

SILVANA DE MELO

**CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Prochilodus costatus*
VALENCIENNES, 1849 (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) DA
BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL: PRIMEIRA
DESCRIÇÃO DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS NESSA ESPÉCIE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M528c
2015

Melo, Silvana de, 1990-
Citogenética de populações de *Prochilodus costatus*
Valenciennes, 1849 (Characiformes: Prochilodontidae) da bacia
do Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil : primeira descrição
de cromossomos supranumerários nessa espécie / Silvana de
Melo. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Curimatã-pioa (Peixe). 2. Citogenética. 3. Cromossomos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 639.3

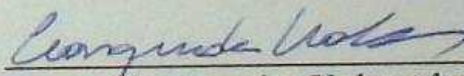
CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Prochilodus costatus* VALENCIENNES, 1849 (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL: PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS NESSA ESPÉCIE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 24 de julho de 2015.



Denilce Menezes Lopes



Evanguedes Kalapothakis



Jorge Abdala Dergam dos Santos

Dedico aos meus amados pais, irmãs e professores. Obrigada por cada palavra dita, cada conselho e gesto de cuidado que contribuíram para o caminho trilhado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por sempre me guiar e colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Ao meu pai, Silvano, meu Fofys, por todo o amor, o apoio psicológico, pelo alicerce, pela inspiração.

À minha mãe, Edneia, por sempre acreditar em mim e me dar forças ao longo do caminho.

Às minhas irmãs, Anaysce e Nínive, por todo o carinho e apoio.

Ao Oddie, my roommate, que todos os dias me recebe em casa com muita alegria e sempre me faz companhia.

Aos familiares que, mesmo distantes, de alguma forma contribuíram para esse resultado.

Ao Jorge pela orientação, desde 2012, pelo voto de confiança, pelos conselhos e, principalmente, por acreditar na minha capacidade de conduzir esse estudo. Obrigada por me auxiliar no caminho trilhado, por ter contribuído na minha formação como bióloga e como futura citogeneticista. Religioooooooon!

Ao Filipe por toda a ajuda na pesquisa e pelas discussões pertinentes dos mais variados temas. Hey, garoto!

Aos marujos do Beagle, em especial Marininha, Naty Travenzoli, Fred, Vinícius, Magrela, Manu, Bruno, Cristhian, Pedro, Nicole, Fernanda. Aos antigos marujos Udson e Priscila pelo primeiro campo.

Aos híbridos Beagle-Moojenianos, Bisonho, Késsia, Cynthia e Larissinha. Obrigada pela companhia, pela ajuda, pela amizade. Sem vocês com certeza os dias no laboratório não seriam os mesmos.

À galera do mestrado, em especial Danusy, Elvis, Ramon, Matheus, Ana Clara, Priscila e Folly. Em especial ao Markito, pelo mapa de grande valia. Arrasou!

Às meninas, Vivi e Fabi, de Botucatu. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e por toda a ajuda nessa nova fase da minha vida!

Aos meus amigos, Monique Sabioni, Camila Lacerda, Naty Sanches, Ana Paula, Inacio, Rodrigo Cardoso, Carol Paiva, Carla Dias, Sarah Macedo, Tales Vicari, Raquel Maia, Monique Lopes, Marcela Talyuli, Luana Paiva. Cada um de vocês construiu um pouco mim.

Aos meus padrinhos Marina Cunha e Levi Eduardo.

Ao pessoal das coletas de Iguatama, Três Marias e Pandeiros, em especial Cris, Bruno, Dolores, Ivo, Sr. Geraldo e Sr. Pedro. Obrigada por toda ajuda na coleta dos meus *Prochilodus*.

Aos professores Fausto e Cláudio de Botucatu por terem aberto as portas para que eu complementasse as técnicas realizadas. Em especial ao professor Fausto, pela nova oportunidade.

À Patrícia, de Botucatu, o meu muito obrigada por toda ajuda na microdissecção e na FISH!

Aos professores Evanguedes e Denilce, por terem aceito o convite para participar da minha banca de defesa.

À Cemig e à Capes pelo o auxílio financeiro durante a minha pesquisa da dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade de cursar o mestrado.

O meu muito obrigada! Excelente!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3 INTRODUÇÃO.....	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
5 RESULTADOS.....	13
6 DISCUSSÃO.....	16
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

LISTA DE TABELAS

TABELA I. ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PROCHILODUS</i> QUE APRESENTAM CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS, COM SUAS RESPECTIVAS LOCALIDADES.....	27
TABELA II. LOCAL DE PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE <i>PROCHILODUS COSTATUS</i> ANALISADAS, COM TAMANHO AMOSTRAL E NÚMERO DE TOMBO DOS LOTES.....	27
TABELA III. INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM INDIVÍDUOS DE <i>PROCHILODUS COSTATUS</i> LOCALIZADOS A MONTANTE E A JUSANTE DA UHE DE TRÊS MARIAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. Mapa da bacia hidrográfica do rio São Francisco, com a localização dos três pontos de coleta dos espécimes de <i>Prochilodus costatus</i>	29
FIG. 2. Cariótipos com coloração convencional dos indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante (a) e a jusante (b) da UHE Três Marias.....	29
FIG. 3. Cromossomos supranumerários em <i>Prochilodus costatus</i> coletados no presente estudo, com a ocorrência de um (a) a dois (b) supranumerários.....	30
FIG. 4. Regiões heterocromáticas evidenciadas através da técnica de Bandamento C em indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> coletados a montante (a) e a jusante (b) da UHE Três Marias.....	30
FIG. 5. Bandamento C evidenciando o cromossomo supranumerário de <i>Prochilodus costatus</i> (seta), indicando que o mesmo é completamente heterocromático.....	31
FIG. 6. DAPI/CMA ₃ de <i>Prochilodus costatus</i> indicando regiões de heterocromatina ricas em GC nos pares cromossômicos 2 e 16.....	31
FIG. 7. Técnica de impregnação por prata (Ag-NOR) em <i>Prochilodus costatus</i> evidenciando regiões organizadoras de nucléolo no par de cromossomos 2. O cromossomo supranumerário não apresentou marcações (caixa).....	32
FIG. 8. Variação na técnica de Ag-NOR detectada em um indivíduo de <i>Prochilodus costatus</i> localizado a montante da UHE Três Marias.....	32
FIG. 9. Double FISH com as sondas de rDNA 5S (em verde) e 18S (em vermelho), evidenciando marcações sintênicas para os dois genes no segundo par cromossômico.....	33
FIG. 10. FISH com rDNA 18S no indivíduo de <i>Prochilodus costatus</i> que apresentou uma variação na Ag-NOR, confirmando a variação da mesma e evidenciando um sítio de NOR inativo no par de cromossomos 4.....	33
FIG. 11. FISH com DNA microssatélite (GA) ₁₅ em indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.....	34
FIG. 12. FISH com DNA microssatélite (CA) ₁₅ em indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias. O cromossomo supranumerário apresentou marcações para essa sonda (b, caixa).....	35
FIG. 13. A marcação intersticial do braço menor do par cromossômico 3, está associada a presença de uma constrição cromossômica, ocorrendo a montante e a jusante.....	35

FIG. 14. Variação da sonda (CA) ₁₅ detectada em um indivíduo localizado a montante, evidenciando uma marcação na região pericentromérica de um cromossomo metacêntrico (seta). O cromossomo supranumerário dos indivíduos localizados a montante também apresentaram marcações nos cromossomos supranumerários (cabeça de seta).....	36
FIG. 15. FISH com DNA microssatélite (CAA) ₁₀ em indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.....	37
FIG. 16. FISH com DNA microssatélite (CAT) ₁₀ em indivíduos de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.....	38
FIG. 17. Variação detectada na FISH com DNA microssatélite (CAT) ₁₀ em um indivíduo de <i>Prochilodus costatus</i> localizados a montante da UHE Três Marias. O mesmo apresenta dois cromossomos supranumerários, um cromossomo não marca para a sonda utilizada, enquanto o outro cromossomo apresenta sinais conspícuos em sua região centromérica (caixa).....	38
FIG. 18. Pintura cromossômica realizada com a sonda de <i>Prochilodus costatus</i> , com a imagem do DAPI, da sonda (PROBE) e a sobreposição das mesmas, que evidenciou marcação apenas no cromossomo supranumerário (cabeças de setas).....	39
FIG. 19. Indivíduos de <i>P. costatus</i> coletados que apresentam um (JD5483) e um ou dois (JD5487) cromossomos supranumerários em todas as metáfases analisadas.....	39

RESUMO

MELO, Silvana de, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Citogenética de populações de *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1849 (Characiformes: Prochilodontidae) da bacia do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil: primeira descrição de cromossomos supranumerários nessa espécie.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

A família de peixes migratórios Prochilodontidae é constituída de 21 espécies distribuídas em três gêneros, sendo o gênero *Prochilodus* o mais diverso, com 13 espécies de ampla distribuição na América do Sul. Os estudos citogenéticos indicam que o gênero *Prochilodus* apresenta alta uniformidade cromossômica; todas as espécies partilham o mesmo número diploide e a mesma fórmula cariotípica. Este estudo teve como objetivo o estudo populacional para verificar o grau de variação cromossômica entre populações de *P. costatus* isoladas pela barragem de Três Marias construída no final da década de 1950, utilizando técnicas de citogenética clássica: coloração convencional (Giemsa), Banda C para evidenciar regiões ricas em heterocromatina, Cromomicina A3 (CMA₃) para realçar regiões ricas em GC e Ag-NOR para revelar regiões organizadoras de nucléolo. As técnicas de citogenética molecular incluíram fluorescência *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 5S e 18S, de DNA repetitivo (GA)₁₅, (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAT)₁₀. Sondas obtidas do cromossomo supranumerário ou B de *P. costatus*, foram hibridizadas no material cromossômico. Trinta e cinco indivíduos de *P. costatus* foram coletados, 17 amostras a montante e 18 a jusante da barragem. Aproximadamente 620 metáfases foram analisadas. As amostras analisadas apresentaram um número diploide de 54 cromossomos, com fórmula cariotípica 40m+14sm. Doze indivíduos a montante e seis a jusante apresentaram cromossomos Bs. A técnica de bandamento C revelou marcações pericentroméricas em todos os cromossomos e um bloco adicional na região intersticial do braço maior do segundo par de cromossomos metacêntricos; o cromossomo B se mostrou inteiramente heterocromático. O fluorocromo CMA₃ revelou que o braço maior do segundo par cromossômico é rico em GC, além disso foi detectada outra marcação no décimo sexto par cromossômico, localizada na região intersticial do braço menor. Através da técnica de impregnação por prata foi possível detectar regiões ativas de NOR no segundo par cromossômico, porém, um indivíduo coletado a montante apresentou uma marcação adicional na região terminal no braço maior de um homólogo do oitavo par de cromossomos. As sondas de rDNA 5S e 18S marcaram em sintenia no braço maior do segundo par de cromossomos. Através da sonda 18S, confirmou-se a variação na NOR

no indivíduo localizado a montante da barragem, além de uma marcação na região terminal do braço menor de um dos homólogos do par cromossômico 4. As sondas de DNA repetitivo se apresentaram predominantemente como marcações subteloméricas em todos os cromossomos, com algumas variações de padrão da sonda (CA)₁₅ em um indivíduo localizado a montante. O cromossomo supranumerário de amostras a montante e jusante apresentou também marcações com a sonda (CA)₁₅. A sonda do cromossomo B revelou marcação apenas no cromossomo supranumerário de *P. costatus*, evidenciando que este cromossomo não se originou do complemento A ou que se originou a partir deste complemento, mas sofreu evolução independente, acumulando regiões heterocromáticas para a estabilização. O padrão obtido para o 5S e 18S é o mesmo encontrado em estudos anteriores indicados no gênero, porém o polimorfismo encontrado apenas no indivíduo a montante é inédita e indica que existem diferenças estruturais entre as amostras analisadas. Concluiu-se que os padrões espaciais dos polimorfismos cromossômicos sugerem que as populações encontradas a montante e a jusante da UHE não são citogeneticamente homogêneas.

