nas diferentes populações analisadas.

CAPÍTULO III

Nota Científica

Polimorfismo de cromossomo B em *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Cichlidae, Perciformes)

Giselle Perazzo^{I*}; Rafael B. Noletto^I; Marcelo R. Vicari^{II}; Marta M. Cestari^I

^I Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19071, Centro Politécnico, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil e ^{II} Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, nº4748, Uvaranas, CEP: 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil.

Esta nota científica será submetida para o periódico *Neotropical Ichthyology*.

Resumo

É apresentada a caracterização citogenética para a espécie *Crenicichla lepidota* do litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foi observado $2n = 48$ cromossomos além da presença de 0 a 4 cromossomos supranumerários com variação inter e intraindividual.

Palavras-chave: ciclídeos – cromossomos supranumerários – Brasil

Texto

Os cromossomos Bs têm sido encontrado em todos os maiores grupos de animais e de plantas (CAMACHO et al., 2000), de modo que estima-se que estejam presentes em 15% de todas as espécies vivas (BEUKEBOOM, 1994; KASAHARA, 2009). Entre os peixes, a partir dos anos de 1980 com as primeiras descrições para *Alburnus alburnus* (HAFEZ et al., 1981) e para *Prochilodus scrofa*, hoje denominado *P. lineatus* (PAULS e BERTOLLO, 1983), muitas descrições de supranumerários foram realizadas, principalmente em peixes da região Neotropical (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Entre os Cichlidae, existem algumas evidências de cromossomos B, os quais foram descritos pela primeira vez em células germinativas de *Gymnogeophagus balzanii* (FELDBERG e BERTOLLO, 1984). Posteriormente foi observado em *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis* e *Crenicichla niederleini*, sendo descritos como “corpúsculos de cromatina” (MARTINS et al., 1995) e mais recentemente em *Cichla* sp., *Cichla monoculus*, *Crenicichla reticulata*

(FELDBERG et al., 2004) e em *Crenicichla lepidota* (PIRES, 2008), como pequenos cromossomos B.

De modo a contribuir com o conhecimento citogenético de Cichlidae, este trabalho teve o objetivo de caracterizar uma população de *C. lepidota* de uma lagoa costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, a fim de fornecer dados relevantes para inferências citotaxonômicas e evolutivas deste grupo.

Foram analisados nove espécimes, sendo duas fêmeas e sete machos, provenientes da lagoa dos Quadros, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29°45'S e 50°03'W). As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior usando tratamento de colchicina *in vivo* (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva foi detectada usando método de bandamento C (SUMNER, 1972) e as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram detectadas usando coloração com nitrato de Prata (HOWELL e BLACK, 1980). Corantes base-específicos diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Cromomicina A₃ (CMA₃) foram utilizados para a identificação de regiões ricas em pares de base A-T e G-C, respectivamente (SCHWEIZER, 1976). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi usada para localização do sítio de rDNA seguindo PINKEL et al. (1986), com algumas modificações. Foi utilizada uma sonda para rDNA 18S (cerca de 1800 pares de base) a qual foi obtida a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004). Para marcação das sondas foi utilizado o procedimento de “nick translation” com uso do kit Bionick Labeling System (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

As metáfases com melhor morfologia e dispersão cromossômica foram capturadas através do sistema de captura digital Applied Spectral Imagem, acoplado ao microscópio Carl Zeiss Axiophot. As análises cromossômicas foram realizadas através do software Case Data Manager Expo 4.0 e as medições cromossômicas realizadas conforme LEVAN et al. (1964). O cálculo para o número fundamental de braços (NF) levou em consideração os cromossomos metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) como apresentando dois braços e os cromossomos subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) com um braço cromossômico.

Exemplares testemunhos foram depositados na coleção científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a identificação UFGRS11180 e os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Paraná, baseado nos princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências do Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

A análise de 94 metáfases de *C. lepidota* apresentou número diplóide igual a 48 cromossomos, com fórmula cariotípica de 2m, 4sm e 42st/a, acrescidos de 0, 2, 3 ou 4 cromossomos B, ao quais apresentam variação inter e intraindividualmente. A frequência de indivíduos portadores de supranumerários foi de 33,3%. Os cromossomos B apresentam tamanho e morfologia semelhante aos demais do complemento, sendo observado cromossomos dos tipos m, sm e st/a. Todas as metáfases apresentam uma constrição secundária no primeiro par do complemento, o qual é destacadamente maior que os demais. A banda C mostrou-se positiva acima da constrição secundária no primeiro par e na região

centromérica de alguns pares cromossômicos na maioria das metáfases. No entanto, nenhum cromossomo foi totalmente heterocromático ou demonstrou acúmulo de heterocromatina, situação comum em cromossomos B.

A hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S evidenciou marcação sob a constrição secundária do primeiro par, mesma região marcada pela coloração AgRON e pelo fluorocromo CMA₃, evidenciando que esta região apresenta grande quantidade de bases G-C. Resultado que pode ser confirmado pela coloração com fluorocromo DAPI, o qual evidenciou bandas negativas nesta mesma região.

A fórmula cariotípica de seis cromossomos m/sm e 42 cromossomos st/a para *C. lepidota* da Lagoa dos Quadros foi correspondente com a observada para esta espécie de outras populações (THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a; MARTINS et al., 1995; RONCATI et al., 2007; PIRES, 2008). Somente as populações do canal São Gonçalo e do lago Polegar (Cap. I), localizados no limite sul do Brasil, *C. lepidota* apresenta diferente fórmula cariotípica, composta por oito cromossomos de dois braços (PERAZZO et al., manuscrito em preparação). Em todas as análises, o primeiro cromossomo do complemento é destacadamente maior que os demais e, geralmente, com uma conspícua constrição secundária. FELDBERG et al. (2003) destacam que esta é uma característica comum para *Crenicichla*, de modo que há uma certa homogeneidade cariotípica no gênero onde o primeiro par cromossômico é muito característico.

A localização da Região Organizadora de Nucléolo (RON) para *C. lepidota* da lagoa dos Quadros foi evidenciada, tanto pela impregnação com nitrato de Prata como pela

FISH com sonda de rDNA 18S, no primeiro par cromossômico, juntamente com a constrição secundária. Essa situação também foi observada para outras populações de *C. lepidota* (FELDBERG e BERTOLLO, 1985a; FENOCCHIO et al., 2003; PIRES, 2008), e também em outras espécies do gênero, como *C. niederleinii* (LOUREIRO et al., 2000; RONCATI et al., 2007), *C. iguassuensis* (MIZOGUCHI et al., 2007), *C. vittata*, *C. lacustris* (FELDBERG e BERTOLLO, 1985b), *C. inpa*, *C. reticulata*, *C. cincta* (BENZAQUEM et al., 2008). E essa situação não só é observada em *Crenicichla*, mas também para a família Cichlidae, a qual pode ser caracterizada como possuindo um único par de cromossomos portadores da RON, geralmente o primeiro (FELDBERG et al., 2003), indicando que esta é uma pleisiomorfia para o grupo (FELDBERG e BERTOLLO, 1985b). Contudo, *C. lepidota* do rio Paraná apresenta RONS múltiplas, localizadas nos pares 1 e 5, de modo que esta característica foi apontada como uma apomorfia para esta população (MARTINS et al., 1995).

Com relação à heterocromatina, o padrão comumente encontrado nos ciclídeos em geral, com bandas preferencialmente na região pericentromérica dos cromossomos (FELDBERG et al., 2003), também foi observado na população de *C. lepidota* aqui analisada. A presença de heterocromatina fortemente associada com RONS é frequentemente observada em peixes (GALLETI Jr, 1998) e encontrada em diversas espécies do gênero *Crenicichla* adjacente à constrição secundária (MARTINS et al., 1995; LOUREIRO et al., 2000; MIZOGUCHI et al., 2007; BENZAQUEM et al., 2008; RONCATI et al., 2007; PIRES, 2008).

