

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO  
TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL

**DIANDRA SOARES ALVES**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DAS  
SUBFAMÍLIAS PRISTELLINAE E *Astyanax* CLADE  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) PERTENCENTES À  
BACIA DO RIO IGUATEMI, MS, BRASIL.**

Mundo Novo - MS

Agosto/2017

**DIANDRA SOARES ALVES**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DAS  
SUBFAMÍLIAS PRISTELLINAE E *Astyanax* CLADE  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) PERTENCENTES A  
BACIA DO RIO IGUATEMI, MS, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao curso de Tecnologia em Gestão Ambiental  
da Universidade Estadual de Mato Grosso do  
Sul, como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Tecnólogo em Gestão Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Mundo Novo – MS

Agosto/2017

**DIANDRA SOARES ALVES**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DAS  
SUBFAMÍLIAS PRISTELLINAE E *Astyanax* CLADE  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE) PERTENCENTES A  
BACIA DO RIO IGUATEMI, MS, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Tecnologia em Gestão Ambiental da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau Tecnólogo em Gestão Ambiental.

APROVADO EM \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes - Orientador – UEMS \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Diovani Piscor – UEMS \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Cristina de Pierre Castilho- UEMS \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a meu esposo e  
companheiro Eliton.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a realização deste trabalho só foi possível devido a força que Jeová me concedeu, a vida dia após dia e ao refugio que oferecia em sua presença.

Ao professor e orientador Drº Carlos Alexandre Fernandes pela orientação e paciência e por ter dividido seu conhecimento que foi de suma importância para minha formação pessoal e profissional.

A UEMS pelo seu espaço físico.

Em especial: meu esposo Eliton que esteve comigo nas horas boas e difíceis de minha graduação, me escutando e me apoiando pra seguir em frente e me dando bronca quando eu pensava em desistir.

Também agradeço a minha mãe e meu pai que sempre estiveram a meu lado escutando meus desabafos quando eu acreditava que nada mais tinha solução viável eles me apontavam uma direção.

Agradeço também a todos os funcionários e professores que me deram apoio nos momentos mais desafiadores desses três anos que passei na UEMS, pessoas essas, que se tornou mais que amigos, se tornaram minha família.

Ao apoio de todas as pessoas que participaram de forma direta ou indireta de minha formação como tecnóloga em gestão ambiental.

A todos os colegas que sempre estavam dispostos a auxiliarem nas coletas de peixes.

Também agradeço ao FUNDECT e ao CNPq pelas bolsas de iniciação que foram concedidas a mim.

*“Eu não sei o que quero ser, mas sei muito bem o que não quero me tornar”*

Friederich Nietzsche

## APRESENTAÇÃO

O presente estudo foi organizado em dois capítulos, possibilitando uma melhor discussão e compreensão dos resultados obtidos. Sendo o primeiro referente aos resultados obtidos em duas espécies de *Astyanax*, e tem por título: Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil, já o segundo descreve os resultados obtidos *Moenkhausia sanctaefilomenae*, tendo como título: Nova ocorrência de microcromossomos B em uma população de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae).

## SUMÁRIO

### Capítulo I

Análise citogenética em duas espécies do gênero <i>Astyanax</i> (Characiformes, Characidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil. ....	8
Resumo.....	9
Introdução .....	10
Materiais e métodos:	
a) Coleta dos espécimes .....	11
b) Preparações para análise citogenética .....	11
Resultados .....	12
Discussão .....	13
Referências .....	15

### Capítulo II

Nova ocorrência de microcromossomos B em uma população de <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i> (Pisces, Characidae).....	18
Resumo.....	19
Introdução .....	20
Materiais e métodos:	
a) Coleta dos espécimes .....	21
b) Preparações para análise citogenética .....	21
Resultados .....	21
Discussão .....	23
Referências .....	24



# CAPÍTULO I

**Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax*  
(Characiformes, Characidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil**

## **Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) da Bacia do rio Iguatemi, MS, Brasil**

### **Resumo**

A ordem Characiformes é o grupo mais dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a mais complexa e mais numerosa desta ordem. A maioria das espécies em Characidae apresenta  $2n=50/2n=52$  cromossomos, sendo que o gênero *Astyanax* é bastante numeroso e tem mostrado em estudos já realizados uma ampla variação do número diplóide, com 36 cromossomos em *Astyanax schubarti* até 52 cromossomos em *Astyanax sp.* Diante das diversidades cariotípicas encontradas dentro do gênero *Astyanax*, o presente estudo teve por objetivo caracterizar citogeneticamente duas espécies de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) do córrego Guaçu (bacia do rio Iguatemi), a fim de contribuir como novos dados citogenéticos em *Astyanax altiparanae* e *Astyanax paranae*. Os exemplares de *A. paranae* e *A. altiparanae* apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos. Os espécimes analisados de *A. paranae* apresentaram fórmula cariotípica de  $6m+24sm+8st+12a$ , com número fundamental de braços igual a 88, sendo igual para ambos os sexos. A Região Organizadora de Nucléolo (RON) ficou evidente em posição terminal no braço curto de um par submetacêntrico, sendo coincidente com a constrição secundária. No entanto, os espécimes analisados de *A. altiparanae* mostraram fórmula cariotípica de  $8m+22sm+10st+10a$ , com número fundamental de braços igual a 90, mantendo-se para ambos os sexos. Sendo que a RON foi detectada em posição terminal em um dos homólogos de um par submetacêntrico e na posição terminal do braço curto de um par subteloentrico. Variações da macroestrutura cromossômica são discutidas em *A. altiparanae* e *A. paranae*.