ABSTRACT

MELO, Silvana de, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Populations cytogenetics of *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1849 (Characiformes: Prochilodontidae) from the São Francisco River basin, Minas Gerais, Brazil, and first description of supernumerary chromosomes in this species.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The migratory family of fish Prochilodontidae consists of 21 species distributed in three genera, with genus *Prochilodus* as the most diverse, with 13 species widely distributed in South America. Cytogenetic studies indicate that *Prochilodus* genus presents high chromosome uniformity; all species share the same diploid number and the same karyotype formula. This study aimed to realize a populations study to determine the degree of chromosomal variation between samples of *P. costatus* isolated by the Três Marias dam, built in the late 1950s, using techniques of classical cytogenetics: conventional staining (Giemsa), C-Banding to show regions rich in heterochromatin, Chromomycin A3 (CMA₃) to highlight regions rich in GC and Ag-NOR to reveal nucleolar organizer regions. Molecular cytogenetic techniques include fluorescent *in situ* (FISH) with rDNA probes 5S and 18S, and probes of repetitive DNA (GA)₁₅, (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAT)₁₀. Probes obtained from supernumerary chromosome, or B, of *P. costatus* was hybridized in chromosomal material. Thirty-five individuals of *P. costatus* were collected, 17 samples upstream and 18 downstream of the dam. Approximately 620 metaphases were analyzed. The samples analyzed showed a diploid number of 54 chromosomes with karyotype formula 40m+14sm. Twelve individuals upstream and six downstream presented B chromosomes. C-Banding technique proved pericentromeric markings on all chromosomes and an additional block in the interstitial region of the bigger arm of the second pair of metacentric chromosomes; the B chromosome proved entirely heterochromatic. The fluorochrome CMA₃ revealed that the largest arm of the second chromosome pair is rich in GC, also was detected other marking on the sixteenth chromosome pair, located in the interstitial region of the lower arm. Silver impregnation technique was able to detect active regions of NOR in the second chromosome pair, however, an upstream collected individual presented an additional marking in the terminal region in the largest arm of the eighth chromosome pair. Probes of rDNA 18S 5S showed synteny markings in the bigger arm of the second chromosome pair. Through 18S rDNA probe, was confirmed the variation in the individual Ag-NOR located upstream of the dam, in addition with markings on the lower arm of the terminal region of the chromosome pair 4. The microsatellites

repetitive DNA probes were predominantly present as subtelomeric markings in all chromosomes, with some pattern of variations of the probe (CA)₁₅ in an individual located upstream. The supernumerary chromosome samples upstream and downstream also showed markings with the probe (CA)₁₅. The probe of the B chromosome revealed markings only in the supernumerary chromosome of *P. costatus*, showing that this chromosome did not originate from the standard complement or that originated from this complement, but suffered independent evolution, accumulating heterochromatic regions for stabilization. The pattern obtained for 5S and 18S is the same as found in previous studies indicated in the genus, but the polymorphism found only in an upstream individual is unprecedented and indicates that there are structural differences between the samples analyzed. It was concluded that spatial patterns of chromosomal polymorphisms suggests that populations found upstream and downstream of the UHE Três Marias are not cytogenetically homogeneous.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Teleostei é um grupo bem representado entre os vertebrados, com aproximadamente 32.500 espécies reconhecidas, sendo considerado um táxon diverso que habita os mais variados ambientes aquáticos (Nelson, 2006). A superordem Ostariophysi apresenta ampla distribuição geográfica e é representada por aproximadamente 28% de todas as espécies de peixes viventes, com 68% de suas espécies habitando ambientes de água doce. A região neotropical abriga grande parte da riqueza da ictiofauna mundial, sendo os Characiformes, ordem dentro de Ostariophysi, uma das mais diversas com mais de 1600 espécies descritas (Nelson, 2006).

Dentre os Characiformes, alguns grupos se destacam por sua grande capacidade migratória com fins reprodutivos, como o caso da família Prochilodontidae, composta por espécies bem distribuídas em bacias por toda a América do Sul, exceto no Chile, onde nenhuma espécie do grupo é encontrada (Vari, 1983). A família é composta por 21 espécies descritas, distribuídas nos seguintes gêneros: *Ichthyoelephas* (duas espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (seis espécies) (Castro e Vari, 2004). O gênero *Prochilodus* é caracterizado por espécies que apresentam morfologia corporal muito similar, e suas espécies representam um importante recurso pesqueiro nas bacias do continente. No rio São Francisco, por exemplo, as espécies de *Prochilodus* chegam a representar 50% de toda a biomassa pescada (Godinho e Godinho, 2003).

A bacia do rio São Francisco é uma das principais drenagens do território brasileiro, com 631.133 Km², equivalendo a 7,4% do Brasil (Paiva, 1983). O rio São Francisco possui 2.780 Km de extensão, abrangendo sete estados e 450 municípios. Aproximadamente 80% de sua área encontra-se nos estados de Minas Gerais e Bahia, onde habitam 13 milhões de pessoas, possibilitando energia, água e alimento, o que ressalta sua grande importância econômica (Cappio *et al.*, 1995). Assim como outros

rios, o São Francisco tem sido represado para a construção de usinas hidrelétricas e existe uma crescente demanda de energia elétrica, em consequência do aumento da população mundial e do desenvolvimento industrial. Com a construção da Usina Hidrelétrica de Três Marias, com início em 1957 e inauguração em 1962, o rio São Francisco foi fragmentado em duas regiões: uma a montante dessa UHE e outra a jusante (Sato e Godinho, 2003). A fragmentação e represamento de barragens afetam diretamente as espécies, impedindo que espécies migradoras subam o rio para reprodução. Essas alterações têm efeitos temporais na composição genética das populações, com consequências potencialmente graves na sua capacidade adaptativa.

Como medida mitigadora de possíveis impactos, programas de estocagem e repovoamento peixeiro em *P. costatus* têm sido realizados no alto São Francisco desde 1983 (Barroca *et al.*, 2012). Nesse sentido, Barroca *et al.* (2012) constataram diferenças genéticas dentro e entre populações de *P. costatus* analisadas no alto São Francisco, indicando que as amostras analisadas podem ter sido afetadas pelo repovoamento, pela construção de barragens e a consequente fragmentação da drenagem, com os fatores em questão agindo isoladamente ou em conjunto. Em contrapartida, Denier *et al.* (2007) sugerem que diferenças genéticas entre populações separadas por barragens podem não ser detectadas. Essa opinião aparentemente foi corroborada por Melo *et al.* (2013) que sugerem que dados moleculares de *P. argenteus* e *P. costatus* provenientes do médio São Francisco indicam a existência de uma única população para cada espécie nessa região. Nesse contexto, estudos citogenéticos seriam interessantes para complementar os resultados moleculares existentes em literatura, investigando se populações separadas por barragens no alto e médio São Francisco seriam panmícticas.

O gênero *Prochilodus* é constituído de espécies com uma macroestrutura cromossômica bem conservada, apresentando um número diploide de 54 cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com número de braços cromossômicos igual a 108

(Pauls e Bertollo, 1983, 1990). A migração reprodutiva permitiria a existência de grandes populações que manteriam essa estabilidade (Pauls e Bertollo, 1990). Por outro lado, algumas espécies dentro do gênero possuem cromossomos supranumerários e polimorfismos cromossômicos numéricos e estruturais no complemento padrão (Pauls e Bertollo, 1983, 1990, Venere *et al.*, 1999, Oliveira *et al.*, 2003, Artoni *et al.*, 2006, Voltolin *et al.*, 2010a, 2010b, 2011, Penitente *et al.*, 2015), sugerindo que essas espécies fixam rearranjos cromossômicos com o passar do tempo (Maistro *et al.*, 2000, Jesus e Moreira-Filho, 2003, Oliveira, *et al.*, 2003, Hatanaka e Galetti, 2004, Artoni *et al.*, 2006).

Prochilodus costatus, popularmente conhecido como curimatã-pioa, é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e apresenta o número diploide igual a $2n=54$ (Pauls e Bertollo, 1983, 1990, Voltolin *et al.*, 2013). *P. argenteus* também é endêmico da mesma bacia que *P. costatus*, e ambas as espécies apresentam uma macroestrutura cromossômica muito similar (Pauls e Bertollo, 1990, Voltolin *et al.*, 2013). Entretanto, recentemente foi descoberta a ocorrência de até três cromossomos supranumerários em *P. argenteus* (Penitente *et al.*, 2015), caracterizando uma diferença entre as duas espécies, pois não há registro em literatura de cromossomo supranumerário em *P. costatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Artoni, RF, Vicari, MR, Endler, AL, Cavallaro, ZI, Jesus, CM, Almeida, MC, Moreira-Filho, O, Bertollo, LAC. 2006. Banding pattern of A and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetica*, 127:277-284.
- Barroca, TM, Santos, GB, Duarte, NVR, Kalapothakis, E. 2012. Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. *Genetics and Molecular Research*, 11 (4): 4456-4467.
- Cappio, LF, Martins, A, Kirchner, R. 1995. O rio São Francisco. Petrópolis: Editora Vozes. 110p.
- Castro, RCM, Vari, PP. 2004. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Books*, Washington, DC, (622), 189p.
- Denier K, Garza JC, Coey R, Gorman DJ. 2007. Population structure and genetic structure of trout (*Onchorynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics*, 8: 437- 454.
- Godinho, AL, Brito, MFG, Godinho, HP. 2003. Pesca nas corredeiras de Buritizeiro: da ilegalidade à gestão participativa. Pp. 347-360. Em: Godinho, HP, Godinho, AL. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte, PUC-Minas.
- Hatanaka, T, Galetti, PMJ. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239–244.

- Jesus, CM, Moreira-Filho, O. 2003. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia*, 3: 281-287.
- Maistro, EL, Oliveira, C., 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.
- Melo, FB, Sato, Y, Foresti, F, Oliveira, C. 2013. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotropical Ichthyology*, 11(3): 625-636.
- Nelson, JS. 2006. *The Fishes of the World*. John Willey & Sons. New York pp. 601.
- Oliveira, C, Nirchio, M, Granado, A, Levy, S. 2003. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 1(1):47-52.
- Paiva, MP. 1983. *Peixes e pesca de águas interiores do Brasil*. Brasília: Editerra Editorial. 158p.
- Pauls, E, Bertollo, LAC. 1983. Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36: 307-314.
- Pauls, E, Bertollo, LAC. 1990. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of cariotipic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81:117-123.