Apesar de apresentar características muito similares com outras populações e espécies de *Crenicichla*, *C. lepidota* da lagoa dos Quadros apresentou cromossomos supranumerários. Em peixes, existem muitas descrições de cromossomos Bs (MAISTRO et al., 2000; NÉO et al., 2000a,b; PORTELA-CASTRO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009; entre outros), de forma que podemos observar que estes cromossomos podem variar com relação ao tamanho, à morfologia, ao número, e podem inclusive estar restritos a um gênero (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992; ARTONI et al., 2006; NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Com relação aos ciclídeos, as observações de cromossomos Bs feitas até hoje, apontam cromossomos pequenos ou puntiformes (FELDBERG e BERTOLLO, 1984; MARTINS et al., 1995; FELDBERG et al., 2004; PIRES, 2008), diferentes daqueles observados neste trabalho. Aqui, *C. lepidota* apresenta cromossomos Bs de tamanho semelhante aos demais do cariótipo que variam com relação à morfologia. OLIVEIRA et al. (2009) destacam que morfologicamente os cromossomos Bs de peixes Neotropicais são, na maioria das vezes, microcromossomos, mas que existem casos de cromossomos de diferentes tamanhos e formas, como por exemplo em *Astyanax eigenmanniorum*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis*, *A. cf. schubarti*, *A. sp. B*, *Apareiodon piracicabae*, *Oligosarcus pinto* e *Hisonotus leucofrenatus*. O presente trabalho apresenta a população de *C. lepidota* da lagoa dos Quadros como um desses casos, além de representar uma exceção entre os ciclídeos portadores de cromossomos supranumerários, já que é a única população, até então, que apresenta polimorfismo de cromossomos B.

A heterocromatinização parece ser um processo comum na história evolutiva dos cromossomos Bs, já que com frequência eles são encontrados totalmente heterocromáticos.

Contudo, existem inúmeros exemplos de que muitas vezes a marcação evidenciada pelo bandamento C pode não ocorrer ou apresentar menor intensidade de coloração nesses cromossomos (KASAHARA, 2009). Em peixes, essa situação já foi observada em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI et al., 1989), em *Steindachnerina insculpta* (OLIVEIRA e FORESTI, 1993) e em *Characidium cf. zebra* (VENERE et al., 1999), por exemplo. Nas demais espécies de Cichlidae com ocorrência de cromossomos Bs, todos foram totalmente heterocromáticos, diferente do que foi observado aqui para *C. lepidota*. VENERE et al. (1999) sugeriram que a ocorrência de cromossomos supranumerários eucromáticos em espécies de Characiformes são um forte indicativo de que esses cromossomos Bs se originaram de maneira independente nesse grupo de peixes, de modo que a heterocromatina não teve papel na origem e desenvolvimento desses cromossomos em todas as espécies. Apesar do pouco conhecimento acerca de cromossomos Bs em Cichlidae, pode-se inferir que essa situação descrita para os Characidae também ocorra entre os ciclídeos, uma vez que encontramos espécies com cromossomos B heterocromáticos (FELDBERG e BERTOLLO, 1984; MARTINS et al., 1995; FELDBERG et al., 2004; PIRES, 2008) e eucromáticos (presente trabalho). Além disso, pode-se considerar que os cromossomos Bs da população analisada neste trabalho são evolutivamente recentes, levando-se em consideração o pouco tempo de formação geológica das atuais lagoas da costa gaúcha (cerca de 6000 anos A.P.) (LOPES et al., 2005). Dessa forma, há um forte indício de que a origem desses cromossomos Bs seja recente e, por isso, o processo de heterocromatinização, que parece ser a rota evolutiva para diferenciação dos cromossomos supranumerários, ainda não tenha se dado nessa população.

Esta é a segunda descrição de cromossomos supranumerários para a espécie *C. lepidota*. PIRES (2008), analisando populações do lago Guaíba, também no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, observou a ocorrência de cromossomos extra nesta espécie. A autora encontrou de 1 a 3 supranumerários de pequeno tamanho e totalmente heterocromáticos. Ambas as populações, lago Guaíba e lagoa dos Quadros, localizam-se proximamente, na costa do Estado do Rio Grande do Sul. Em estudos com *C. lepidota* de outras populações não foram observados cromossomos Bs (THOMPSON, 1979; FELDBERG e BERTOLLO, 1985a,b; MARTINS et al., 1995; RONCATI et al., 2007). Assim, essa região formada por lagos e lagoas no litoral sul brasileiro parece apresentar condições ecológicas ótimas para a existência de espécies portadoras de cromossomos extras, como *C. lepidota* (JONES e REES, 1982). Além disso, a presença de cromossomos Bs totalmente heterocromáticos na população do lago Guaíba, em contrapartida com a ausência de cromossomos heterocromáticos da lagoa dos Quadros, indica fortemente que a origem dos cromossomos Bs nessa última população é mais recente, como exposto anteriormente.

FELDBERG et al. (2004) sugerem a origem de cromossomos B em ciclídeos amazônicos pela bioacumulação de metal pesado presente em ambiente contaminado, em *C. reticulata*, e por falha de barreiras reprodutivas entre espécies no caso de *C. monoculus* e *C. sp.* Para *C. lepidota*, tanto da lagoa dos Quadros como do lago Guaíba, a contaminação ambiental é um forte indicativo de origem dos cromossomos B nesta espécie. Ambos os locais estão inseridos em centros urbanos com sérios problemas ambientais, situação observada em quase todos os estudos de cromossomos B em peixes os quais, geralmente, são oriundos de áreas afetadas por poluição ou pela construção de represas. Dessa forma, a hipótese de origem

de cromossomos supranumerários como subprodutos do estresse ambiental, originados por alterações de cromossomos normais e mantido nas populações como polimorfismos cromossômicos (OLIVEIRA et al., 2009) é plausível para *C. lepidota*, sendo a provável origem e manutenção dos cromossomos B na população aqui estudada. Nessa hipótese, erros de não disjunção meiótica seguido de mecanismos de acúmulo de cromossomos B acarretadas por taxas de transmissão não mendelianas poderiam explicar a alta frequência populacional destes cromossomos (CAMACHO et al., 2000).

Assim, a variação intra e interindividual do número de cromossomos em *C. lepidota* da lagoa dos Quadros sugere a presença variável de cromossomos B, tanto de morfologia metacêntrica, quanto acrocêntrica, porém sem acúmulo de heterocromatina. Análises futuras para a variação do número de cromossomos em *C. lepidota* da população lagoa dos Quadros são necessárias para análise do comportamento desses cromossomos durante a divisão celular. Deste modo, a análise de células meióticas será útil para um maior detalhamento da origem, composição e manutenção destes possíveis cromossomos Bs nesta população, e sua recorrência na espécie *C. lepidota* no estado do Rio Grande do Sul.

Figuras

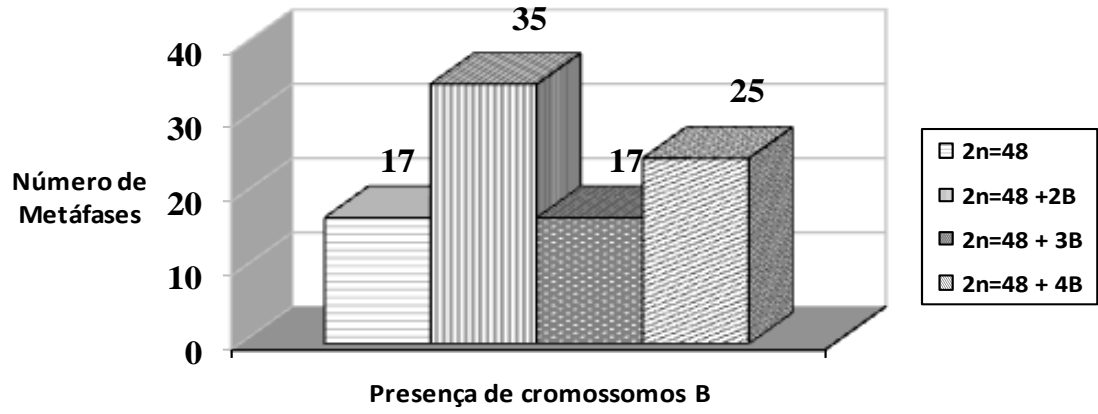


Figura 1. Frequência de cromossomos Bs em *Crenicichla lepidota*.