Palavras-chave: Bandeamentos cromossômicos, RONS, evolução cariotípica, caracídeos.

## Introdução

A ordem Characiformes é o grupo mais dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a mais complexa e mais numerosa desta ordem (FOWLER, 1948; NELSON, 1984; BRITSKI *et al.*, 1999), sendo capaz de apresentar plasticidade fenotípica e capacidade de adaptação em diferentes habitats (JEFERRY, 2001; DAWLING *et al.*, 2002).

De acordo com Lima *et al.* (2003) 88 gêneros e 620 espécies, anteriormente considerados como integrantes das subfamílias Tetragonopterinae, Cheirodontinae, Characinae, Bryconinae, Paragoniatinae, Aphyocharacinae e Acestrorhynchinae foram alocados em *incertae sedis* na família Characidae. Desta forma, Mirande (2010) e Oliveira *et al.*, (2011) através de análises moleculares reanlizaram a árvore filogenética de Characidae e aquelas alocadas em *incertae sedis* agora estão dentro de outras subfamílias: *Astyanax* clade, *Hemigrammus* clade, *Jupiaba* clade, *Moenkhausia*, entre outras.

A maioria das espécies em Characidae apresenta  $2n=50/2n=52$  cromossomos, sendo que uma característica marcante compartilhada por muitas espécies da família o primeiro par metacêntrico maior do que os demais cromossomos. O gênero *Astyanax* é bastante numeroso e tem mostrado em estudos já realizados uma ampla variação do número diploide, com 36 cromossomos em *Astyanax schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983) até 52 cromossomos em *Astyanax sp.* (TENÓRIO *et al.*, 2013).

Estudos revelaram que existe uma variabilidade cromossômica entre espécies caracterizando uma heterogeneidade cariotípica na evolução deste grupo devido a rearranjos cromossômicos. Níveis adicionais de evolução cromossômica podem ser descobertos em estudos intraespecíficos e com o uso de várias técnicas cromossômicas. Até o momento, espécimes de *A. altiparanae* apresentaram número diplóide igual a 50 cromossomos, porém diferenças na fórmula cariotípica e no número e posição da região organizadora de nucleolo (RON) foram evidenciados (FERNANDES E MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2007; NETO *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2012).

*A. paranae* anteriormente classificado como *Astyanax scabripinnis paranae* (LIMA *et al.*, 2003), é um pequeno caracídeo encontrado em cabeceiras de rios e córregos, formando pequenas populações isoladas, o qual favorecem uma alta diversidade genética ( MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004; PAZZA e KAVALCO 2007). Moreira-Filho

e Bertollo (1991) consideraram *A. paranae* como um complexo de espécies, chamando de “complexo *scabripinnis*” devido a variação do número diploide, que variou de  $2n=46$ , 48 e 50 cromossomos em nove populações estudadas por eles. *A. fasciatus* também é chamado de “complexo *fasciatus*” onde o número diplóide pode variar entre  $2n=45$  e  $2n=50$  cromossomos (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Para Almeida-Toledo e Foresti (1995) algumas espécies de peixes, no que diz a respeito da ocorrência de RONS, precisam ser mais estudadas a fim de obter um estudo mais detalhado para um melhor entendimento em relação à estrutura cromossômica.

Diante da diversidade cariotípica encontrada no gênero *Astyanax*, o objetivo do presente estudo foi caracterizar citogeneticamente duas espécies de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) do córrego Guaçu (bacia do rio Iguatemi), a fim de contribuir como novos dados citogenéticos em *A. altiparanae* e *A. paranae*.

## **Materiais e métodos**

### *a) Coleta dos espécimes*

Um total de 6 indivíduos foram analisados sendo: 1 macho e 2 fêmeas de *A. paranae* e três indivíduos (1 macho, 1 fêmea e 1 com sexo não identificado) de *A. altiparanae* coletados no córrego Guaçu ( $23^{\circ} 54' 19,6''$  S e  $54^{\circ} 21' 43,4''$  W;  $23^{\circ}53'31,49''$  S e  $54^{\circ}18'41,44''$  W) que é afluente do rio Iguatemi, Mundo Novo, MS, Brasil.

Os indivíduos coletados foram colocados em aquários no laboratório de citogenética de peixes da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo. Para cada exemplar foi fornecido um número de identificação e obtido o sexo, o qual foi identificado macroscopicamente ou com o auxílio de um microscópio. Antes de serem eviscerados para obtenção dos cromossomos, os peixes foram anestesiados por *overdose* de óleo de cravo na concentração de 10 gotas para cada dois litros de água (GRIFFITHS, 2000).