- Penitente, M, Foresti, F, Porto-Foresti, F. 2015. B chromosomes in the species *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae): morphological identity and dispersion. *Comparative Cytogenetics*, 9(1): 79–87.
- Sato, Y, Godinho, HP. 2003. Migratory fishes of the São Francisco river. Pp. 195-232. Em: Carolsfeld, J, Harvey, B, Ross, C, Baer, A (Eds.). *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and ecological status*. Victoria, World Fisheries Trust.
- Vari, RP. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*. Smithsonian Institution Press, Washington, 378 pp.
- Venere, PC, Miyazawa, CS, Galetti, PMJ. 1999. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 345-349.
- Voltolin, TA, Senhorini, JA, Oliveira, O, Foresti, F, Bortolozzi, J, Porto-Foresti, F. 2010a. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 138:1133–1139.
- Voltolin, TA, Senhorini, JA, Oliveira, O, Foresti, F, Bortolozzi, J, Porto-Foresti, F. 2010b. Supernumerary chromosome inheritance in curimbatá (*Prochilodus lineatus*) Mogi-Guaçu river. *Hereditas*, 147: 127–131.
- Voltolin, TA, Senhorini, JA, Foresti, F, Bortolozzi, J, Porto-Foresti, F. 2011. Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 34:220-224.
- Voltolin, TA, Penitente, M, Mendonça, BB, Senhorini, JA, Foresti, F, Porto-Foresti, F.

2013. Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 3, 347-352.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo citogenético populacional, comparando amostras de *Prochilodus costatus* coletadas a jusante e a montante da UHE Três Marias, a fim de avaliar o grau de diversificação cromossômica da espécie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Descrever o cariótipo com base nas técnicas de citogenética clássica: padrões morfológicos (Giemsa), de distribuição da heterocromatina (bandamento C), Cromomicina A3 (CMA₃) e das regiões organizadoras de nucléolo (NORs).
- II- Realizar um mapeamento cromossômico para avaliar o grau de variabilidade citogenética das amostras coletadas a montante e a jusante da UHE de Três Marias utilizando hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNA ribossomal e microssatélite.
- III- Investigar a ocorrência de cromossomos supranumerários, realizando microdissecção e pintura cromossômica para investigar a origem de cromossomos supranumerários dentro da espécie.

ARTIGO

Normas da revista Zebrafish. ISSN: 1545-8547.

CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES E PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE
CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM *Prochilodus costatus*
VALENCIENNES, 1849 (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE), BACIA
DO RIO SÃO FRANCISCO, MG, BRASIL

Silvana Melo¹, Frederico Fernandes Ferreira¹, Filipe Schitini Salgado¹, Patrícia Elda
Sobrinho-Scudeler², Fausto Foresti², Evanguedes Kalapothakis³ e Jorge Abdala
Dergam¹

¹Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3 INTRODUÇÃO

A família Prochilodontidae é formada por espécies migratórias de biomassa abundante e amplamente distribuídas nas bacias na América do Sul. Apresenta três gêneros com 21 espécies descritas, sendo o gênero *Prochilodus* o mais diverso, com 13 espécies¹. O gênero *Prochilodus* apresenta uma macroestrutura cariotípica bem conservada, com número diploide formado por 54 cromossomos, fórmula cariotípica 40m+14sm e número de braços cromossômicos (NF) igual a 108^{2, 3, 4, 5}. Além da presença de cromossomos supranumerários no gênero^{2,3,4,5,6} (Tabela I), diferenças relacionadas a microestrutura com variações citogenéticas clássicas e moleculares já foram reportadas^{7, 8, 9}. Entretanto, nenhuma diferença citogenética foi descrita para indivíduos de *P. costatus*, e os mesmos não apresentam nenhum polimorfismo detectado em estudos prévios^{2, 10, 11}.

Prochilodus costatus é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco, e os dados moleculares obtidos com marcadores microssatélites divergem em relação à existência de uma população panmíctica na região do alto e médio São Francisco^{12, 13}. Essas diferenças moleculares entre populações do alto São Francisco podem estar relacionadas à construção de barragens na região e a consequente fragmentação de hábitat, causando o isolamento de populações previamente conectadas¹². O uso de marcadores microssatélites se justifica pelo fato de que grande parte do genoma de eucariotos é formado por DNA repetitivo¹⁴.

Durante muito tempo supôs-se que as regiões de DNA repetitivo não eram ativas, sendo classificadas como DNA-lixo¹⁴. Entretanto, essas sequências claramente têm um importante papel na organização e estrutura cromossômica, e alterações no DNA repetitivo podem refletir em mudanças ao longo da evolução das espécies^{14, 15, 16}.

O DNA repetitivo é formado por sequências dispersas no genoma, como os elementos transponíveis, ou sequências repetidas em *tandem*, como por exemplo o DNA ribossomal (rDNA) 45S e 5S e o DNA satélite, minissatélite e microssatélite¹⁴. A classe de rDNA 45S é formada pelos genes 18S+5,8S+28S juntamente com espaçadores e são muito conservados dentro do genoma, estando associados à regiões organizadores do nucléolo. Já o rDNA 5S é mais variável entre as espécies, apresentando localização instável. O DNA satélite é formado tanto por sequências conservadas quanto por sequências mais variáveis¹⁷ e é utilizado como marcador citogenético em estudos dentro de peixes teleósteos, sendo útil para estabelecer relações filogenéticas entre os táxons¹⁸. Visto a importância das sequências repetitivas no genoma, e a necessidade de avaliar se a presença da barragem afeta a estrutura populacional em *P. costatus*, o objetivo do presente trabalho é realizar um estudo citogenético populacional utilizando ferramentas de citogenética clássica e molecular em amostras coletadas a montante e a jusante da UHE de Três Marias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados 35 indivíduos, 22 fêmeas e 13 machos, em três pontos de coleta na bacia do rio São Francisco (MG): 17 espécimes no rio São Francisco, no município de Iguatama, localizado a montante da UHE de Três Marias; 15 indivíduos a jusante da UHE de Três Marias, e três indivíduos no Refúgio Estadual de Vida Silvestre do rio Pandeiros, a jusante da barragem de Três Marias (Figura 1) (Tabela II). Os indivíduos foram classificados seguindo o manual de identificação para peixes da região de Três Marias¹⁹, e a coleta foi realizada mediante autorização SISBIO14975-1 fornecido pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) para Jorge Abdala Dergam.

Os animais foram anestesiados e eutanasiados com Eugenol, composto ativo do

óleo de cravo²⁰, na concentração de 300 mg.L⁻¹ em conformidade com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 35/2014). Os espécimes, após processados, foram fixados em formol 10%, depositados em álcool 70% e tombados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen, na Universidade Federal de Viçosa - MG.

Após a administração de colchicina 0,0125% *in vivo* na concentração de 1 mL.100 g⁻¹ durante o período de 20 minutos, os animais foram anestesiados e eutanasiados com Eugenol, e a porção anterior do rim foi retirada, hipotonizada com solução de KCl a 0,075 M durante 20 min a 37 °C, centrifugada a 1000 rpm durante 10 min, seu sobrenadante foi retirado e substituído com fixador Carnoy na proporção de metanol 3:1 ácido acético. Esta fixação foi repetida mais duas vezes. Os cromossomos obtidos através da técnica de air-drying²¹ foram corados com coloração convencional (Giemsa, na concentração de 10%) para caracterizar o número diploide, a fórmula cariotípica e o número de braços cromossômicos (Número Fundamental), seguindo a classificação de acordo com a razão de braços cromossômicos²². As regiões heterocromáticas foram evidenciadas por meio de bandamento C²³; fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃) foi utilizado para evidenciar blocos heterocromáticos ricos em GC; e a técnica de impregnação por prata foi utilizada para evidenciar regiões organizadoras de nucléolo (NORs)²⁴.

A Hibridização *in situ* Fluorescente com a sonda de DNA ribossomal (rDNA)²⁵ 18S foi marcada com Digoxigenina utilizando o kit Dig-Nick Translation Mix (Roche Applied Science), e a sonda 5S foi marcada com biotin-16-dUTP (Roche Applied Science). Para a detecção de padrões de marcação de DNA repetitivos microssatélites²⁶ foram utilizadas as sondas (GA)₁₅, (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAT)₁₀. Essas sondas foram sintetizadas e marcadas com o fluorocromo Cy3 na terminação 5' (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Metáfases de 31 indivíduos (17 a montante e 14 a jusante da UHE Três Marias) foram analisadas para investigar a presença de cromossomos Bs nas amostras coletadas e a frequência dos mesmos. Por apresentar apenas um cromossomo supranumerário, o indivíduo JD5483 foi selecionado para o procedimento de microdissecção cromossômica, que foi realizado com o auxílio de um micromanipulador TransferMan NK2 acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100. Foram microdissecadas 10 cópias do microcromossomo B de *P. costatus*. Posteriormente, o material microdissecado foi adicionado a 9 µL de água ultrapura, fragmentado e amplificado através do kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4-Sigma)²⁷, a fim de construir uma biblioteca genômica do microcromossomo microdissecado. Após a construção da biblioteca do DNA total do microcromossomo supranumerário, foram sintetizadas sondas marcadas com digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) utilizando o kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification (WGA3-Sigma), de acordo com instruções do fabricante. As metáfases foram fotografadas em uma câmera Olympus DP73 acoplada em um microscópio epifluorescente Olympus BX53 e capturadas com o programa Olympus CellSens.

5 RESULTADOS

As amostras a jusante e a montante da UHE Três Marias apresentaram o mesmo número diploide de 54 cromossomos, com fórmula cariotípica 40m+14sm e número fundamental (NF) igual a 108, sem diferenciação entre machos e fêmeas (Figura 2). Aproximadamente 620 metáfases de 17 indivíduos a montante e 14 a jusante, foram analisadas a procura de cromossomos supranumerários. Foi detectada a presença de microcromossomos Bs em 18 indivíduos (12 espécimes a montante e seis a jusante), em pelo menos uma das 30 metáfases analisadas. Entre os 18 indivíduos com cromossomos Bs, dois coletados a montante apresentaram cromossomos supranumerários do tipo metacêntrico em todas as metáfases analisadas, o primeiro deles com apenas um

cromossomo supranumerário, e o segundo com metáfases variando de um a dois supranumerários (Figura 3, Tabela III).

O bandamento C evidenciou marcações pericentroméricas em todos os cromossomos e um bloco adicional na região intersticial do braço maior do segundo par de cromossomos metacêntricos, correspondente à região de constrição secundária (Figura 4). O cromossomo supranumerário se mostrou completamente heterocromático (Figura 5). O fluorocromo CMA₃ marcou o local da região da constrição secundária no segundo par de cromossomos metacêntricos, além de outro par na região intersticial do braço menor, no décimo sexto par cromossômico (Figura 6). O bandamento NOR evidenciou uma marcação restrita ao segundo par de cromossomos metacêntricos em correspondência com a localização da constrição secundária, ocorrendo em todas as amostras (Figura 7). Um indivíduo coletado a montante apresentou uma marcação adicional de Ag-NOR na região terminal do braço maior do cromossomo metacêntrico num homólogo do par cromossômico número 8 (Figura 8). Esse polimorfismo na técnica de Ag-NOR foi detectado em todas as metáfases analisadas desse indivíduo.

O padrão de hibridização das sondas de rDNA 5S e 18S apresentou marcações sintênicas para os dois cístrons no braço maior do segundo par de cromossomos metacêntricos, onde está localizada a constrição secundária (Figura 9). Através do gene 18S foi possível confirmar a marcação adicional no indivíduo que apresentou uma variação na técnica de impregnação por prata, além de uma quarta marcação subtelomérica no braço menor de um cromossomo do par número 4 (Figura 10). Essa variação ocorreu em 100% de 15 metáfases analisadas.

As sondas de DNA repetitivo microssatélite GA₍₁₅₎ e GA₍₁₅₎ apresentaram um padrão semelhante para as amostras do presente estudo, com sinais positivos nas regiões terminais de ambos os braços cromossômicos (Figuras 11 e 12). A sonda (CA)₁₅

apresentou uma marcação intersticial no braço menor do terceiro par cromossômico, aparentemente relacionada a uma região de constrição (Figura 13). Os cromossomos Bs analisados não apresentaram marcações para a sonda $GA_{(15)}$, já a sonda $(CA)_{15}$ hibridizou nas regiões terminais do microcromossomo supranumerário (Figura 12, caixa, e figura 14, cabeça de seta). O indivíduo coletado a montante que apresenta uma variação no número de cromossomos Bs apresentou uma marcação centromérica para a sonda $CA_{(15)}$ em um cromossomo metacêntrico (Figura 14, seta).