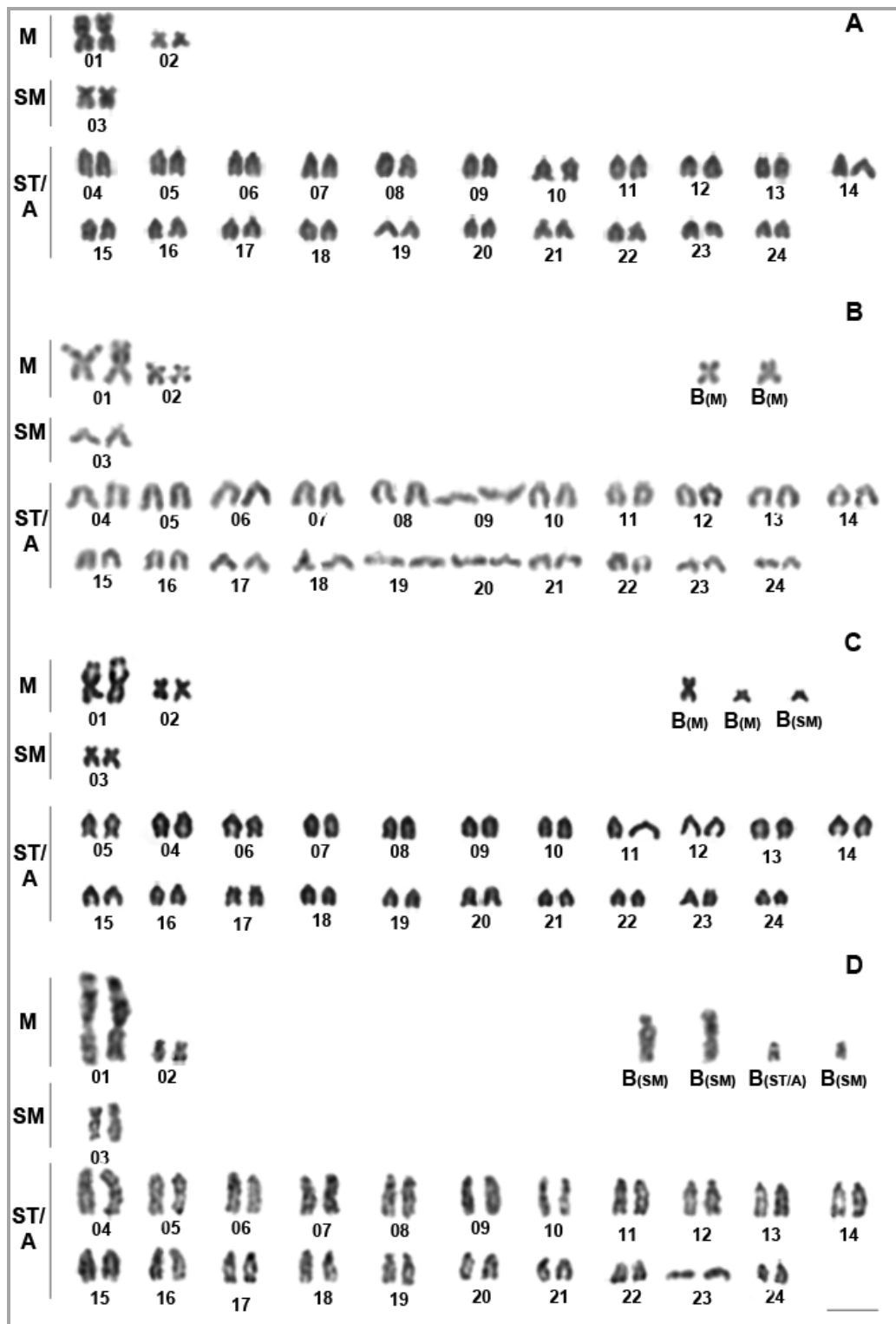


Figura 2. Citótipos de *Crenicichla lepidota* com $2n=48$ (A), $2n=48+2B$ (B), $2n=48+3B$ (C) e $2n=48+4B$ (D). A barra representa $5\mu\text{m}$.

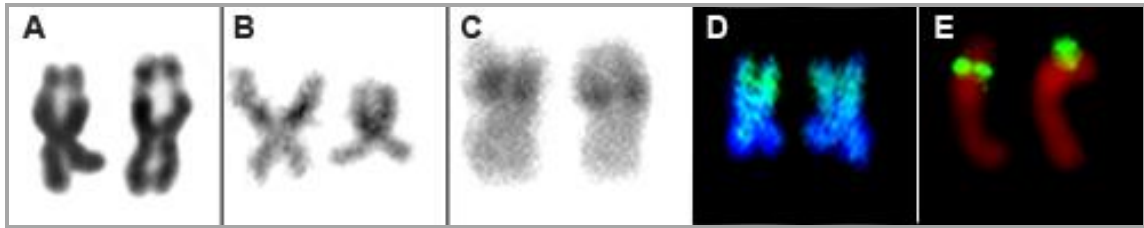


Figura 3. Destaque do primeiro par metacêntrico de *Crenicichla lepidota* após coloração com Giemsa (A), bandamento C (B), AgRON (C), dupla-coloração CMA₃/DAPI (D) e FISH 18S (E).

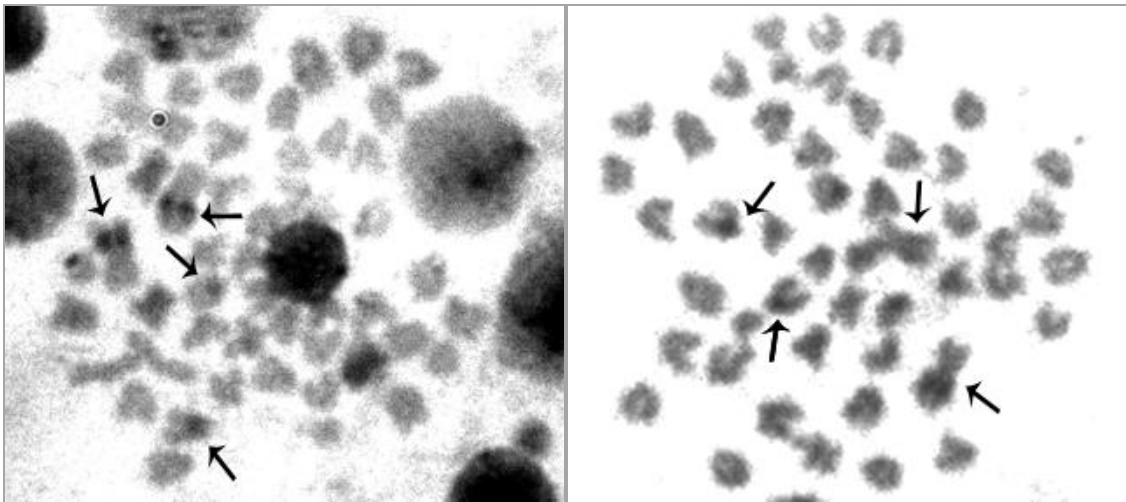


Figura 4. Metáfases após bandamento C indicando bandas heterocromáticas em alguns pares cromossômicos (setas).

CONCLUSÕES

Este trabalho pôde evidenciar em ciclídeos da região Sul do Brasil, especialmente do Estado do Rio Grande do Sul onde há escassez de dados, características comumente encontradas nos Cichlidae. Porém, também foram observados dados peculiares e de importância para inferências futuras no estudo desta família de peixes. De um modo geral pode-se destacar as seguintes conclusões deste trabalho:

- A presença de 48 cromossomos nas três espécies analisadas corrobora com a característica considerada ancestral para a família Cichlidae. Contudo, a variação na morfologia cromossômica tanto inter como intraespecífica, indica que rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos, como as inversões pericêntricas, foram o principal evento de diferenciação cromossômica durante o processo evolutivo desses ciclídeos.
- A espécie *Geophagus brasiliensis* das localidades estudadas apresentou três citótipos. Isto pode corroborar com a hipótese de um complexo de espécies ou espécies crípticas possam estar envolvidas nesse grupo.
- Presença de cromossomos Bs euromáticos e de tamanho e morfologia semelhante aos do complemento A.
- A ocorrência de quebras cromossômicas em *C. lepidota* do canal São Gonçalo indicando necessidade de estudos genotóxicos.
- Os dados obtidos no presente trabalho, embora preliminares, são importantes como fonte de dados para inferências futuras na compreensão da evolução desse grupo de peixes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON R.C. e KOCHER T.D. (2006). Genetic and Development Basis of Cichlid Trophic Diversity. **Heredity**, 97: 211-221.

AREAL COSTA (2009). Disponível em <<http://www.arealcosta.com.br/meioambiente.html>>. Acesso em 10 de junho de 2009.

ARTONI R.F.; BERTOLLO, L.A.C. (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, 106: 209-214.

ARTONI R.F., VICARI M.R. e BERTOLLO L.A.C. (2000). Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. **Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences**, 6: 43-60.

ARTONI R.F., VICARI M.R., ENDLER A.L., CAVALLARO Z.I., JESUS C.M., ALMEIDA M.C., MOREIRA-FILHO O e BERTOLLO L.A.C. (2006) Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, 127: 277-284.