### *b)Preparações para análise citogenética:*

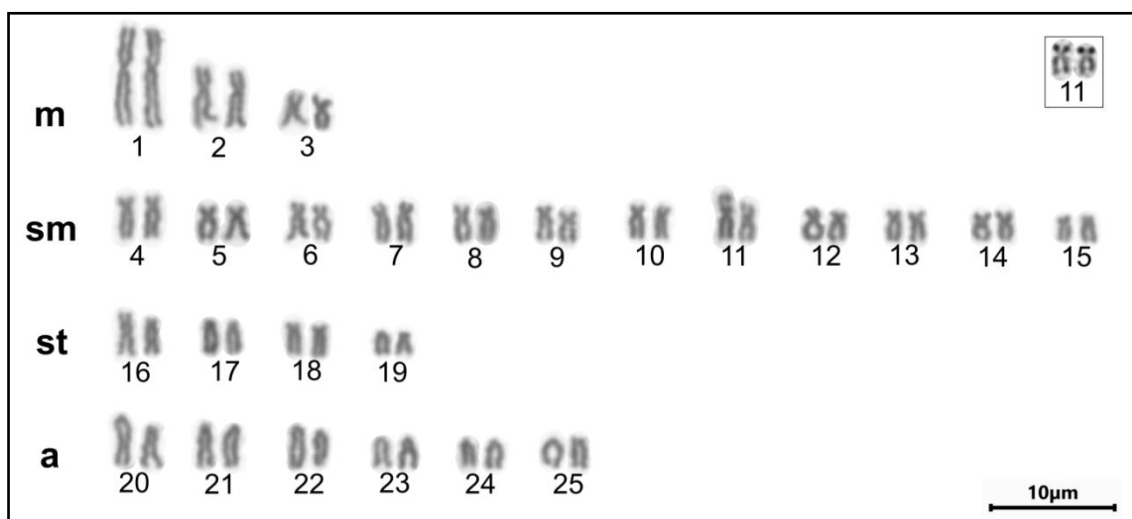
Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células extraídas do rim seguindo a metodologia descrita por Bertollo *et al.*, (1978), que consiste na inibição das fibras do fuso mitótico aplicando colchicina 0,05% no animal, seguida de hipotonização das células com cloreto de potássio, fixação da suspensão celular com metanol e ácido acético (3:1) e por último a suspensão foi fixada em lâmina e corada com Giemsa a 10%

em tampão fosfato. A identificação dos cromossomos foi realizada de acordo ao critério de relação de braços (RB), sugerida por Levan *et al.*, (1964) e classificados como metacêntricos (m : RB = 1.00 a 1.70), submetacêntricos (sm: RB = 1.71 a 3.00), subtelocêntricos (st : RB = 3.01 a 7.00) e acrocêntricos (a : RB = maior que 7.01). Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos e os acrocêntricos com 1 braço.

As RONS foram detectadas por impregnação por nitrato de prata (AgNO<sup>3</sup>) seguindo o método descrito por Howell e Black (1980). As melhores metáfases foram fotografadas com um microscópico de captura de imagens e os cariótipos montados com auxílio do software COREL PHOTO-PAINT.

## Resultados

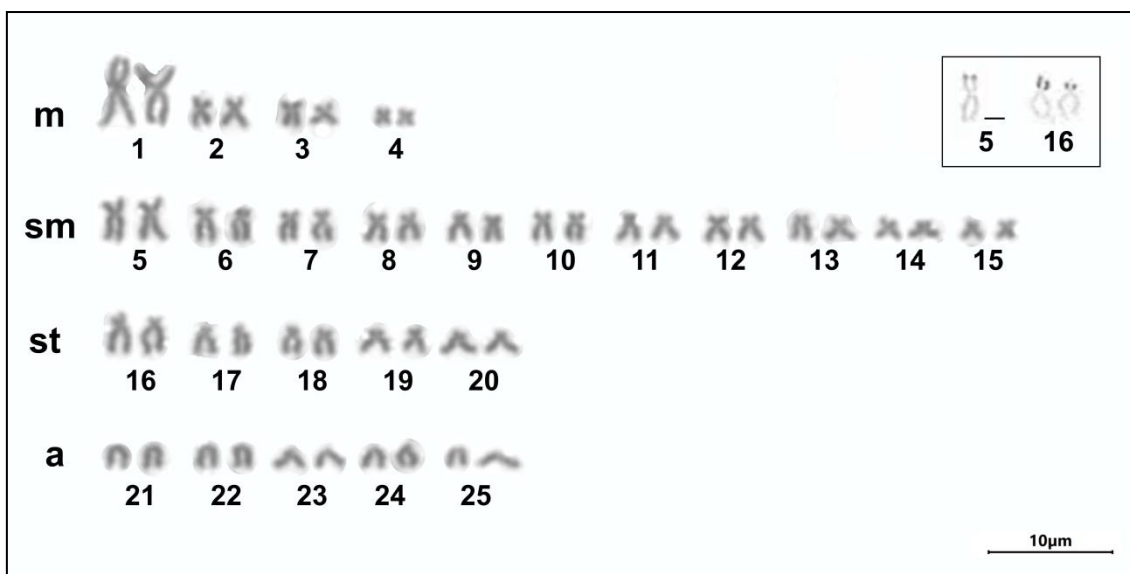
Os exemplares de *A. paranae* e *A. altiparanae* das populações do córrego Guaçu apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos. Os espécimes analisados de *A. paranae* tem a fórmula cariotípica de 6m+24sm+8st+12a, com número fundamental de braços igual a 88, sendo igual para ambos os sexos (Figura 1). A RON é observada em posição terminal no braço curto do par 11, sendo coincidente com a constrição secundária (em destaque na Figura 1).



**Figura 1.** Cariótipo e RONS de *Astyanax paranae* do córrego Guaçu. Em destaque o par de cromossomos portador da RON.

No entanto, os espécimes analisados de *A. altiparanae* têm a fórmula cariotípica de 8m+22sm+10st+10a, com número fundamental de braços igual a 90, mantendo-se para ambos os sexos (Figura 2). Sendo que a RON foi evidenciado na posição terminal em um

dos homólogos do par 5 e na posição terminal do braço curto do par 16 (em destaque na Figura 2).