As sondas $(CAA)_{10}$ e $(CAT)_{10}$ apresentaram um padrão similar com marcações nas regiões terminais dos cromossomos, além de exibirem um padrão de marcação difuso ao longo dos mesmos (Figuras 15 e 16). Um caráter que difere uma sonda da outra é que metáfases hibridizadas com a sonda $(CAT)_{10}$ exibem uma marcação na região de constrição secundária no segundo par cromossômico. Além disso, no indivíduo que apresenta dois cromossomos supranumerários, um dos Bs não apresentou marcação para a sonda $(CAT)_{10}$, enquanto o segundo micro B mostrou marcação muito forte na região centromérica (Figura 17, caixa).

A microdissecção com a sonda de cromossomo supranumerário de *P. costatus* evidenciou forte sinal no cromossomo B do indivíduo de onde se extraiu os cromossomos Bs, funcionando como um controle positivo indicando de que a sonda era viável. Porém, não houve nenhuma marcação adicional no complemento cromossômico padrão do indivíduo de *P. costatus* (Figura 18).

O indivíduo de código JD5487 foi o único a apresentar dois cromossomos supranumerários entre todas as amostras analisadas. Apesar de apresentar de os caracteres merísticos que o classificam como *P. costatus*, o mesmo apresenta uma morfologia alongada peculiar entre todos os indivíduos coletados no estudo (Figura 19).

6 DISCUSSÃO

As amostras de *Prochilodus costatus* a jusante e a montante da UHE Três Marias apresentaram a mesma macroestrutura cariotípica já descrita para a família Prochilodontidae^{2, 3, 4, 5, 28}. O complemento cromossômico padrão de *P. costatus* só foi classificado em metacêntrico e submetacêntrico no trabalho de descrição da espécie², sendo que o trabalho mais atual com a espécie¹⁰ classificou o complemento cromossômico em metacêntrico/submetacêntrico com os cromossomos organizados de acordo com seu tamanho, impossibilitando a caracterização de cada par cromossômico.

A presença de cromossomos supranumerários é inédita em *P. costatus*, tornando-a a sexta espécie dentro do gênero *Prochilodus* a apresentar complemento B, além do complemento A. O primeiro trabalho descrevendo a presença de cromossomos numerários em peixes ósseos foi com *Prochilodus lineatus*², desde então a espécie se tornou referência em estudos sobre a ocorrência de cromossomos Bs nos peixes neotropicais^{7, 9, 11, 29, 30}. Outras espécies dentro do gênero *Prochilodus* que apresentam cromossomos supranumerários, além de *P. lineatus*, são *P. brevis*³, *P. nigricans*⁴, *P. mariae*⁵, e *P. argenteus*⁶, espécie endêmica da bacia do rio São Francisco, assim como *P. costatus*. A presença de cromossomos supranumerários em *P. costatus* foi encontrada em 18 amostras, 12 a montante e seis a jusante da barragem. Porém, em dois indivíduos a montante, a presença de Bs foi detectada em todas metáfases analisadas, com um indivíduo apresentando apenas um cromossomo B, sendo mitoticamente estável, e outro indivíduo apresentando uma variação entre um e dois supranumerários, indicando uma instabilidade mitótica intraindividual. Essa instabilidade também ocorre em alguns indivíduos *P. argenteus*⁶, e apresenta taxas baixas, indicando que a presença desses elementos extras pode estar prestes a se estabilizar em *P. argenteus*^{29, 30, 31}.

O bandamento C apresentou o mesmo padrão pericentromérico de regiões heterocromáticas, com um bloco adicional na região do segundo par de cromossomos metacêntricos, como já reportado para outras espécies do gênero *Prochilodus*, exceto para *P. lineatus*, onde esse bloco adicional não foi observado^{9, 10, 32}. O fluorocromo CMA₃ é específico para regiões ricas em GC e estaria relacionado a NORs em grupos de alguns vertebrados mais basais, como os peixes. Em *P. lineatus* esse padrão foi corroborado, quando o CMA₃ ficou restrito ao par de cromossomos com a NOR⁷. No presente estudo a NOR foi observada no segundo par de cromossomos metacêntricos, e adicionalmente uma marcação no par 16, totalizando quatro marcações, padrão corroborado em *P. lineatus* coletados no rio Tibagi³². A utilização de fluorocromos GC-específicos não é um método assertivo para a localização de genes ribossomais, e sim de regiões ricas em GC associadas a um gene³³, o que justifica a marcação adicional encontrada no décimo sexto par cromossômico que não marcou com nenhum rDNA.

A marcação simples de Ag-NOR relacionada a região organizadora de nucléolo na família Prochilodontidae já foi reportada em trabalhos anteriores^{3, 5, 8, 9, 11, 28}. A variação encontrada na Ag-NOR presente na região terminal de um homólogo do oitavo par cromossômico em um indivíduo de *Prochilodus costatus* coletado a montante da UHE Três Marias já foi reportada em espécimes coletados no reservatório dessa mesma barragem³. Entretanto essa variação não havia sido até então confirmada com a técnica de FISH utilizando o rDNA 18S. Polimorfismos adicionais em regiões terminais no rRNA45S detectados através da utilização de sondas de rDNA 18S em *Prochilodus* já foi reportado em *Prochilodus argenteus*, também endêmico da bacia do rio São Francisco³⁴. Entretanto, essa variação na região terminal no braço menor do homólogo do par cromossômico 4 é inédito para a espécie.

A presença sintênica dos cístrons de 5S localizadas em região terminal e 18S localizados mais pericentromericamente no gênero *Prochilodus* é bem conservada^{8, 11, 32},

^{34, 35}. Essa condição sintênica é muito rara entre os vertebrados e, além do gênero *Prochilodus*, é encontrada em poucos grupos de peixes e anfíbios^{36, 37, 38, 39, 40}. A ausência de clusters ribossomais adicionais nos cromossomos supranumerários corroboram estudos prévios com o gênero *Prochilodus*¹⁰.

A variação no tamanho do genoma de eucariotos é atribuída à presença de sequências repetitivas dispersas e em *tandem*, sendo utilizadas como marcadores importantes para mapeamento cromossômico devido à alta taxa de polimorfismos que apresentam¹⁶. As marcações similares das sondas de DNA microssatélite entre as populações analisadas, indicam que a família de DNA satélite pode permanecer conservada devido à baixa taxa evolutiva, refletindo na homogeneização das sequências¹⁶. No bagre *Mystus bocourti* as sondas de DNA repetitivo (GA)₁₅ e (CA)₁₅, localizaram-se preferencialmente em regiões heterocromáticas⁴¹, padrão não observado com essas sondas no presente estudo. A heterocromatina é composta por sequências de DNA repetitivo e está associada a regiões com pouca atividade transcricional⁴². Essas regiões heterocromáticas estão associadas à região pericentromérica em *Prochilodus*^{9, 10, 32}. Contudo, as regiões de DNA repetitivo descritas com uso de FISH no presente estudo estão associadas à região terminal, sugerindo que as sequências de DNA repetitivo em *P. costatus* pertenceriam a regiões importantes, relacionadas à estabilização da estrutura e função cromossômica.

O padrão físico de marcação de uma sonda de DNA repetitivo ao material cromossômico está relacionada com a sua composição⁴³. As sondas dinucleotídicas (GA)₁₅ e (CA)₁₅ marcaram as regiões terminais de todos os cromossomos em *P. costatus*, padrão similar ao já descrito para os gêneros *Leporinus*, *Triportheus* e *Hoplias*^{44,45,46,47}. Já as sondas trinucleotídicas (CAA)₁₀ e (CAT)₁₀ apresentaram um padrão de marcação mais disperso pelos cromossomos, similar ao gênero *Hoplias*⁴⁴. No gênero *Leporinus*, a sonda (CAT)₁₀ hibridizou apenas em dois cromossomos

autossômicos, além do cromossomo W, caracterizando um padrão completamente diferente para esses gêneros de peixes relacionados⁴⁶.

Estudos prévios com *Prochilodus lineatus* sugerem que o surgimento de cromossomos supranumerários na espécie é um evento antigo, e após o seu aparecimento no grupo seguiu um caminho evolutivo diferente entre as populações, diferenciando-se do complemento padrão⁹. Com o uso da microdissecção foi possível refinar os resultados para *P. lineatus*, e atualmente é parcimoniosa a teoria de que o surgimento do cromossomo supranumerário dentro da espécie se deu por eventos de hibridação entre espécies ancestrais portadoras de micro Bs de *P. lineatus* e *P. brevis*⁴⁸. Essa teoria dá suporte ao fato dos cromossomos supranumerários se manterem nessas duas espécies e serem provavelmente eliminados em outras espécies do gênero⁴⁸. A microdissecção do microcromossomo B de *P. costatus* e a pintura cromossômica demonstraram sinais apenas no mesmo, indicando que não há nenhuma complementariedade com o complemento padrão. A ausência de marcação no complemento A sugere este cromossomo não se originou a partir desse complemento, corroborando eventos de hibridação intragênica⁴⁸, ou que se originou a partir deste complemento, mas sofreu evolução independente do complemento padrão, acumulando regiões heterocromáticas para a estabilização.

O único indivíduo que apresentou dois cromossomos supranumerários foi o mesmo que apresentou a variação pericentromérica para a sonda (CA)₁₅. Ele foi classificado como *Prochilodus costatus* de acordo com a morfologia merística proposta na chave de identificação de espécies da bacia do rio São Francisco, apresentando oito escamas acima da Linha Lateral. Entretanto, ele apresenta uma morfologia geral diferente entre todos os espécimes coletados, indicando diferenças morfológicas entre os espécimes *P. costatus* da bacia do rio São Francisco.

A presença de barragens causa a fragmentação das bacias, isolam as populações

reduzindo o fluxo gênico, podendo levar à diferenciação genética entre as populações, corroborado por Barroca *et al.*¹² em *P. costatus*. As diferenças citogenéticas encontradas para a espécie complementam as diferenças moleculares existentes em literatura¹² e reforçam a citogenética como uma ferramenta importante para estudos populacionais.

CONCLUSÃO

Os polimorfismos encontrados com o rDNA 18S, as diferenças na marcação da sonda de DNA microssatélite (CA)₁₅ e a variação morfológica do indivíduo coletado a montante, indicam que as amostras analisadas não são citogenética e morfológicamente homogêneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro RMC, Vari RP. Detritivores of the South American family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithson Contrib Zool* 2004.
2. Pauls E, Bertollo LAC. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steidachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 1983;36:307-314.
3. Pauls E, Bertollo LAC. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 1990;81:117-123.
4. Venere PC, Miyazawa CS, Galetti, PMJ. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genet Mol Biol* 1999;22:345-349.
5. Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotrop Ichthyol* 2003;1:47-52.