ARTONI R.F., VICARI M.R., ALMEIDA, M.C., MOREIRA-FILHO, O. e BERTOLLO, L.A.C. (2009). Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 19: 393-401.

BENZAQUEM D.C., FELDBERG E., PORTO J.I.R., GROSS M.C. e ZUANON J.A.S. (2008). Cytotaxonomy and Karyoevolution of the Genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). **Genetics and Molecular Biology**, 31: 250-255.

BERTOLLO LAC, TAKAHASHI CS e MOREIRA-FILHO O. (1978). Cytotaxonomy Considerations on *Hoplis lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 1:103-120.

BERTOLLO L.A.C., MOREIRA-FILHO O. e GALETTI JR P.M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: Considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, 28: 153-159.

BEUKEBOOM L.W. (1994). Bewildering Bs: An Impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, 73: 328-336.

BÖHLKE J.E, WEITZMAN S.H e MENEZES N.A. (1978). Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazon**, 8 (4): 657-677.

- BRUM M.J.I e GALETTI JR P.M. (1997). Teleostei Ground Plan Karyotype. **J. Comp. Biol.**, 2: 91–102.
- BUCKUP P.A. (1999). *Sistemática e Biogeografia de Peixes de Riachos*. In: Caramaschi E.P., Mazzoni R. & Peres-Neto P.R. (Eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Rio de Janeiro, PPGE-UFRJ, pp.91-138.
- CAMACHO J.P.M., SHARBEL T.F. e BEUKEBOOM L.W. (2000). B-chromosome Evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 355: 163-178.
- CASTRO J., SÁNCHEZ L. e MARTÍNEZ P. (1998). Analysis of the Inheritance of NOR Size Variants in Brown Trout (*Salmo trutta*). **The Journal of Heredity**, 89: 264-266.
- CCAC – Canadian Council on Animal Care. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. (1993). Editado por: Olfert E.D., Cross B.M. & McWilliam A.A.
- CHAKRABARTY P. (2004). Cichlids Biogeography: Comment and Review. **Fish and Fisheries**,5: 97-119.
- DENTON T.E. (1973). **Fish Chromosome Methodology**. Springfield: Charles C. Thomas Publisher.

EGOSCUE J. (1971). Estudios cromossómicos. Preparaciones directas. In **Técnicas em Citogenética**. Barcelona, Editorial Espaxs, pp. 15-37.

FARIAS I.P., ORTÍ G., SAMPAIO I., SCHNEIDER H. e MEYER A. (1999). Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. **Journal of Molecular Evolution**, 48: 703-711

FARIAS I.P., ORTÍ G. e MEYER A. (2000). Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. **Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)**, 288: 76-92.

FELDBERG E. e BERTOLLO L.A.C. (1984). Discordance in Chromosome Number Among Somatic and Gonadal Tissue Cells on *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces: Cichlidae). **Revista Brasileira de Genética**, 6: 639-645.

FELDBERG E. e BERTOLLO L.A.C. (1985a). Karyotypes of 10 Species of Neotropical Cichlids (Pisces, Perciformes). **Caryologia**, 38: 257-68.

FELDBERG E. e BERTOLLO L.A.C. (1985b). Nucleolar Organizing Regions in Some Species of Neotropical Cichlid Fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia**, 38: 319-24.

- FELDBERG E., PORTO J.I.R. e BERTOLLO L.A.C. (2003). Chromosomal changes and adaptation of Cichlidae fishes during evolution. In: Val A.L. & Kapoor B.G. (eds.). **Fish Adaptation**. New Delhi e New York, Science Publishers, pp. 258-308.
- FELDBERG E., PORTO J.I.R., ALVES-BRINN M.N., MENDONÇA M.N.C. e BENZAQUEM D.C. (2004). B Chromosomes in Amazonian Cichlid Species. **Cytogenetic and Genome Research**, 106: 195-198.
- FENOCCHIO A.S., PASTORI M.C., RONCATI H.A., MOREIRA FILHO O. e BERTOLLO L.A.C. (2003). A Cytogenetic Survey of the Fish Fauna from Argentina. **Caryologia**, 56: 197-204.
- FEPAM. **Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – RS**. (2009). Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/>>. Acesso em 12 de agosto de 2009.
- FORESTI F., ALMEIDA-TOLEDO L.F. e TOLEDO-FILHO S.A. (1989). Supernumerary Chromosome System, C-banding Pattern Characterization and Multiple Organizer Regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 79: 107-114.
- FRANKHAN R., BALLOU J.D. e BRISCOE D. A. (2008). **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SBG. Galetti-Jr. P.M. (1998). Chromosome

Diversity in Neotropical Fishes: NOR Studies. **Italian Journal of Zoology**, 65: 53-6.

GALETTI JR. P.M. (1998). Chromosome Diversity in Neotropical Fishes: NOR Studies. **Italian Journal of Zoology**, 65: 53-6.

GASTON K.J. e SPICER J.I. (2004). **Biodiversity: An introduction**. Oxford, Blackwell Publishing Company.

GROOMBRIGDE B. (1992). **Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources**. London, Chapman & Hall.

GROSS M.C., FELDBERG F., CELLA D.M., SCHNEIDER M.C., SCHNEIDER C.H., PORTO J.I.R. e MARTINS C. (2009). Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity**, 102:435-441.

GRÜTZMACHER D.D., GRÜTZMACHER A.D., AGOSTINETTO D., LOECK A.E., ROMAN R., PEIXOTO S.C. e ZANELLA R. (2008). Monitoramento de Agrotóxicos em Dois Mananciais Hídricos no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 12: 632-637.

GUERRA M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

- HAASE J., STRINGUINI M.H., SILVA M.L.B.C., RODRIGUES M.L.K. e KOCH S.M.V. (2002). Qualidade das Águas Superficiais do Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul. In: **22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Joinvile, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- HAFEZ R., LABAT R. e QUILLIER R. (1981). Recherches Sur les Chromosomes Surnuméraires de i'ablette (*Alburnus alburnus*). **Cybium**, 5: 81-87.
- HATANAKA T. e GALETTI-JR P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S Ribosomal RNA Genes in the Fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122(3): 239-244.
- HELFMAN G.S., COLLETTE B.B., FACEY D.E. e BOWEN B.W. (2009) **The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology**. 2 ed. Hong Kong, Wiley-Blackwell.
- HONCATI H.A., PASTORI M.C. e FENOCHIO A.S. (2007). Cytogenetic studies and evolutive considerations on fishes of the family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). **Cytologia**, 72: 379-384.
- HOWELL W.M. e BLACK D.A. (1980). Controlled Silver Staining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective Colloidal Developer: A 1-step Method. **Experientia**, 3: 1014-1015.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

(2009). Disponível em: <
<http://www.ibama.gov.br/siucweb/mostraUc.php?seqUc=66>>. Acesso em 12 de agosto de 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2007). **População recenseada e estimada, segundo os municípios - Rio Grande do Sul**. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>

JIM S.M. e TOLEDO V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cien. Cult.**, 27: 1122-1124.

JONES R.N. e REES H. (1982). **B Chromosomes**. London, Academic Press.

KANTEK D.L.Z. (2005). Estudo Citogenético Comparativo entre Populações de uma Espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) Endêmica do Rio Iguaçu. **Dissertação**. Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KASAHARA S. (2009). **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

- KEENLEYSIDE M.H.A. (1991). *Parental Care*. In: Keenleyside M.H.A. (Ed). **Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution**. New Delhi, Chapman and Hall, pp.191-208.
- KULLANDER S.O. (1998). *A Phylogeny and Classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes)*. In Malabarba L.R., Vari R.P., Lucena Z.M.S. & Lucena C.A.S. (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucs, pp 461-498.
- KULLANDER S.O. (2003). *Family Cichlidae*. In: Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris-Jr C.J. (Eds). **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucs, pp 605-655.
- LEVAN A., FREDGA K.E. e SANDBERG H.A. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.
- LOPES R.P., BUCHMANN F.S.C., CARON F. e ITUSARRY M.E.G.S. (2005). Barrancas Fossilíferas do Arroio Chuí, RS - Importante megafauna pleistocênica no extremo sul do Brasil. In: Winge M., Schobbenhaus C., Berbert-Born M., Queiroz E.T., Campos D.A., Souza C.R.G. & Fernandes A.C.S. (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. Publicado na Internet em 31/10/2005 no endereço <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio119/sitio119.pdf> Brasil.