**Figura 2.** Cariótipo e RONs de *Astyanax altiparanae* córrego Guaçu. Em destaque cromossomos portadores da RON.

## Discussão

O número diploide de 50 cromossomos, distribuídos em  $8m+22sm+10st+10a$  observado para espécimes de *A. altiparanae* coletados no córrego Guaçu, mostraram constituição cariotípica diferente de uma população encontrada no rio Pindorama na bacia superior do rio Paraná (YANO et al., 2014), bem como de uma população analisada do rio Ribeirão Claro em São Paulo, que apresentou mesmo número diploide, mas constituição cariotípica diferente sendo  $8m+28sm+8st+6a$  (PISCOR et al., 2015).

Essa variação cariotípica observada entre indivíduos de mesma espécie, pode ter ocorrido, devido a rearranjos cromossômicos, tais como inversões pericentricas, que não alteram o número diploide, mas alteram a constituição cariotípica, tendo em vista que são populações pertencentes a ambientes distintos. Estudos revelam que pequenas diferenças cariotípicas indicando algum tipo de divergência evolutiva por restrições de fluxo gênico (FERREIRA-NETO, et al., 2009). Estudos citogenéticos fornecem informações importantes sobre modificações da estrutura cromossômica em espécies de peixes, que possivelmente são favorecidas pelo isolamento geográfico em diferentes bacias hidrográficas e microbacias regionais (SOUZA et al., 1995).

O número diploide de 50 cromossomos, divididos em  $6m+24sm+8st+12a$

observado para espécimes de *A. paranae* alocados no córrego Guaçu, mostrou constituição cariotípica diferente de duas populações analisadas por Abelini et al. (2014), nos rios Tagaçaba tributário do rio Ivaí e outra do rio Tauá afluente do rio Pirapó, localizados na cidade de Maringá-PR. A população do rio Tagaçaba apresentou 10m+22sm+6st+12a diferente da população coletados no rio Tauá que apresentou 10m+9sm+8st+14a. Porém, o mesmo número de cromossomos ficou em evidência na população do presente estudo e as populações analisadas do Paraná. Lembrando, que populações coletadas em diferentes localidades, que apresentam mesmo número de cromossomos, podem apresentar variações cariotípicas (MARQUES, 2002). Segundo Rieseberg (2001) as variações cariotípicas modificam a organização do material genético, podendo ser considerado de grande importância para os processos evolutivos.

Porto-Foresti et al. (1997) realizaram análises em *Astyanax scabripinnis paranae*, que agora é identificado como *A. paranae*, para verificar a ocorrência de cromossomo B em três pontos distintos do córrego Cascatina, Botucatu – SP. As análises desses exemplares indicaram presença de macrocromossomo B, enquanto no presente estudo os espécimes de *A. paranae* não apresentaram esse cromossomo extra.

Em *A. altiparanae*, foi detectado, múltiplas RONS ativas, presentes na posição terminal do braço curto do primeiro cromossomo do par 5 (submetacêntrico) e no par 16 (subtelocêntrico). Em um estudo anterior, Yano et al. (2014), detectou também várias RONS em *A. altiparanae* coletados nos rios Pindorama e Lopei na bacia superior do rio Paraná, com variação inter-individual em ambas as populações. Ferreira-Neto et al., (2009) também verificaram essa variação em três populações estudadas de *A. altiparanae*, sendo um par marcado para população do córrego Pantano, três pares marcados para o córrego Feijão e quatro pares marcados para o rio Jordão. Também foram observadas variações intra-específicas da RON quando comparadas diferentes populações de *A. altiparanae* utilizando além da impregnação com nitrato de prata (Ag-RON) a técnica de FISH com sondas ribossomais (FERNANDES e MARTINS-SANTOS 2006). Portanto, a Ag-RON pode ser utilizado como uma ferramenta para detectar variações na microestrutura dos cromossomos em diferentes populações de *A. altiparanae*.

Em *A. paranae*, a Ag-RON foi detectada no braço curto do par 11 (submetacêntrico), sendo esta coincidente com a constrição secundária. Marcações distintas são observadas em estudo realizado em indivíduos da mesma espécie nos rios Lopei e Pindorama na bacia superior do rio Paraná nas redondezas de Cascavel e Toledo-PR, onde estas apresentaram várias RONS sendo as marcações observadas em

cromossomos metacêntrico, submetacêntrico e subtelocêntrico (YANO et al., 2014). Em peixes, estudos das RONS têm sido realizados mais frequentemente com impregnação de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) devido à simplicidade desta técnica, embora esta metodologia está limitada a detectar apenas as regiões nucleolares que foram ativas na intérfase precedente (MILLER *et al.*, 1976), sendo mais apropriada para estudos de atividade gênica. Portanto esta variação observada no presente estudo em relação às populações de *A. paranae* descritas por Yano *et al.* (2014), pode ter ocorrido como resultado da regulação da atividade gênica.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. As regiões organizadoras de nucleolos em peixes. **Ciências e Cultura**, v.137, p. 448-453, 1995.

ABELINI, E.; MARTINS-SANTOS, I. C.; FERNANDES, C. A. Cytogenetic analysis in three species from genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes) with a new occurrence of B chromosome in *Astyanax paranae*, **Caryologia**; v. 67, n. 2, p.160-171, 2014.

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

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: manual de identificação. **EMBRAPA**, Brasília. p. 184, 1999.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**; v. 14, p. 361–368, 2003.

DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**; v. 5, p. 37–44, 2007.

DOWLING, T. E.; MARTASIAN, D. P.; JEFERRY, W. R. Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Molecular Biology and Evolution**; v. 19, n. 4, p. 446-455, 2002.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**; v. 29, p. 464–468, 2006.



- FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**; v. 141, p. 328–332, 2004.
- FERREIRA-NETO, M; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**; v. 32, p. 792-796, 2009.
- FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**; v.6, p. 1-104, 1948.
- GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rock pool fishes. **Journal of Fish Biology**; v. 57, p. 1453-1464, 2000.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**; v. 36, p. 1014-1915, 1980.
- JEFERRY, W. R. Cave fish as model system in evolutionary developmental biology. **Developmental Biology**; v. 231, p. 1-12, 2001.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**; v. 52, p. 201-220, 1964.
- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. eds. **Check list of freshwater fishes of South Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS. p.104-169, 2003.
- MARQUES, M. B. A. Estudos citogenéticos em *Conorhynchus conirostris* e *Lophiosilurus alexandri* (Pisces, Siluriformes), Espécies endêmicas do rio São Francisco. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de genética e evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2002.
- MARTINEZ, E. R. M.; ALVES, A. L; SILVEIRA, S. M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**; v. 6, n. 1, p. 41–51, 2012.
- MILLER, D. A.; DEV, V. G.; TANTRAVASHI, R.; MILLER, O. J. Supression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**; v. 101, p. 235- 243, 1976.
- MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**; v. 8, p. 385-568, 2010.
- MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI PM, J. R.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogeneticç and Genome Research**; v. 106, p. 230–234, 2004.

- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces;Characidae): a “species complex”. **Brazilian Journal of Genetics**; v. 14, p. 331–357, 1991.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic variability. **Caryologia**; v. 36, p. 235–244, 1983.
- NELSON, J. S. Fishes of the world. **New York: John Wiley**; p. 523, 1984.
- NETO, M. F.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**; p.32, 2009.
- OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.; VARI, R. P.; CORRÊA, C. R. M. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**; v. 11, p. 275, 2011.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the Neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Nucleus**; v. 50, p. 519–543, 2007.
- PISCOR, D.; ALVES, A. L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal Microstructure Diversity in Three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species: Comparative Analysis of the Chromosomal Locations of the 18S and 5S rDNAs. **Zebrafish**, v. 12, n. 1, p. 81-90, 2015.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E. L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**; v. 20 p. 377-380, 1997.
- RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology e Evolution**; n. 16, v. 7, p. 351-357, 2001.
- SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic characterization of *Aplyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. **Cytobios**, v. 83, p. 273-281, 1995.
- TENÓRIO, R. C. C.O.; VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 553-564, 2013
- YANO, C. F.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *IncertaeSedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. **Biologia**; v. 69, n. 6, p. 790-798, 2014.



## CAPÍTULO II

**Nova ocorrência de microcromossomos B em uma população de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae)**

## **Nova ocorrência de microcromossomos B em uma população de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae)**

### **Resumo:**

*Moenkhausia* é um dos gêneros mais especiosos que compõem a família Characidae, sendo composto por mais de 82 espécies amplamente distribuídas pela região Neotropical. *Moenkhausia sanctaefilomenae* fornece um bom modelo para estudar os cromossomos B, com variações no número de Bs intra e inter-individualmente. Diante disso, o presente estudo teve por objetivo descrever uma nova ocorrência de microcromossomos B em uma população de *M. sanctaefilomenae* pertencente a bacia do rio Iguatemi, MS, a fim de trazer novas informações a respeito destes cromossomos supranumerários. Os exemplares de *M. sanctaefilomenae* apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos, distribuídos em  $8m+36sm+6st$ , com número fundamental de braços igual a 100, para ambos os sexos. Em adição ao cariótipo básico, todos indivíduos analisados apresentaram uma variação de zero a oito microcromossomos B em células somáticas. Estes elementos são menores que qualquer cromossomo do complemento A. A Região Organizadora de Nucléolo (RON) é observada em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos subteloentríco. A heterocromatina constitutiva ficou em evidência na região centromérica e pericentromérica de alguns cromossomos. Os microcromossomos Bs encontrados podem ser utilizados como marcadores citotaxonômicos para esta população.

Palavras chave: Eucromáticos, RON, banda C, evolução cariotípica

## Introdução

*Moenkhausia* é um dos gêneros mais especiosos que compõem a família Characidae, sendo composto por mais de 82 espécies amplamente distribuídas pela região Neotropical (FROESE; PAULY, 2017). Contudo, estudos realizados em algumas espécies do gênero mostram que esse grupo apresenta uma macroestrutura cariotípica aparentemente conservada com  $2n=50$  cromossomos (FORESTI *et al.*, 1989; PORTELA-CASTRO *et al.*, 2001; PORTELA-CASTRO e JÚLIO-JÚNIOR 2002; DANTAS *et al.*, 2007; HASHIMOTO *et al.*, 2012b).

Aproximadamente 15% das espécies eucarióticas possuem cromossomo B, elementos genômicos estes, dispensáveis presentes apenas em alguns indivíduos de uma determinada população (UTSONOMIA *et al.* 2016). Em muitos casos, cromossomos B se comportam como parasitas que prosperam devido à sua vantagem na movimentação sem serem eliminados pela seleção natural (WERREN *et al.*, 1987, CARVALHO *et al.*, 2008), sendo também caracterizados pelo seu modo evolutivo peculiar no genoma de espécies transportadoras (BEUKEBOOM 1994). Assim, estudo sistematizado destes elementos genômicos inclui investigações sobre a estrutura, origem, transmissão, dinâmica populacional, evolução e até a interação destes cromossomos com os do conjunto genômico A (CAMACHO *et al.*, 2000; BUGROV *et al.*, 2007).