6. Penitente M, Foresti F, Porto-Foresti F. B chromosomes in the species *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae): morphological identity and dispersion. *Comp Cytogenet* 2015;9:79–87.
7. Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 2000;108:119–125.
8. Jesus CM, Moreira-Filho O. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 2003;3: 281-287.
9. Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Banding pattern of A and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetica* 2006;127:277-284.
10. Voltolin TA, Penitente M, Mendonça BB, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F. Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genet Mol Biol* 2013;36:347-352.
11. Voltolin TA, Pansonato Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto-Foresti F. Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res* 2013;141:206–211.
12. Barroca, TM, Santos, GB, Duarte, NVR, Kalapothakis, E. Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. *Genet Mol Res* 2012;11:4456-4467.
13. Melo FB, Sato Y, Foresti F, Oliveira C. The roles of marginal lagoons in the

- maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotrop Ichthyol* 2013;11:625-636.
14. Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994;371:215–220.
 15. Flavell RB. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil Trans R Soc Lond* 1986;312: 227-242.
 16. Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Genome Dyn Basel* 2012;7:197–221.
 17. Hall SE, Kettler G, Preuss D. Centromere satellites from *Arabidopsis* populations: maintenance of conserved and variable domains. *Genome Res* 2003;13:195–205.
 18. Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC et al: Satellite DNA and chromosomes in neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 2010;76:1094–1116
 19. Britski HA, Sato Y, Rosa ABS. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. Brasília: Câmara dos Deputados/Codevasf, 1988;3:115p.
 20. Lucena CAS, Calegari BB, Pereira EHL, Dallegrove E. O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia* 2013;105.
 21. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1978;1:103–120.
 22. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964;52:201–220.
 23. Sumner AT. Simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 1972;75:304–306.

24. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980;36:1014–1015.
25. Pinkel D, Sraume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2934–2938.
26. Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 2008;51:350–356.
27. Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res* 2004;12:143–151.
28. Feldberg E, Bertollo LAC, Almeida-Toledo L, Moreira-Filho O. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome* 1987;29:1–4.
29. Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira O, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 2010;138:1133–1139.
30. Voltolin TA, Senhorini JA, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F. Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Gen Mol Biol* 2011;34:220–224.
31. Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Res* 2000;8:627–634.

32. Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes Prochilodontidae). Genet Mol Biol 2006;29:621-625.
33. Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC and Galetti Jr PM. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). Genet Mol Biol 1999;22:39-44.
34. Hatanaka T, Galetti PM Jr. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 2004;122:239–244.
35. Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F. Utilization of cytogenetic markers in wild population of curimatá (*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. Cytologia 2009;74:281-287.
36. Pendás AM, Morán P, Freije, JP, Garcia-Vásquez . Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenet Cell Genet 1994;67:31-36.
37. Morán P, Martinez JL, Garcia-Vásquez, Pendás AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cytogenet Cell Genet 1996;75:145-150.
38. Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenet Genet Res 2002;97:229-233.

39. Moraes-Neto A, Silva M, Motoso DA, Vicari MR, Almeida MC, Collares-Pereira MJ, Artoni, RF. Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriforme). *Neotrop Ichtyol* 2011;9:97-105.
40. Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 1993;36:762-773.
41. Supiwong W, Liehr T, Cioffi M, Chaveerach A, Nadezda Kosyakova N, Pinthong K *et al.* Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Mol Cytogenet* 2013;6:51.
42. Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish *Astyanax janeiroensis*. *Cytogenet Genome Res* 2008;122:67–72.
43. Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovsky E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet* 2011;12: 90.
44. Cioffi MB, Kejnovský E, Bertollo LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 2011;132:289–296.
45. Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D *et al.* The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet* 2012;5:28.
46. Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T *et al.*

- Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 2014;142:40–45.
47. Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *PLoS ONE* 2014;9(3).
48. Voltolin TA, Pansonato Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto-Foresti F. Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res* 2013;141:206–211.

LISTA DE TABELAS

TABELA I. ESPÉCIES DO GÊNERO *PROCHILODUS* QUE APRESENTAM CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS, COM SUAS RESPECTIVAS LOCALIDADES

<i>Espécie</i>	<i>Bs</i>	<i>Localização</i>	<i>Referência</i>
<i>Prochilodus argenteus</i>	0-3	UHE Três Marias, Bacia do rio São Francisco (MG)	Penitente <i>et al.</i> ⁶
<i>Prochilodus brevis</i>	0-2	Barragem de Pereira Miranda, Bacia do rio Parnaíba (CE)	Pauls e Bertollo ³
<i>Prochilodus lineatus</i>	0-9	Rio Mogi-Guaçu, Bacia do rio Paraná (SP)	Pauls e Bertollo ²
<i>Prochilodus mariae</i>	0-3	Caicara del Orinoco, Venezuela	Oliveira <i>et al.</i> ⁵
<i>Prochilodus nigricans</i>	0-2	Rio Araguaia, Bacia do rio Amazonas (MT)	Venere <i>et al.</i> ⁴

TABELA II. LOCAL DE PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *PROCHILODUS COSTATUS* ANALISADAS, COM TAMANHO AMOSTRAL E NÚMERO DE TOMBO DOS LOTES

<i>Procedência</i>	<i>Coordenadas Geográficas</i>	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>	<i>Nº de Depósito</i>
Iguatama (MG) - rio São Francisco	20°09'50"S/45°43'08"O	10	7	MZUFV4324
				e MZUFV4338 MZUFV4336
Três Marias - rio São Francisco	18°08'47"S/45°13'37"O	1	14	e MZUFV4339
				Refúgio Estadual da Vida Silvestre do Rio Pandeiros
	15°23'28"S/44°53'37"O	2	1	MZUFV4337

TABELA III. INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS EM
 INDIVÍDUOS DE *PROCHILODUS COSTATUS* LOCALIZADOS A MONTANTE E A JUSANTE DA
 UHE DE TRÊS MARIAS

Identificação indivíduo	Localização	Número de B por célula			MB	N
		0B	1B	2B		
JD5480	Montante	12	-	-	0B	12
JD5481	Montante	29	1	-	0B	30
JD5482	Montante	28	2	-	0B	30
JD5483	Montante	-	30	-	1B	30
JD5486	Montante	15	-	-	0B	15
JD5487	Montante	-	23	7	1B	30
JD5490	Montante	27	3	-	0B	30
JD5497	Montante	29	1	-	0B	30
JD5502	Montante	17	1	-	0B	18
JD5505	Montante	25	5	-	0B	30
JD5604	Montante	27	3	-	0B	30
JD5605	Montante	27	3	-	0B	30
JD5608	Montante	7	-	-	0B	7
JD5617	Montante	0	4	-	0B	4
JD5618	Montante	4	-	-	0B	4
JD5619	Montante	30	-	-	0B	30
JD5620	Montante	16	1	-	0B	17
JD5377	Jusante	28	2	-	0B	30
JD5517	Jusante	30	-	-	0B	30
JD5531	Jusante	27	3	-	0B	30
JD5562	Jusante	25	5	-	0B	30
JD5563	Jusante	11	-	-	0B	11
JD5565	Jusante	15	-	-	0B	15
JD5566	Jusante	15	1	-	0B	16
CT4622	Jusante	4	-	-	0B	4
CT4639	Jusante	21	6	-	0B	27
CT4640	Jusante	23	1	-	0B	24
CT4644	Jusante	10	-	-	0B	10
CT4645	Jusante	10	-	-	0B	10
CT4647	Jusante	10	-	-	0B	10
CT4648	Jusante	4	-	-	0B	4

MB = número modal de Bs nas metáfases analisadas; N= quantidade de metáfases analisadas.

LISTA DE FIGURAS

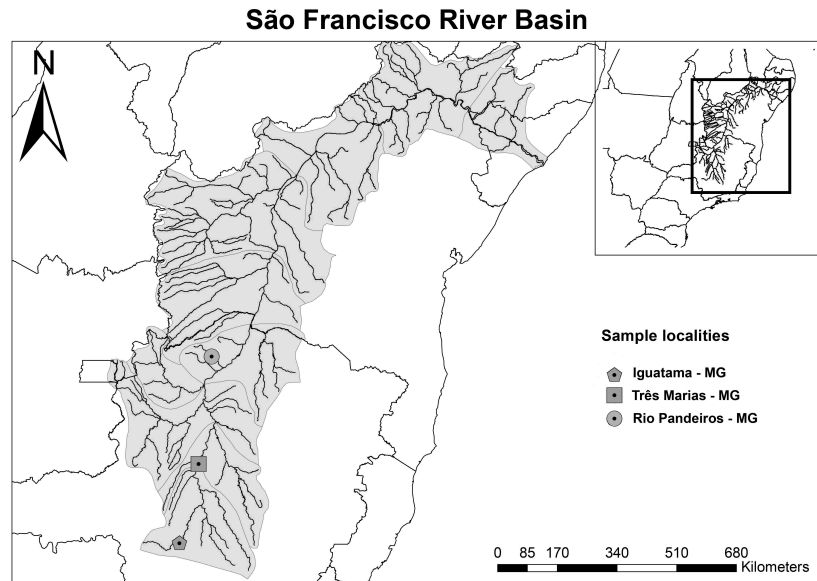


FIG. 1. Mapa da bacia hidrográfica do rio São Francisco, com a localização dos três pontos de coleta dos espécimes de *Prochilodus costatus*.



FIG. 2. Cariótipos com coloração convencional dos indivíduos de *Prochilodus costatus* localizados a montante (a) e a jusante (b) da UHE Três Marias.

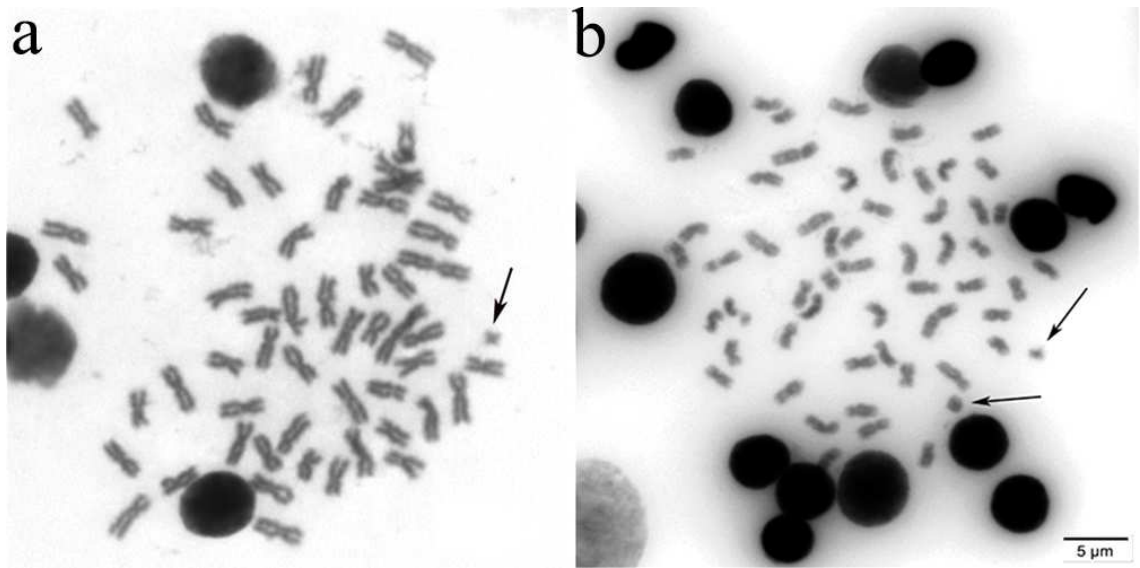


FIG. 3. Cromossomos supranumerários em *Prochilodus costatus* coletados no presente estudo, com a ocorrência de um (a) a dois (b) supranumerários.