- LOUREIRO M.A. (1999) Análise Citogenética em Quatro Espécies da Família Cichlidae. **Dissertação**. Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LOUREIRO M.A., CAETANO L.G. e DIAS A.L. (2000). Cytogenetic Characterization of Two Species of the Genus *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae). **Cytologia**, 65: 57-63.
- LOWE-MCCONNELL R.H. (1991). *Ecology of Cichlids in South American and African Waters, excluding the African Great Lakes*. In: Keenleyside M.H.A. (Ed). **Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution**. New Delhi, Chapman and Hall, pp.60-85.
- MAGURRAN A.E. (2004). **Measuring Biological Diversity**. Oxford, Blackwell Publishing Company.
- MAISTRO E.L., OLIVEIRA C. e FORESTI F. (2000). Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) Using Different Restriction Enzyme Banding and Staining Methods. **Genetica**, 108: 119-125.
- MARTINS I.C., PORTELLA-CASTRO A.L.B. e JULIO JR H.F. (1995). Chromosome Analysis of 5 Species of the Cichlidae Family (Pisces-Perciformes) from the Parana River. **Cytologia**, 60: 223-31.

- MARTINS C. e GALETTI-JR P.M. (1999). Chromosomal Localization of 5S rDNA Genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7: 363-367.
- MARTINS C., WASKO A.P., OLIVEIRA C. e WRIGHT J.M. (2000). Nucleotide Sequence of 5S rDNA and Localization of the Ribosomal RNA Genes to Metaphase Chromosomes of the Tilapiine Cichlid Fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas**, 133: 39-46.
- MARTINS C., WASKO A.P., OLIVEIRA C., PORTO-FORESTI F., PARISE-MALTEMPI P.P., WRIGHT J.M. e FORESTI F. (2002). Dynamics of 5S rDNA in the Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Genome: Repeated Units, Inverted Sequences, Pseudogenes and Chromosome Loci. **Cytogenetic and Genome Research**, 98: 78-85.
- MARTINS C. e WASKO A.P. (2004). *Organization and Evolution of 5S Ribosomal DNA in the Fish Genome*. In: Williams C.R. (Ed.). **Focus on Genome Research**. New York, Nova Science Publishers, pp.335-364
- MESQUITA D.R., PORTO J.I.R. e FELDBERG E. (2008). Chromosomal Variability in the Wild Ornamental Species of *Symphysodon* (Perciformes: Cichlidae) from Amazon. **Neotropical Ichthyology**, 6: 181-90.

- MICHELE J.L. e TAKAHASHI C.S. (1977). Comparative Cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). **Cytologia** 42: 535-537.
- MICHELE J.L., TAKAHASHI C.S. e FERRARI I. (1977). Karyotypic Study of Some Species of the Family Loricariidae (Pisces). **Cytologia** 42: 539-546.
- MILLER S. e HARLEY J. (2006). **Zoology**. 7^a Ed. New York, McGraw-Hill Science Engineering.
- MIZOGUCHI S.M.H.K., PORTELA-CASTRO A.L.B. e MARTINS-SANTOS I.C. (2007). Cytogenetic Characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes) of the Iguaçu River. **Genetics and Molecular Research**, 6: 650-656.
- MOLINA W.F. e GALETTI JR. P.M. (2002). Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) Involving Chromosomes Bearing 5S rRNA Genes. **Genetics and Molecular Biology**, 25: 373-377.
- NELSON J.S. (2006). **Fishes of the World**. New York, John Wiley & Sons.
- NÉO D.M., BERTOLLO L.A.C. e MOREIRA FILHO O. (2000A). Morphological Differentiation and Possible Origin of B Chromosomes in Natural Brazilian Population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 108: 211-215.

- NÉO D.M., MOREIRA-FILHO O. e CAMACHO J.P.M. (2000b). Altitudinal Variation for B Chromosome Frequency in the Characid Fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, 85: 136-141.
- NIRCHIO M e OLIVEIRA C. (2006). **Citogenética de Peces**. Porlamar, Gráficas Internacional.
- OLIVEIRA C. e FORESTI F. (1993). Occurrence of Supernumerary Microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curumatidae). **Cytobios**, 76: 183-186.
- OLIVEIRA C. (2005). Revisão dos Estudos Citogenéticos em Peixes Neotropicais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia**, 80: 7-9.
- OLIVEIRA C. FORESTI F. e ALMEIDA-TOLEDO L.F. (2007). Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F & Kapoor B. G (Eds). **Fish Cytogenetics**. Enfield, Science Publisher.
- OLIVEIRA C., FORESTI F. e HILSDORF A.W.S. (2008). Genetics of Neotropical Fish: From Chromosomes to Populations. **Fish Physiology and Biochemistry** 35: 81-100.
- OLIVEIRA C., FORESTI F. e HILSDORF A.W.S. (2009). Genetics of Neotropical Fish: From Chromosomes to Populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35: 81-

- 100.Pauls E. & Bertollo L.A.C. (1983). Distribution of a Suprnumerary Chromosome System and Aspects of Karyotypic Evolution in the Genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, 81: 117-123.
- OYHERNART-PERERA M.F., LUENGO J.A. e BRUM-ZORRILA N. (1975). Estudio Citogenetico de *Cichlasoma facetum* (Jennyns) y *Crenicichla sexatilis* (Linn) (Teleostei, Cichlidae). **Revista Del Uruguai**, 3: 29-36.
- PAULS E. e BERTOLLO L.A.C. (1983). Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36:307-314.
- PENDÁS A.M., MORÁN P. e GARCIA-VÁSQUEZ E. (1993). Ribosomal RNA Genes are Interspeded Throughout a Heterochromatin Chromosome Arm in Atlantic Salmon. **Cytogenetic Cell Genetics**, 63: 128-130.
- PIRES L.B. (2008). Análises Citogenéticas em Peixes da Família Cichlidae (Perciformes) de Diferentes Bacias Hidrográficas. **Dissertação**. Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- PIRES L.B., GIULIANO-CAETANO L. e DIAS A.L. (2008). Karyotype Similarities Among Two Populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi River Basin/PR/Brazil. **Caryologia**, 61: 135-138.

PORTELA-CASTRO A.L.B., JÚLIO JR H.F. e NISHIYAMA P.B. (2001). New Occurrence of Microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: Analysis of the Synaptonemal Complex. **Genetica**, 110: 277-283.

POUGH F. H., HEISER J.B. e MCFARLAND W.N. (1999). **A vida dos Vertebrados**. 2 ed. São Paulo, Atheneu.

REIS R.E., KULLANDER S.O. e FERRARIS JR C.J. (2003). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucs.

RÍCAN O. e KULLANDER S.O. (2006). Character- and Tree-Based Delimitation of Species in the 'Cichlasoma' facetum Group (Teleostei, Cichlidae) with the Description of a New Genus. **JZS** 44, 136-52.

RIO GRANDE VIRTUAL, **Site da Cidade do Rio Grande**. Disponível em: <http://www.riograndevirtual.com.br/cidade/dados/aspectosfisicos/index.html>. Acesso em 13 de agosto de 2009.

SALVADOR L.B. e MOREIRA FILHO O. (1992). B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, 69: 50-56.

SCHWEIZER D. e LOIDL J. (1987). A Model for Heterochromatin Dispersion and the Evolution of C Bands Patterns. **Chromosomes Today**, 9: 61-74.

- SCHWEIZER D. (1976). Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, 58: 307-324.
- SEMA. (2008). Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. **Relatório anual sobre a situação dos recursos hídricos no estado do Rio Grande do Sul, edição 2007/2008**. Porto Alegre.
- SUMNER A.T. (1972). A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-305.
- THOMPSON K.W. (1979). Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. **Copeia**, 1979: 304-691.
- TOLEDO V. e FERRARI I. (1976). Estudo Citogenético em Três Espécies do Gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Científica**, 4: 101-106.
- VARI R.P. e MALABARBA L.R. (1998). *Neotropical Ichthyology: An Overview*. In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S. & Lucena C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucs, p. 1-11.
- VENERE P.C., MIYAZAWA C.S. e GALETTI JR. P.M. (1999). New Cases of Supernumerary Chromosomes in Characiform Fishes. **Genetics and Molecular Biology**, 22: 345-349.

VERVOORT A. (1980) The Karyotypes of Seven Species of Tilapia (Teleostei: Cichlidae).
Cytologia, 45: 651-656.

VICARI M.R., ARTONI R.F., MOREIRA-FILHO O. e BERTOLLO L.A.C. (2006a). Basic
and Molecular Cytogenetics in Freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes).
Karyotypic Conservadorism and Divergence. **Caryologia**, 59: 260-266.