A *Moenkhausia sanctaefilomenae* fornece um bom modelo para estudar os cromossomos B. Pois, esta espécie tem mostrado presença de cromossomos com certa frequência em distintas populações, com variações no número de Bs intra e inter-individualmente, possuindo de 0 a 8 cromossomos B, com notável polimorfismo evidenciado por banda-C, sendo estes cromossomos Bs eucromáticos, parcialmente ou totalmente heterocromáticos (FORESTI *et al.*, 1989, PORTELA-CASTRO *et al.*, 2001, HASHIMOTO *et al.* 2012).

Apesar do aumento crescente das informações que estudos trazem sobre morfologia, estrutura, herança e outros tópicos relacionados a cromossomos Bs em peixes, a origem e importância funcional desses cromossomos extras ainda permanecem desconhecidos (JESSUS *et al.*, 2003; ARTONI *et al.*, 2006).

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi descrever uma nova ocorrência de microcromossomos B, em uma população de *M. sanctaefilomenae* pertencente à bacia do rio Iguatemi, MS, a fim de trazer novas informações a respeito destes cromossomos supranumerários.

## **Materiais e métodos**

### *a) Coleta dos espécimes*

Três espécimes (2 machos e 1 fêmea) de *M. sanctaefilomenae* foram coletados no córrego Guaçu (23° 54' 19,6''S e 54° 21' 43,4'' W; 23°53'31,49" S e 54°18'41,44" W) que é afluente do rio Iguatemi.

Os indivíduos coletados foram colocados em aquários no laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Mundo Novo. Para cada exemplar foi fornecido um número de identificação e obtido o sexo, o qual foi identificado macroscopicamente ou com o auxílio de um microscópio. Antes de serem eviscerados para obtenção dos cromossomos, os peixes foram anestesiados por *overdose* de óleo de cravo na concentração de 10 gotas para cada dois litros de água (GRIFFITHS, 2000).

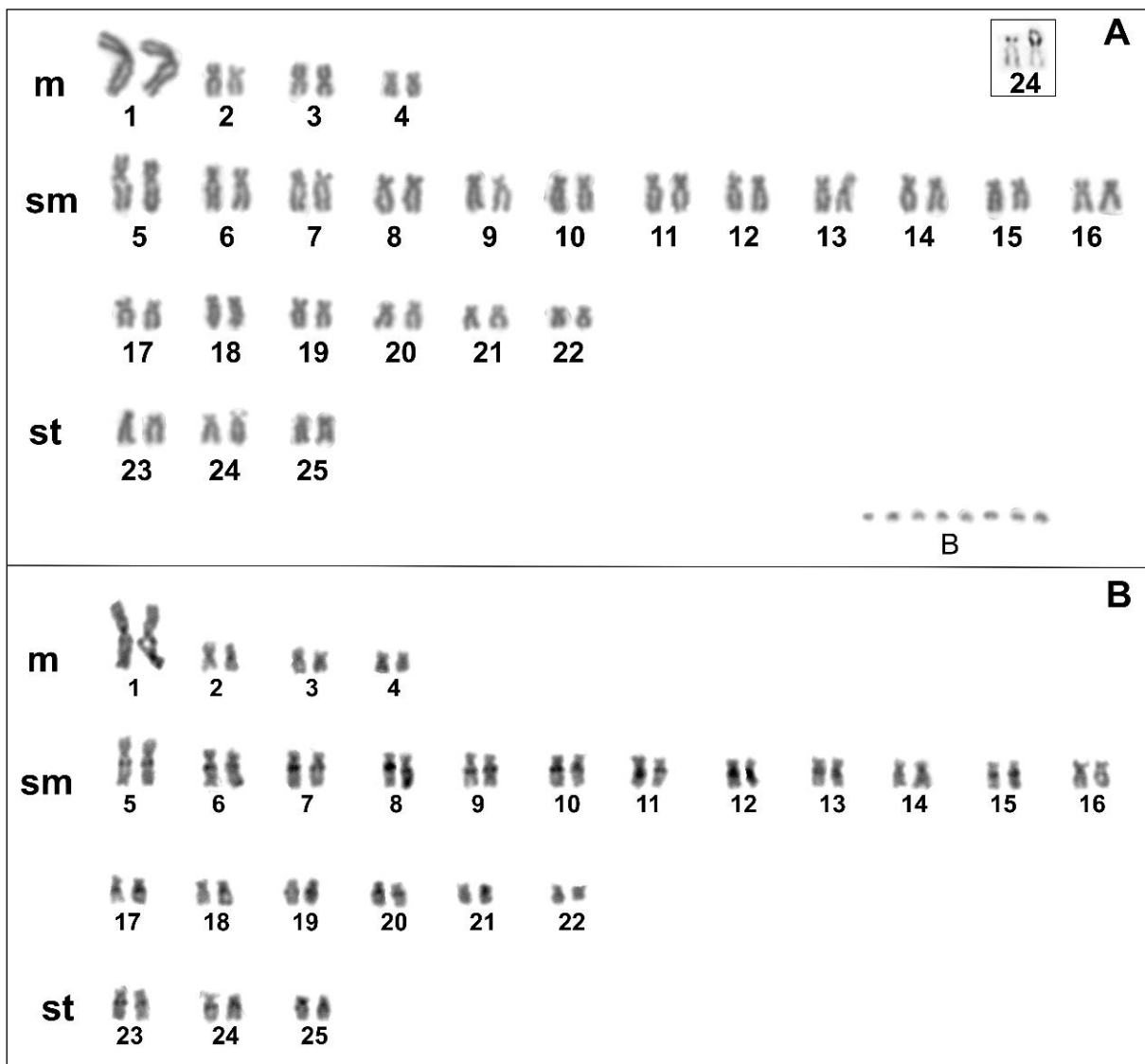
### *b) Preparações para análise citogenética:*