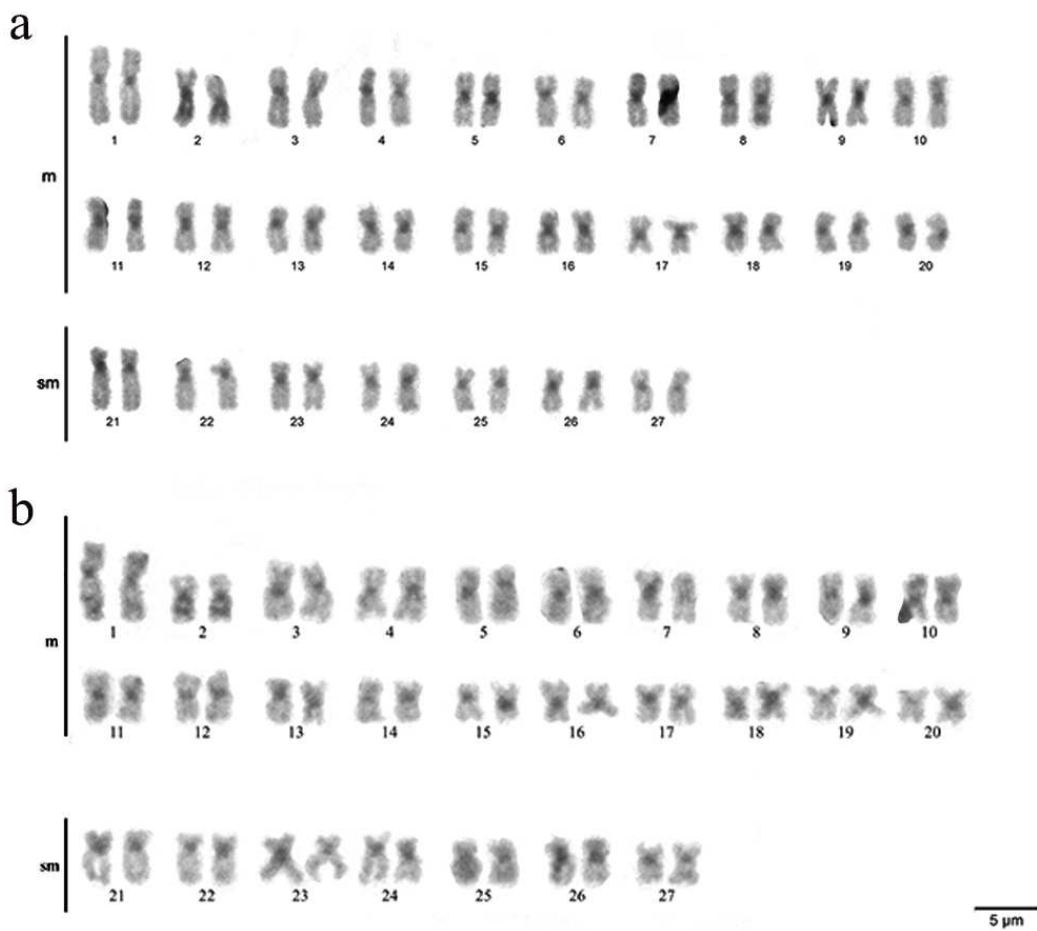


FIG. 4. Regiões heterocromáticas evidenciadas através da técnica de Bandamento C em indivíduos de *Prochilodus costatus* coletados a montante (a) e a jusante (b) da UHE Três Marias.

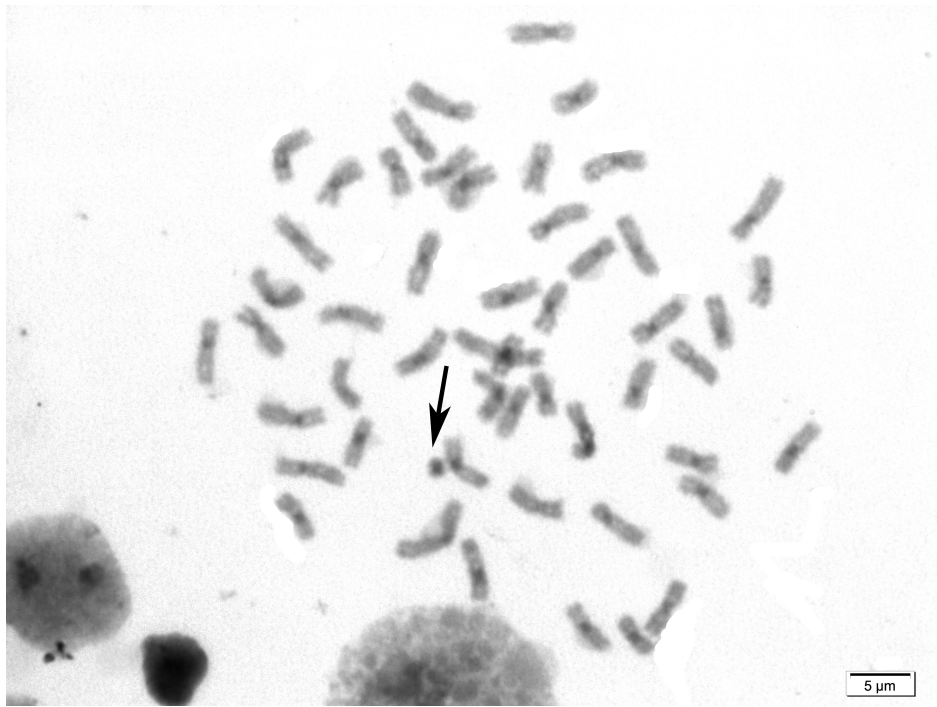


FIG. 5. Bandamento C evidenciando o cromossomo supranumerário de *Prochilodus costatus* (seta), indicando que o mesmo é completamente heterocromático.

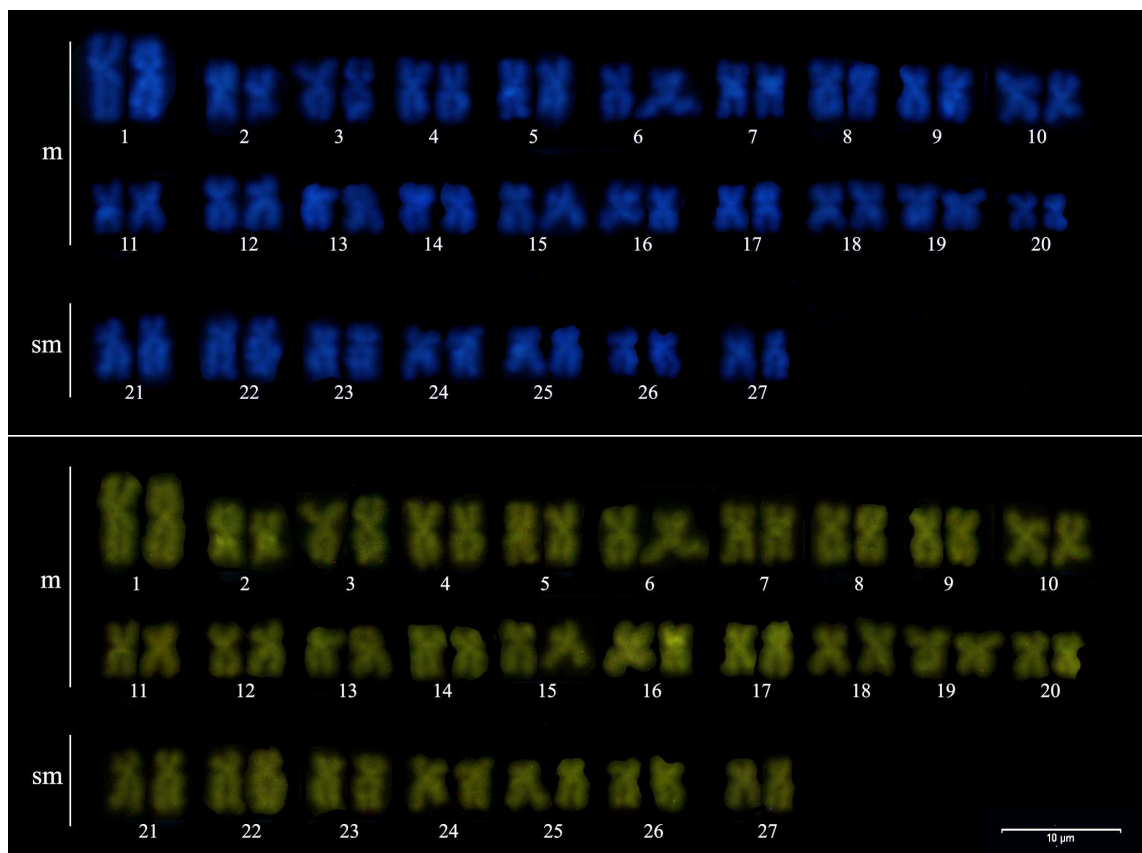


FIG. 6. DAPI/CMA₃ de *Prochilodus costatus* indicando regiões de heterocromatina ricas em GC nos pares cromossômicos 2 e 16.



5 µm

FIG. 7. Técnica de impregnação por prata (Ag-NOR) em *Prochilodus costatus* evidenciando regiões organizadoras de nucléolo no par de cromossomos 2. O cromossomo supranumerário não apresentou marcações (caixa).

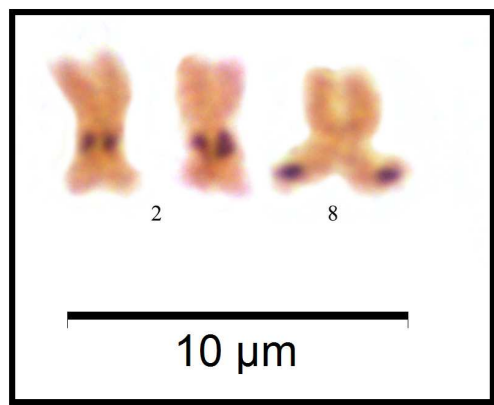


FIG. 8. Variação na técnica de Ag-NOR detectada em um indivíduo de *Prochilodus costatus* localizado a montante da UHE Três Marias.

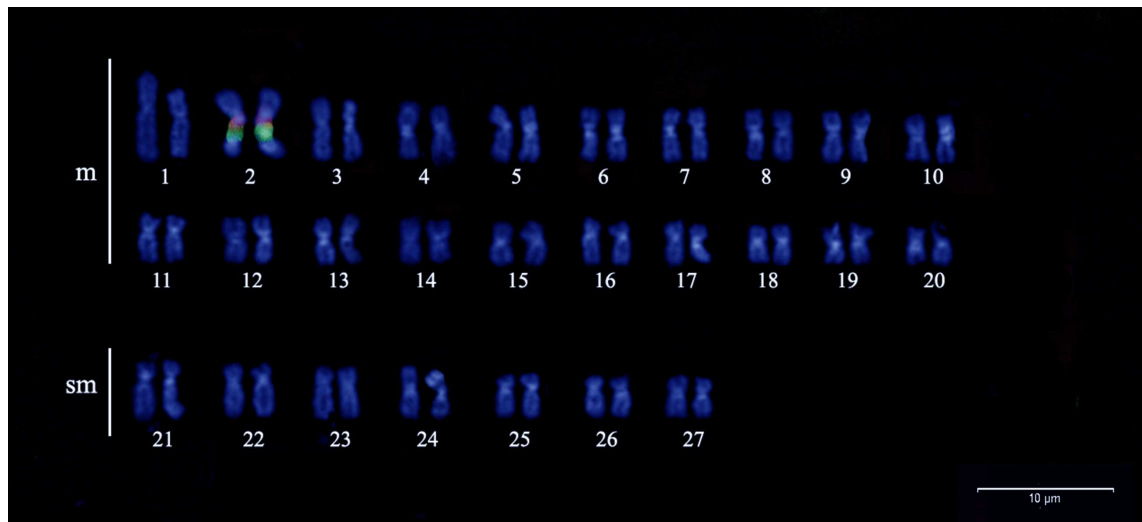


FIG. 9. Double FISH com as sondas de rDNA 5S (em verde) e 18S (em vermelho), evidenciando marcações sintênicas para os dois genes no segundo par cromossômico.