VICARI, M.R., ALMEIDA, M.C., BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA-FILHO, O. e ARTONI,
R.F. (2006b). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the
polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes,
Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, 29: 621-625.

ANEXOS

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram coletados 55 exemplares da família Cichlidae, tendo como representantes as espécies *Geophagus brasiliensis*, *Crenicichla lepidota* e *Australoheros facetus* (Fig. 1; Tabela I). Todos os espécimes foram encaminhados para identificação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com exemplares testemunhos depositados nesta coleção sob os números UFRGS11179, UFRGS11180, UFRGS11181, UFRGS11182, UFRGS11183, UFRGS11184, UFRGS11185, UFRGS11186, UFRGS11187.



Figura 1. Exemplares de *Geophagus brasiliensis* (A), *Crenicichla lepidota* (B) e *Australoheros facetus* (C).

Tabela I. Número de exemplares coletados nos diferentes pontos de amostragem.

	<i>Crenicichla lepidota</i>		<i>Australoheros facetus</i>		<i>Geophagus brasiliensis</i>		Total
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
Canal São Gonçalo	4	1	-	-	1	2	8
Arroios do Arraial	-	-	-	-	2	3	5
Lago Polegar	2	1	2	3	2	6	16
Lagoa do Peixe	-	-	-	-	2	3	5
Lagoa dos Quadros	2	7	-	-	1	1	11
Parque Ecológico Costa	-	-	-	-	5	5	10
Total	17		5		33		55

Coletas

As coletas foram realizadas em diversas localidades da região Sul do Brasil, englobando a região litorânea do Rio Grande do Sul e região metropolitana de Curitiba, Paraná (Fig. 2).

Foram utilizados como métodos de pesca armadilhas do tipo covo, redes de espera, anzóis e redes de arrasto. Nas coletas realizadas no canal São Gonçalo, na lagoa do Peixe e na lagoa dos Quadros, o procedimento para obtenção de metáfases ocorreu no local da coleta. Os animais coletados no Arraial e no lago Polegar foram processados no Laboratório de Genética Universidade Federal do Rio Grande, enquanto que a coleta realizada no Parque Costa teve os procedimentos citogenéticos realizados no laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal do Paraná.

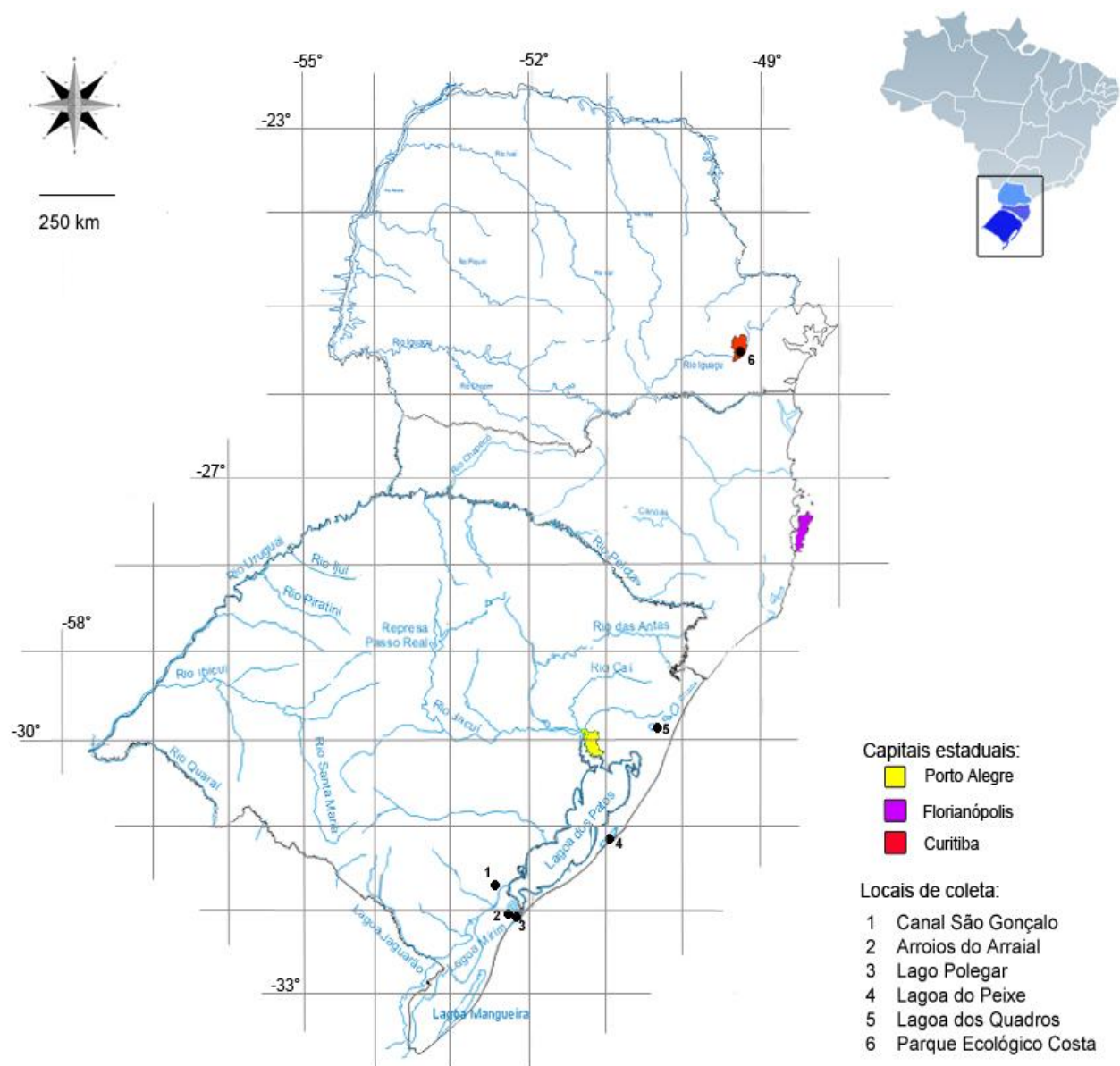


Figura 2. Mapa hidrográfico da região Sul do Brasil, com os locais de coleta.

Descrição dos Locais de Coleta

Canal São Gonçalo, Arroio Grande, RS

Localizado na região sudeste do Rio Grande do Sul, o canal São Gonçalo (Fig. 3A) faz a conexão entre dois importantes sistemas aquíferos gaúchos, a Lagoa Mirim e a Laguna dos Patos. É afluente do rio Piratini, fazendo parte da bacia hidrográfica São Gonçalo-Mangueira (FEPAM, 2009), a qual engloba as formações geomorfológicas da Planície Costeira e do Escuro Sul-Riograndense. É um importante recurso hídrico para a região, sendo a demanda estimada em 96,53% para irrigação principalmente de lavoura de arroz (SEMA, 2008). As coletas para este trabalho foram realizadas no distrito de Santa Isabel do Sul (32°08'S e 52°34'W), pertencente ao município de Arroio Grande, RS.

Arroios do Arraial, Rio Grande, RS

O Município do Rio Grande localiza-se na planície costeira sul do Estado do Rio Grande do Sul, sendo uma bacia de sedimentação recente, com características marcantes de colmatagem em evolução, não apresentando condições para a presença de rios. Somente arroios e lagoas constituem os elementos de sua hidrografia sofrendo com intensidade a formação de alagamentos, pois os lençóis freáticos estão muito próximos a superfície do solo que é formada em toda a sua extensão do tipo arenoso (RIO GRANDE VITUAL, 2009). No presente trabalho foram realizadas coletas na localidade do Arraial, região rural do município de Rio Grande, em arroios que se comunicam com a laguna dos Patos e pequenos lagos da região (32°27'S e 52°46'W) (Fig. 3B).

Lago Polegar, Rio Grande, RS

O *campus* da Universidade Federal do Rio Grande (Fig. 3C) apresenta lagos ao longo de sua extensão, bem como regiões de inundação, formando banhados em alguns pontos específicos. Os lagos são de origem antrópica, originados a partir de escavações para construção dos prédios da Universidade, havendo, nos períodos chuvosos, conexões entre os banhados originais da região e os lagos de origem antrópica. As coletas para este trabalho foram realizadas no lago Polegar (32°11'S e 52°19'W).