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células extraídas do rim seguindo a metodologia descrita por Bertollo *et al.*, (1978), que consiste na inibição das fibras do fuso mitótico aplicando colchicina no animal, seguida de hipotonização das células com cloreto de potássio, fixação da suspensão celular com metanol e ácido acético (3:1) e por último a suspensão foi fixada em lâmina e corada com Giemsa a 10% em tampão fosfato. A identificação dos cromossomos foi realizada de acordo ao critério de relação de braços (RB), sugerida por Levan *et al.* (1964) e classificados como metacêntricos (m : RB = 1.00 a 1.70), submetacêntricos (sm: RB = 1.71 a 3.00), subtelocêntricos (st : RB = 3.01 a 7.00) e acrocêntricos (a : RB = maior que 7.01). Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos e os acrocêntricos com 1 braço. Ag-RONs foram detectadas por impregnação de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) seguindo o método descrito por Howell e Black (1980). A técnica de banda-C descrita por Sumner (1972) foi empregada para análise da heterocromatina.

## **Resultados**

Os exemplares de *M. sanctaefilomenae* apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos, distribuídos em 8m+36sm+6st, com número fundamental de braços igual a 100, para ambos os sexos (Figura 1a). Em adição ao cariótipo básico, todos indivíduos

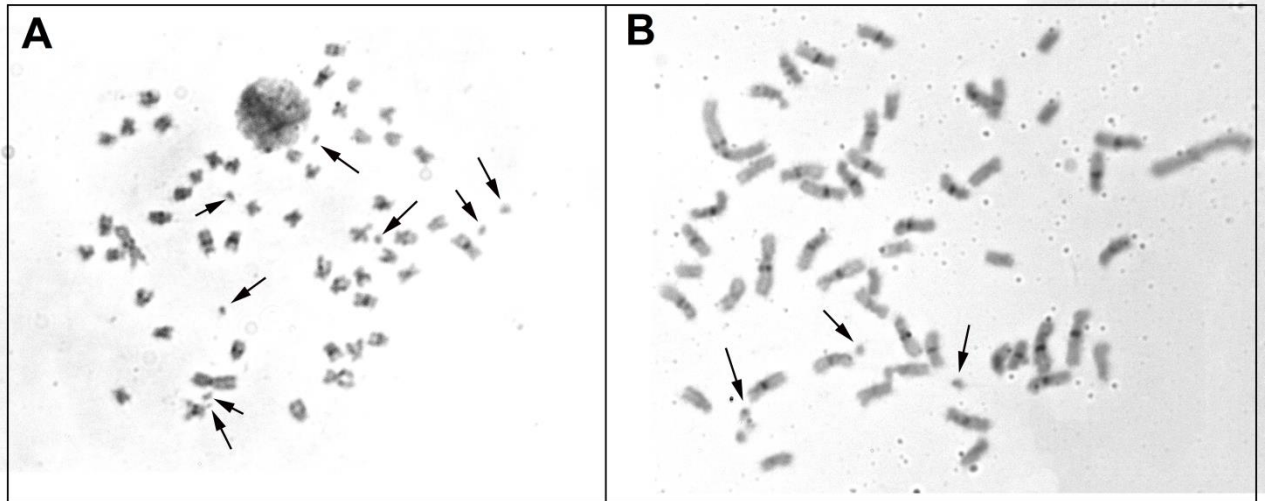
analisados apresentaram uma variação de zero a oito microcromossomos B em células somáticas em destaque (Figura 1a). Estes elementos são menores que qualquer cromossomo do complemento A. A RON é observada em posição terminal no braço curto do par 24, sendo coincidente com a constrição secundária (caixa na Figura 1a). A heterocromatina constitutiva ficou em evidência na região centromérica de alguns cromossomos e nas regiões pericentroméricas no braço longo de quase todos os cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (Figura 1b).



**Figura1:** Cariótipos de *Moenkhausia sanctaefilomenae* do córrego Guaçu, (a) corados com Giemsa e (b) após Banda-C. Em destaque na figura (a) os microcromossomos B. A RON está na destacada na caixa da figura 3a.



Os microcromossomos Bs foram todos eucromáticos (Figura 2 a, b).



**Figura 2:** Metáfases somáticas de *Moenkhausia sanctaefilomenae* após Banda-C. Setas indicam os microcromossomos B todos eucromáticos.

## Discussão

Os exemplares de *M. sanctaefilomenae* analisados no presente estudo apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos corroborando com estudos já realizados em outras populações de *M. sanctaefilomenae* (FORESTI *et al.*, 1989; PORTELA-CASTRO *et al.*, 2001; DANTAS *et al.*, 2007; HASHIMOTO *et al.*, 2012). Representantes do gênero *Moenkhausia* têm demonstrado que as espécies deste grupo apresentam número diploide relativamente conservado, variando de  $2n=48$  à  $2n=50$  cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (PORTELA-CASTRO e JÚLIO-JÚNIOR, 2002; DANTAS *et al.*, 2007).

Estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes espécies/populações distintas de *Moenkhausia* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cariotípica neste gênero. Apesar das espécies apresentarem macroestrutura cariotípica semelhante, bem como a maior frequência de  $2n=50$  cromossomos, com cromossomos B descritos em duas espécies deste gênero em *M. intermedia* (PORTELA-CASTRO *et al.*, 2001) e em *M. sanctaefilomenae* (FORESTI *et al.*, 1989; DANTAS *et al.*, 2007; HASHIMOTO *et al.*, 2012).

Os cromossomos B com morfologias distintas foram descritos em diferentes espécies de peixes da região Neotropical, sendo que o tipo mais frequente são os microcromossomos (CARVALHO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). No presente estudo, microcromossomos Bs foram observados em *M. sanctaefilomenae* com variação numérica inter e intra-individual sendo a mesma variação observada em uma população do rio Batalha, afluente do rio Tietê, com indivíduos portadores de até oito microcromossomos B (HASHIMOTO *et al.*, 2012).

Em relação à região organizadora de nucléolo, foi detectado com a impregnação com nitrato de prata duas RONS ativas presentes na posição terminal do braço curto do par 24 (subtelocêntrico), enquanto que a população do *M. sanctaefilomenae* coletada no rio Capivara, afluente do rio Tietê, apresenta uma série decrescente de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos com várias NORs (FORESTI *et al.*, 1989). Os microcromossomos Bs detectados no presente estudo não apresentaram marcações com nitrato de prata, diferentemente da população de *M. sanctaefilomenae* do rio Batalha em que os Bs foram marcados com o nitrato de prata (HASHIMOTO *et al.*, 2012).

A heterocromatina ficou em evidência na região centromérica de alguns cromossomos e nas regiões pericentroméricas do braço longo de quase todos os cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (Figura 3b). Resultados similares foram observados por Foresti *et al.*, (1989) em uma população de *M. sanctaefilomenae* do rio Tietê em Botucatu –SP, em que a banda-C demonstrou blocos heterocromáticos coloridos positivamente em quase todos os cromossomos e um padrão de bandas intersticiais localizado na mesma posição em relação ao centrômero no braço longo de um grande número de cromossomos. Por outro lado, os microcromossomos Bs aqui detectados foram todos eucromáticos, diferentemente dos resultados obtidos por estudos realizados em outras populações, que apresentaram microcromossomos Bs totalmente e parcialmente heterocromáticos (FORESTI *et al.*, 1989, HASHIMOTO *et al.*, 2012, UTSONOMIA *et al.*, 2016, PORTELA-CASTRO *et al.*, 2001). Portanto, a técnica de banda-C para *M. sanctaefilomenae* mostra-se útil como um marcador citotaxonomico, principalmente levando em consideração os microcromossomos Bs, possibilitando a diferenciação das populações.

## REFERÊNCIAS

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

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

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs an impression of the 1st B – chromosome conference. **Heredity**; v. 73, p. 328–336, 1994.

BUGROV, A. G.; KARAMYSHEVA, T. V.; PEREPELOV EA; *et al.* DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). **Chromosome Research**; v.15, p. 315–25, 2007.

CAMACHO, J. P.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **The Royal Society**; v. 355, p. 163– 78, 2000.

CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. Review Paper: B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**; v. 72, p. 1907–1932, 2008.

DANTAS, E. S. D. O.; VICARI, M. R.; SOUZA, I. L.; *et al.* Cytotaxonomy and Karyotype Evolution in *Moenkhausia Eigenmann*, 1903 (Teleostei, Characidae). **The Nucleus**; v. 50, p. 505–518, 2007.

FORESTI F, ALMEIDA-TOLEDO LF, TOLEDO-FILHO SA Supernumerary chromosome systems, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**; v. 79, p. 107–114, 1989.

FROESE, R.; D. PAULY. FishBase. Word Wide Web Eletronic Publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. Acesso em: 07 Ago. de 2017.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rock pool fishes. **Journal of Fish Biology**; v. 57, p. 1453-1464, 2000.

HASHIMOTO, D. T.; VOLTOLIN, T. A.; ARRUDA-PAES end FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). **Comparative Cytogenetics**; v. 6, p. 141–151, 2012.

HOWELL, W. M. end BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**; v. 36, p. 1014-1915, 1980.

JESSUS, C. M.; GALETTI, J. R. P. M.; VALENTINI S. R.; MOREIRA-FILHO O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite

DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**; v. 118, p. 25-32, 2003.

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

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**; v. 35, p. 81–100, 2009.

PORTELA-CASTRO, A.; JÚLIO-JÚNIOR, H. Karyotype relationships among species of the subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomic and evolution aspects. **Cytologia**; v. 67, p. 329–336, 2002.

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

SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromation. **Experimental Cell Research**; v. 75, p. 304-306, 1972.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. M. Z. D. A.; RUIZ-RUANO, F. J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; SCACCHETTI, P. C.; *et al.* Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **Plos One**; v. 11, n. 3, e. 0150573, 2016.

WERREN, J. H.; NUR, U.; EICKBUSH, D. G. An extra chromosomal factor causing gloss of paternal chromosomes. **Nature**; v. 327, p. 75–76, 1987.