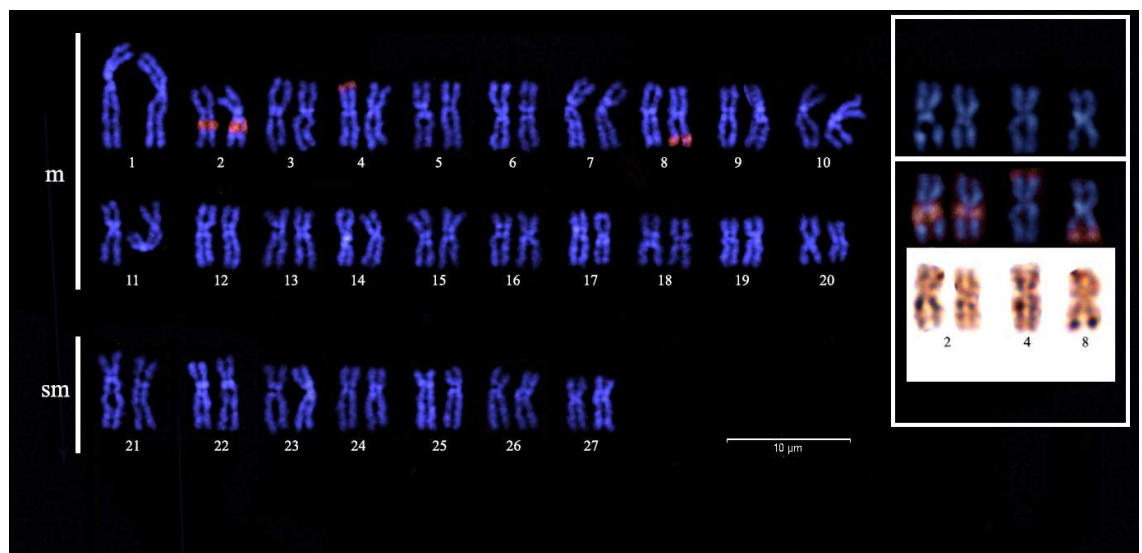


FIG. 10. FISH com rDNA 18S no indivíduo de *Prochilodus costatus* que apresentou uma variação na Ag-NOR, confirmando a variação da mesma e evidenciando um sítio de NOR inativo no par de cromossomos 4.

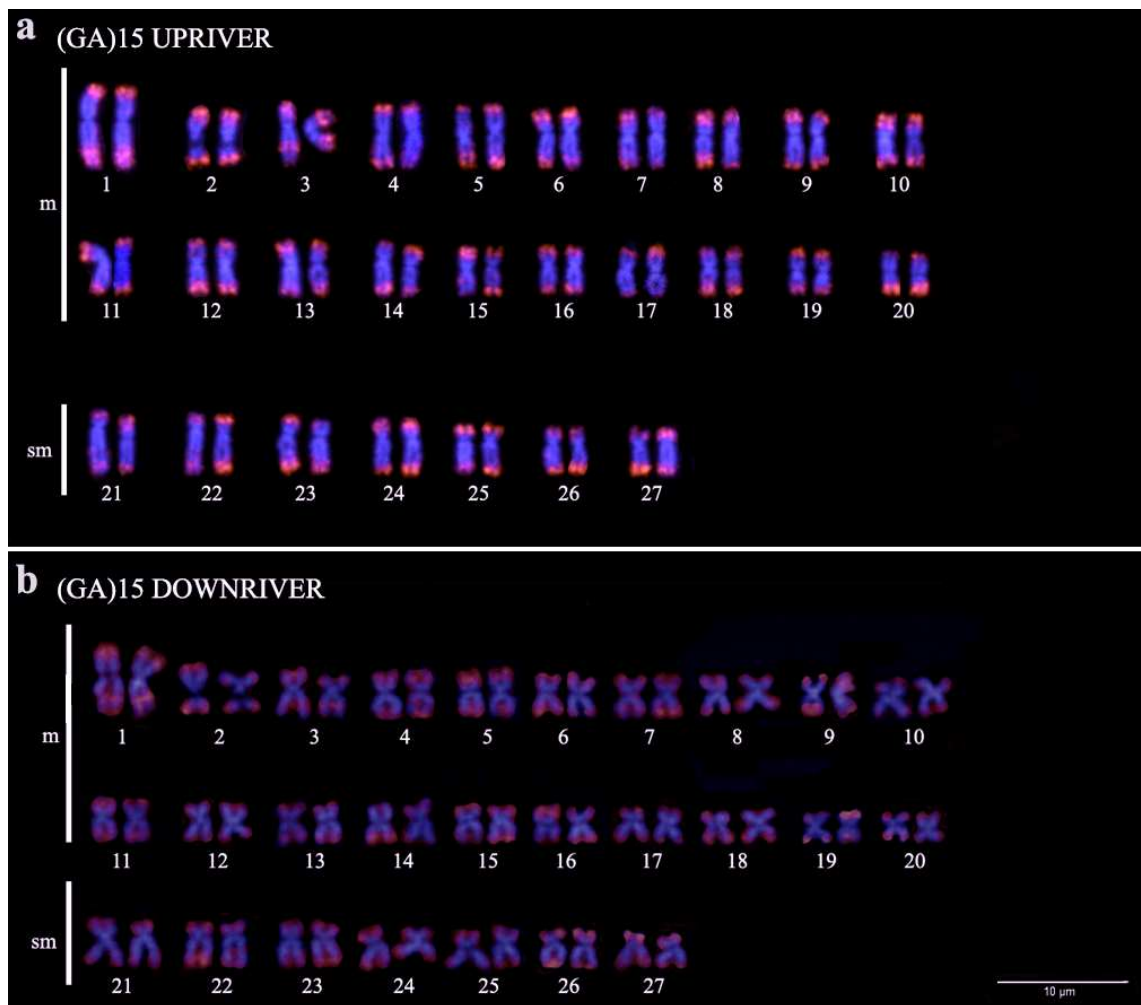


FIG. 11. FISH com DNA microssatélite (GA)₁₅ em indivíduos de *Prochilodus costatus* localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.

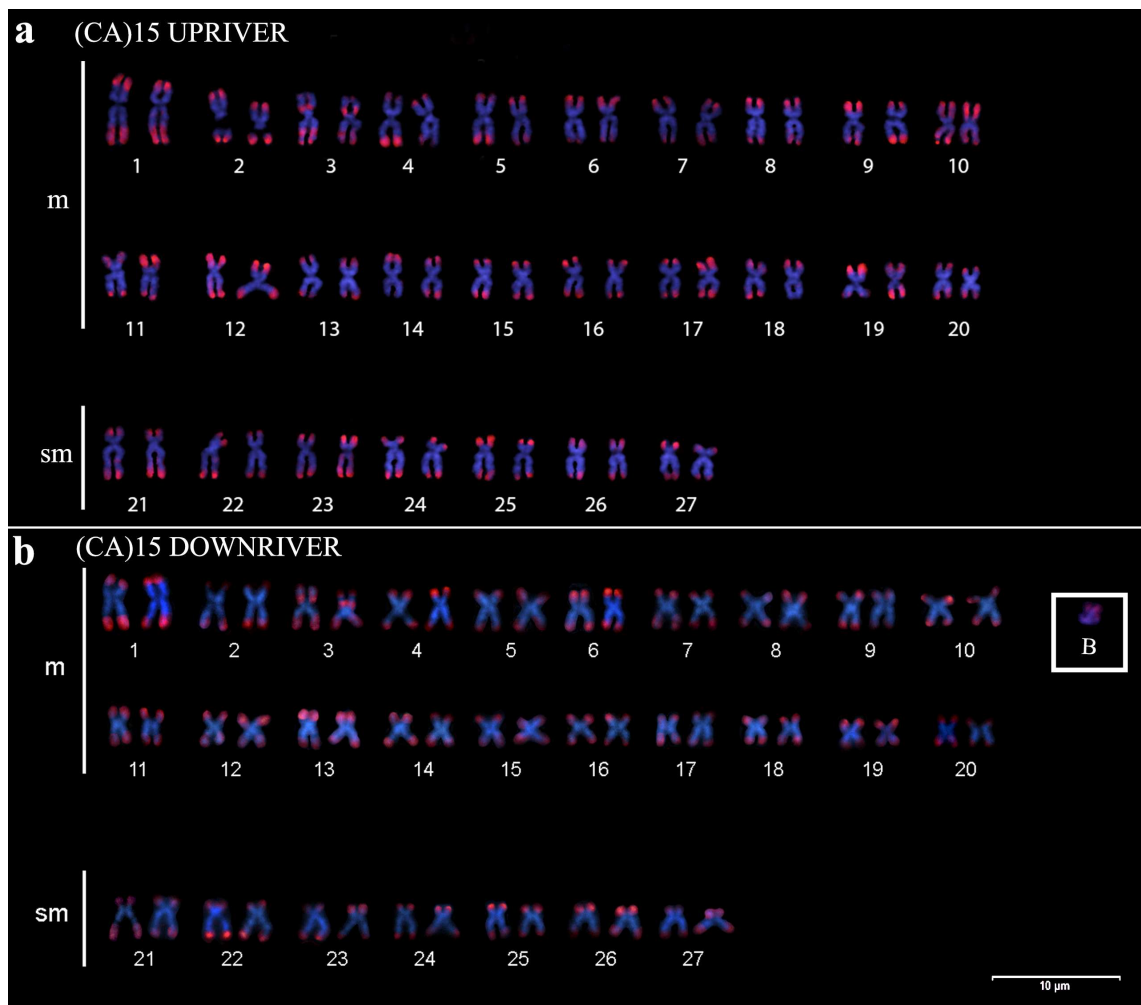


FIG. 12. FISH com DNA microssatélite (CA)₁₅ em indivíduos de *Prochilodus costatus* localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias. O cromossomo supranumerário apresentou marcações para essa sonda (b, caixa).

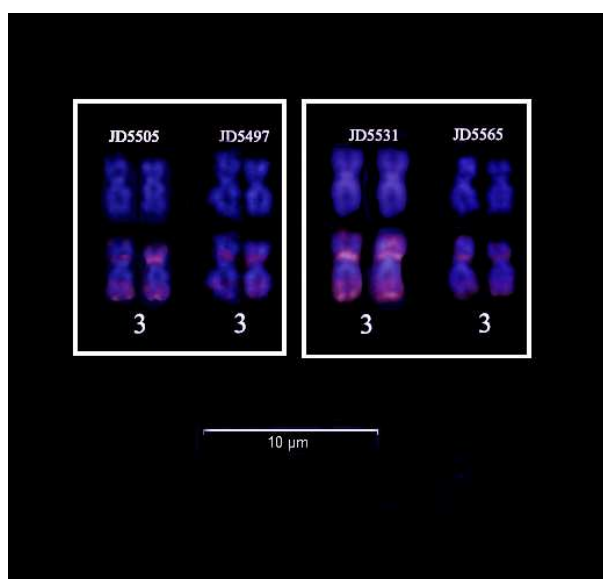


FIG. 13. A marcação intersticial do braço menor do par cromossômico 3 está associada a presença de uma constrição cromossômica, ocorrendo a montante e a jusante.