Lagoa do Peixe, Mostardas, RS

Pertencente à Unidade de Conservação Parque Nacional da Lagoa do Peixe, localizado no litoral sul-rio-grandense, a lagoa do Peixe pertence a um complexo lagunar com ecossistema peculiar, sendo um importante local de refúgio de aves migratórias. A região pertence à bacia hidrográfica do Litoral Médio (FEPAM, 2009), apresentando área de vasta planície arenosa, resultante das extensas e numerosas restingas que barram as lagoas costeiras, havendo ocorrência de dunas paralelas à orla marinha (IBAMA, 2009). As coletas foram realizadas no litoral do município de Mostardas, RS (Fig. 3D), em pequenos lagos na região de dunas localizados no entorno da Lagoa do Peixe (31°08'S e 50°48'W).

Lagoa dos Quadros, Capão da Canoa, RS

A lagoa dos Quadros, pertencente à Bacia do Rio Tramandaí, localiza-se entre os municípios de Capão da Canoa e Maquiné, no nordeste do estado do Rio Grande do Sul

(FEPAM, 2009). Os principais rios dessa bacia são o Tramandaí, Maquiné e Três Forquilhas (SEMA, 2008), englobando o Planalto Meridional e a Planície Costeira desse estado (FEPAM, 2009). As coletas foram realizadas na face leste da lagoa dos Quadros em pequenos corpos d'água formados no entorno da lagoa ($29^{\circ}45'S$ e $50^{\circ}03'W$), no município de Capão da Canoa, RS (Fig. 3E).

Parque Ecológico Costa

Localizado no município de Curitiba, PR, o Parque Ecológico Costa ($25^{\circ}50'S$ e $49^{\circ}27'W$; Fig. 3F) foi criado a partir de um antigo areal de onde foram retirados materiais durante 40 anos. Hoje, após um projeto de recuperação, o parque é um local destinado ao lazer, em especial a atividade de pesque-pague, possuindo a extensão de 1 milhão e 500 mil m^2 . É considerado pelo Instituto Ambiental do Paraná como parte integrante do Parque Metropolitano do Iguaçu (Areal Costa, 2009).

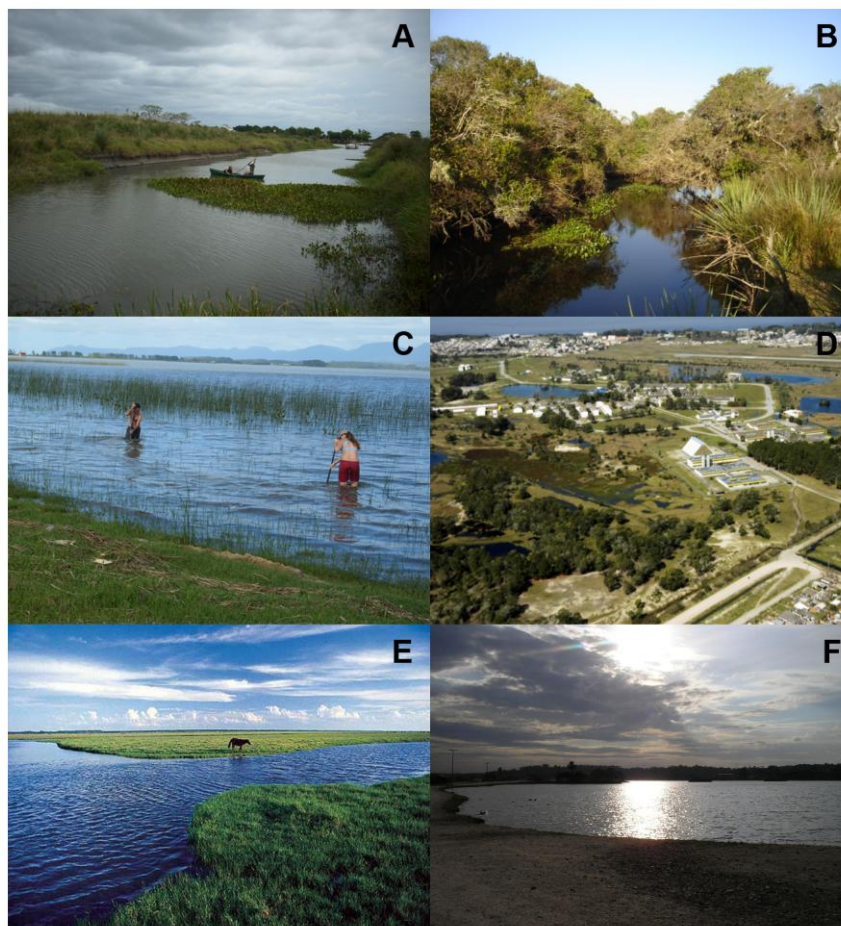


Figura 3. Locais de coleta. **(A)** Canal São Gonçalo, Arroio Grande, RS, **(B)** Arraial, Rio Grande, RS, **(C)** Lagoa dos Quadros, Capão da Canoa, RS, **(D)** *Campus* da FURG, Rio Grande, RS, **(E)** Lagoa do Peixe, Mostardas, RS, **(F)** Parque Costa, Curitiba, PR.

Procedimentos Citogenéticos

Obtenção de Metáfases Mitóticas - Tratamento “*in vivo*”

Foi utilizada a técnica de preparação direta para a obtenção dos cromossomos mitóticos descrita por Egoscue (1971) e modificada por Bertollo *et al.*, (1978), com algumas alterações:

- Injetar intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitoral e ventral, solução aquosa de colchicina (0,025%) correspondendo a 1ml/100g do peso do animal;
- Colocar o peixe em aquário aerado por cerca de 60 minutos. Após, anestesiá-lo e retirar seu rim anterior;
- Lavar o material retirado em solução hipotônica de KCl (0,075M), transpondo para pequenas cubas de vidro contendo aproximadamente 10 ml de KCl;
- Fragmentar o material usando seringa hipodérmica sem agulha, por meio de leves aspirações e expirações do material, até que se obtenha uma solução homogênea, a fim de facilitar a separação das células;
- Incubar a solução à 37°C por 35 minutos;
- Ressuspender o material, vagarosamente, usando uma pipeta Pasteur e transferir a solução para um tubo de centrífuga;
- Pingar algumas gotas de fixador (metanol:ácido acético – 3:1) recém preparado e ressuspender o material. Centrifugá-lo por 10 minutos a 1200 rpm e descartar o sobrenadante com a pipeta Pasteur;
- Adicionar ao tubo 5-7 ml do fixador preparado, deixando escorrer pelas paredes deste e ressuspender novamente o material usando a pipeta Pasteur;

- Repetir por duas vezes os itens 7 e 8, sendo que após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, adicionar 1 ml do fixador e ressuspender bem o material, para posterior armazenamento em frascos do tipo “ependorff” e então guardado em congelador.

Coloração Cromossômica Convencional – Giemsa

Para análise das metáfases, e posterior montagem dos cariótipos, seguiu-se o seguinte procedimento de coloração convencional:

- Pingar duas gotas da suspensão celular obtida em lâmina recém lavada e esquentada com água à 70°C, permitindo que o excesso de material escorra inclinando a lâmina sobre um papel absorvente.
- Secar as lâminas em temperatura ambiente.
- Corar com Giemsa à 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 10 minutos.
- Lavar as lâminas com água destilada e secar naturalmente.

Coloração com Nitrato de Prata – Ag-RONs

A técnica utilizada foi a descrita por Howell & Black (1980), com algumas modificações:

- Pingar uma gota de material sobre a lâmina recém limpa e secar ao ar.
- Pingar uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de nitrato de prata 50% (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina.
- Cobrir com lamínula.
- Levar a lâmina à estufa a 60°C em uma placa de petri forrada com papel filtro umedecido, até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada.
- Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar.

Banda C: Detecção da Heterocromatina Constitutiva

Para o estudo da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

- Colocar a lâmina preparada em solução de HCl 0,2N, a 42°C por 15 minutos.
- Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar.
- Colocar a lâmina em solução de hidróxido de bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 25°C por 1 ½ minuto.
- Imergir a lâmina rapidamente em ácido HCl 2N e lavar com jatos de água destilada.

- Colocar a lâmina em solução de 2XSSC por ½ hora à 60°C.
- Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar.
- Corar o material com Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos.

Hibridação fluorescente in situ (FISH) com sondas DNAr 18S e 5S

A metodologia empregada seguiu Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. A sonda de DNA ribossômico do fragmento 18S (cerca de 1800pb) foi obtida a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004). A sonda de DNAr 5S (cerca de 120 pb) foi obtida a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) (Martins e Galetti, 1999). Para marcação da sonda foi utilizado o procedimento de “nick translation” com uso dos kits Bionick Labeling System (Invitrogen) e Nick Translation Biotin (Roche), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Posteriormente a marcação das sondas, foi realizado o procedimento de hibridação *in situ* fluorescente. As etapas foram as seguintes:

- Lavagem das lâminas, contendo as preparações cromossômicas, em tampão PBS 1x durante 5 minutos, em temperatura ambiente com agitação.
- Desidratação em série alcoólica (70, 85 e 100 v/v) por 5 minutos cada e secar as lâminas.

- Incubação das lâminas em solução com 100µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC), sob lamínula a 37°C por 1 hora em câmara úmida.
- Lavagem das lâminas três vezes por 5 minutos cada com 2xSSC.
- Lavagem das lâminas em PBS 1x durante 5 minutos.
- Fixação em formaldeído 1% em PBS 1x com MgCl₂ 50mM por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Lavagem em PBS 1x por 5 minutos com agitação.
- Desidratação das lâminas em série de etanol gelado (70, 85 e 100 v/v) por 5 minutos cada e secar as lâminas.
- Desnaturação do DNA cromossômico com formamida 70%, 30% 2xSSC a 70°C por 5 minutos. Simultaneamente, desnaturação da solução de hibridação à 100°C por 10 minutos, sendo esta mantida em gelo até sua utilização.
- Desidratação do material em série alcoólica 70% (a temperatura de -20°C), 85% e 100% durante 5 minutos cada. Deixar as lâminas secar.
- Montagem da lâmina com 50µL de solução de hibridação coberta por uma lamínula.
- A solução de hibridação foi constituída de 2,5 ng/µL de DNA sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano;
- Incubação das lâminas em câmara úmida a 37°C por 12 horas (overnight).
- Passado o tempo de hibridação, lavar duas vezes as lâminas em formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 10 minutos, sob agitação a 42°C.

- Lavagem das lâminas 3 vezes em 0.1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada, sob agitação.
- Lavagem das lâminas por 5 minutos em solução de Tween 20 (0,05%/4xSSC), sob agitação.
- Incubar as lâminas em tampão NFDM (non fat dry milk) 5%/4xSSC por 15 minutos.
- Lavagem das lâminas duas vezes por 5 minutos cada com Tween 20.
- Incubação das lâminas com 100 µl de streptavidina FITC conjugada 1:500 (0,2 µl de streptavidina FITC conjugada / 99,8 µL NFDM) durante 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- Lavagem com agitação das lâminas por três vezes com Tween 20 a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada.
- Desidratação das lâminas em série alcoólica gelada (70, 85 e 100v/v) por 5 minutos cada e secar as lâminas.
- Montagem das lâminas com 25µL da solução de iodeto de propídeo (200µL de antifading mais 8µL de iodeto de propídeo concentrado - 50µg/mL). As lâminas são guardadas no escuro.
- Análise em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro azul (450-490nm de comprimento de onda).

Dupla coloração com DAPI/CMA₃

Para estudo da heterocromatina através do uso de corantes base-preferenciais, utilizaram-se os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI, de acordo com SCHWEIZER et al. (1976):

- Colocar cerca de 80 µL de solução de cromocina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora;
- Escorrer a lamínula e lavar com água corrente e secar levemente;
- Colocar cerca de 80µL de solução DAPI/antifading, retirar o excesso em papel filtro;
- Analisar após quinze minutos.

Estudos Cariotípicos

As lâminas foram analisadas em microscópio binocular e as metáfases mitóticas que apresentaram melhor morfologia, condensação e dispersão dos cromossomos foram capturadas por sistema digital de imagens com microscópio Leica DMLS2 acoplado a este o sistema de captura Leica DFC300FX e pelo sistema de captura digital Applied Spectral Image, acoplado ao microscópio Carl Zeiss Axiophot.

Identificação Cromossômica

A identificação cromossômica foi feita com base em Levan *et al.* (1964), através de medições cromossômicas realizadas com o software Adobe® Photoshop® CS2, conforme a relação de braços (RB), de acordo com os valores abaixo:

- Metacêntricos (M): 1,00 – 1,70
- Submetacêntricos (SM): 1,71 – 3,00
- Subtelocêntricos (ST): 3,01 – 7,00
- Acrocêntricos (A): >7,01.

Para cálculo do Número Fundamental de braços (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos, submetacêntricos foram considerados de dois braços, enquanto os subtelocêntricos e acrocêntricos constituídos por um único braço.

LICENÇA PARA COLETAS (IBAMA)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16782-1	Data da Emissão: 26/09/2008 10:40	Data de Validade: 26/09/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2932599	Nome: giselle xavier perazzo	CPF: 009.447.620-93
Título do Projeto: Análise Citogenética de Cichlidae do Sul do Brasil		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ		CNPJ: 75.095.679/0001-49

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da Infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

Entrar em contato com a equipe técnica deste ParNa nas datas que antecederem as coletas:

1. Entregar cópia dos resultados finais da referida pesquisa.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO GRANDE	RS	ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAIM	UC Federal
2		RS	PARQUE NACIONAL DA LAGOA DO PEIXE	UC Federal
3	RIO GRANDE	RS	Canal São Gonçalo	UC Estadual
4		RS	Lagoa dos Quadros	Fora de UC
5	PORTO ALEGRE	RS	Lago Gualiba	Fora de UC
6	CHAPECO	SC	Rio Chapecó	Fora de UC
7	BLUMENAU	SC	PARQUE NACIONAL DA SERRA DO ITAJAI	UC Federal
8	JOINVILLE	SC	Rio Araçá	Fora de UC
9	CHAPECO	SC	Rio Uruguai	Fora de UC
10	MORRETES	PR	Rio Jacaré	Fora de UC
11	SÃO MIGUEL DO IGUAÇU	PR	PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU	UC Federal
12		RS	Lagoa dos Fatos	Fora de UC
13		RS	Lagoa da Emboaba	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cichlidae
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Cichlidae (*Qtde: 20)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do ibama/sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89696452



Página 1/3

CERTIFICADO DO COMITÊ EM ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 378

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.049872/2008-63

APROVADO: 10/06/2009 – R.O. 05/2009

TÍTULO:

Análise citogenética de Cichlidae (Perciformes) do Sul do Brasil

AUTORES:

Marta Margarete Cestari, Giselle Xavier Perazzo, Marcelo Ricardo Vicari

DEPARTAMENTO:

Genética

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA

QUEBRAS CROMOSSÔMICAS EM *CRENICICHLA LEPIDOTA*

Os exemplares de *Crenicichla lepidota* coletados no Canal São Gonçalo apresentaram quebras cromossômicas, bem como fragmentos cromossômicos. Com relação às essas quebras cromossômicas, cabe destacar alguns dados sobre o local onde os espécimes foram coletados. O canal São Gonçalo localiza-se na região sudeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Faz a conexão entre dois grandes aquíferos: a Lagoa Mirim e a Laguna dos Patos, com lavouras de arroz irrigado nas suas duas margens, sendo um significativo recurso hídrico utilizado pelos orizicultores da região, que o utilizam para captação de água com fins à irrigação de suas lavouras. E é também para este canal que converge a devolução da água utilizada nas lavouras, o qual poderá estar recebendo resíduos de agrotóxicos (GRÜTZMACHER et al., 2008). Também é a fonte de abastecimento de água para o município do Rio Grande, que possui mais de 194,000 habitantes (IBGE, 2007).

Monitoramentos da água do canal São Gonçalo já foram conduzidos apresentando algumas substâncias e poluentes que podem estar afetando o material genético dos peixes, como observado nos cromossomos de *C. lepidota* neste trabalho. Foram observados níveis elevados de cromo, além de agrotóxicos como Carbofuran, Quinclorac, Clomazone, Fipronil nas águas do canal São Gonçalo (HAASE et al., 2003; GRÜTZMACHER et al., 2008). Estudos mais específicos devem ser realizados para melhor compreensão da razão pela qual quebras cromossômicas foram encontradas em *C. lepidota* do canal São Gonçalo. Porém, cabe ressaltar que os dados obtidos nesse trabalho indicam que a água deste canal, utilizada tanto para irrigação de lavouras como para abastecimento humano, pode estar com sérios problemas

com relação à genotoxicidade. A presença quebras cromossômicas em *C. lepidota*, indica que esta espécie pode ser utilizada futuramente como bioindicador em estudos de genotoxicidade.



Figura 4. Metáfases de *Crenicichla lepidota* com quebras cromossômicas (setas). Barra representa 5 μ m.