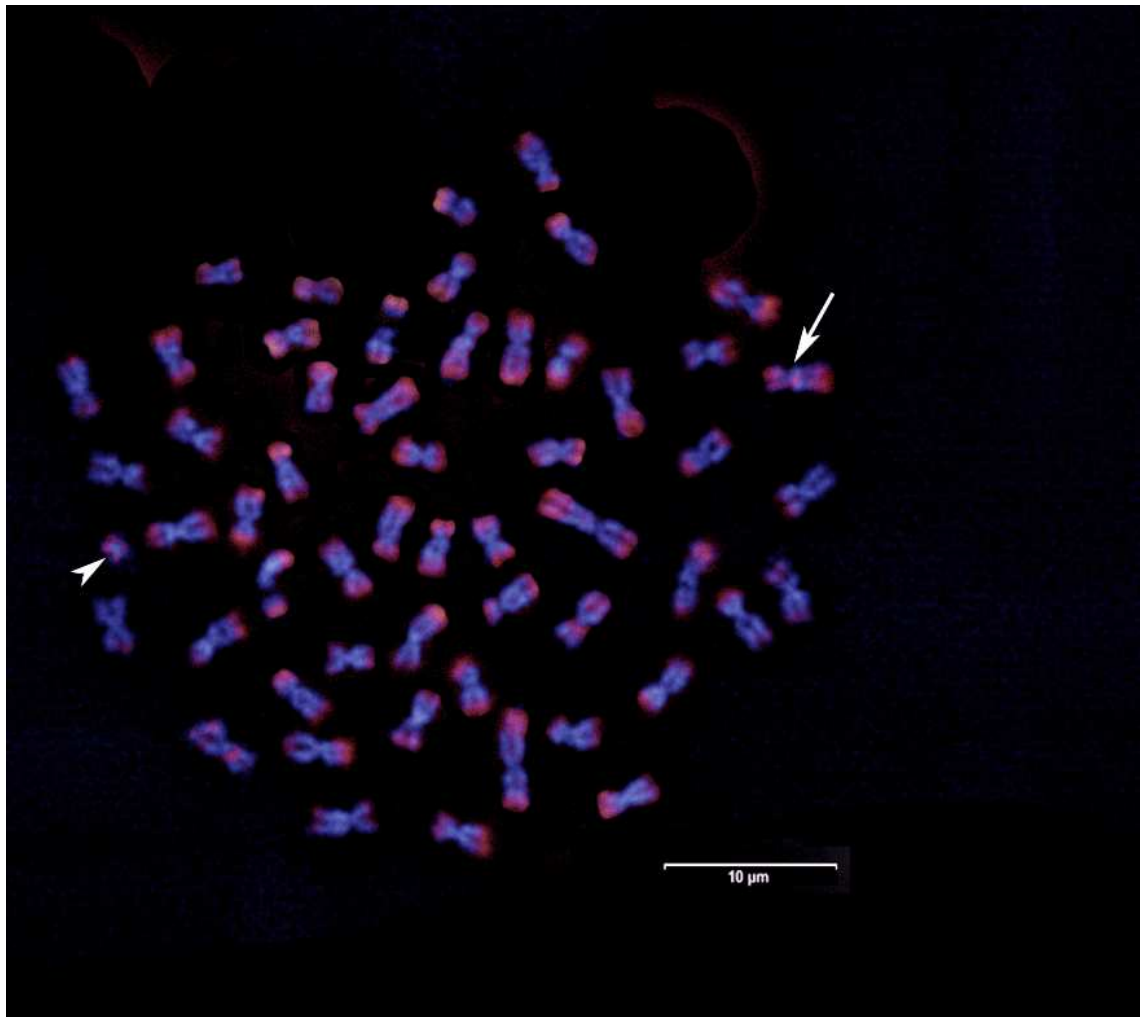


FIG. 14. Variação da sonda $(CA)_{15}$ detectada em um indivíduo localizado a montante, evidenciando uma marcação na região pericentromérica de um cromossomo metacêntrico (seta). O cromossomo supranumerário dos indivíduos localizados a montante também apresentaram marcações nos cromossomos supranumerários (cabeça de seta).

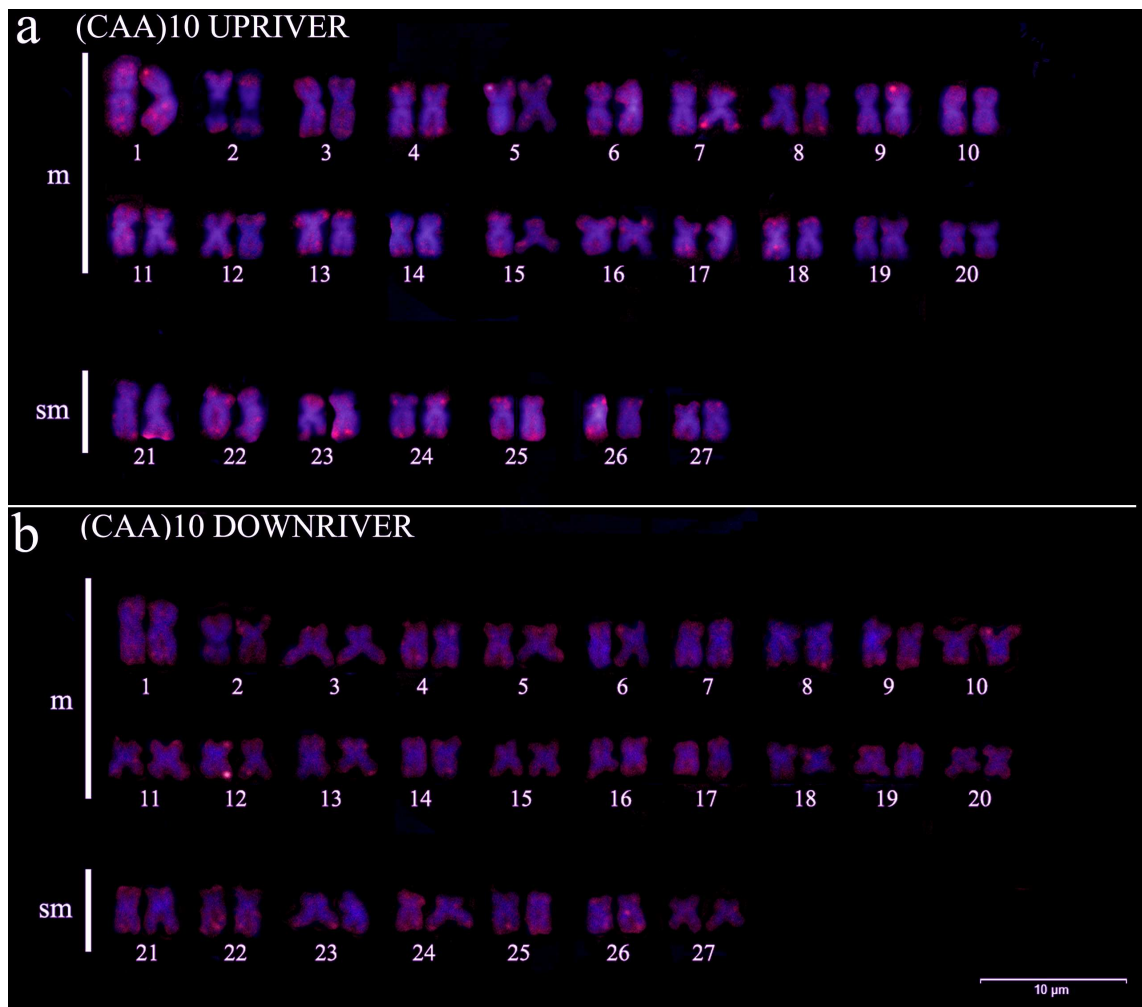


FIG. 15. FISH com DNA microssatélite (CAA)₁₀ em indivíduos de *Prochilodus costatus* localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.

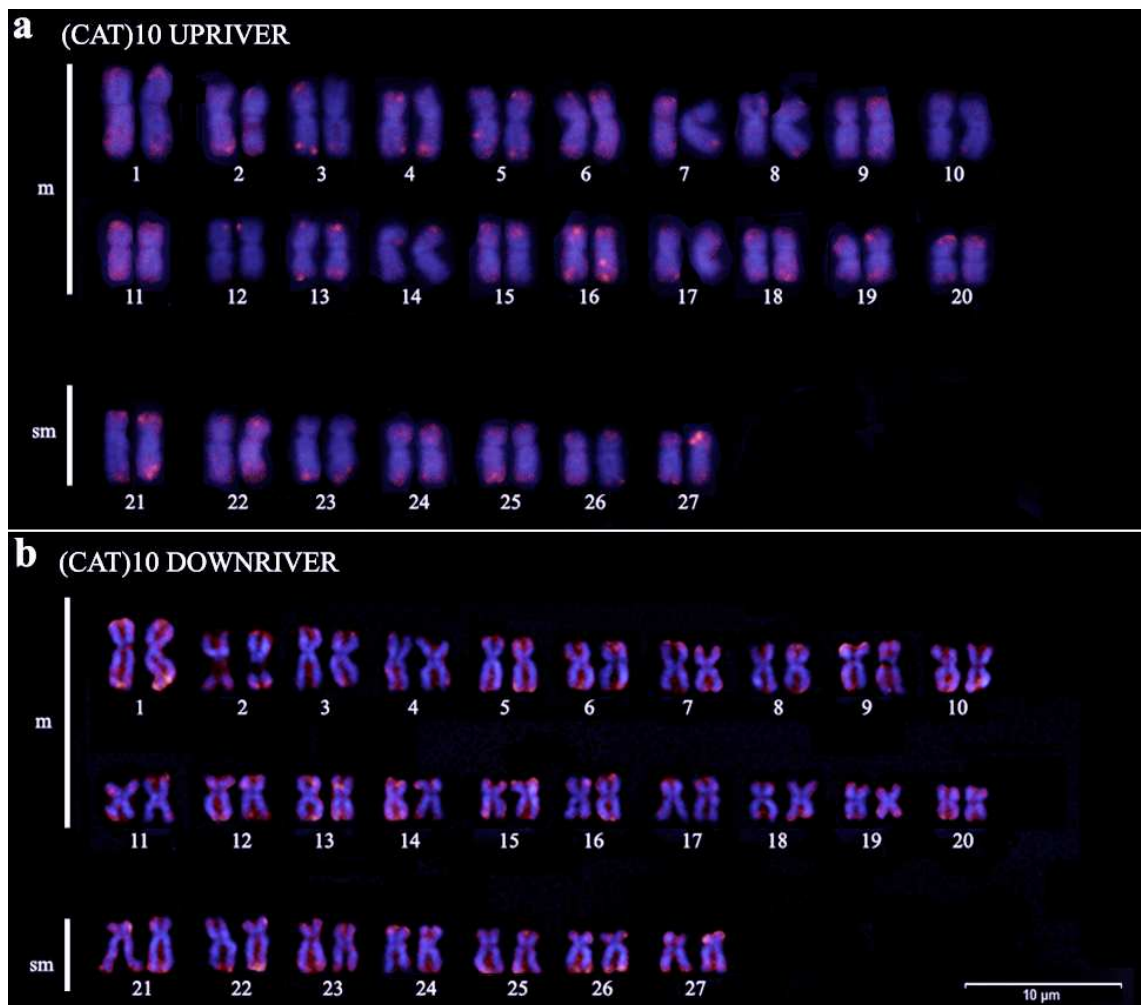


FIG. 16. FISH com DNA microssatélite (CAT)₁₀ em indivíduos de *Prochilodus costatus* localizados a montante/UPRIVER (a) e a jusante/DOWNRIVER (b) da UHE Três Marias.

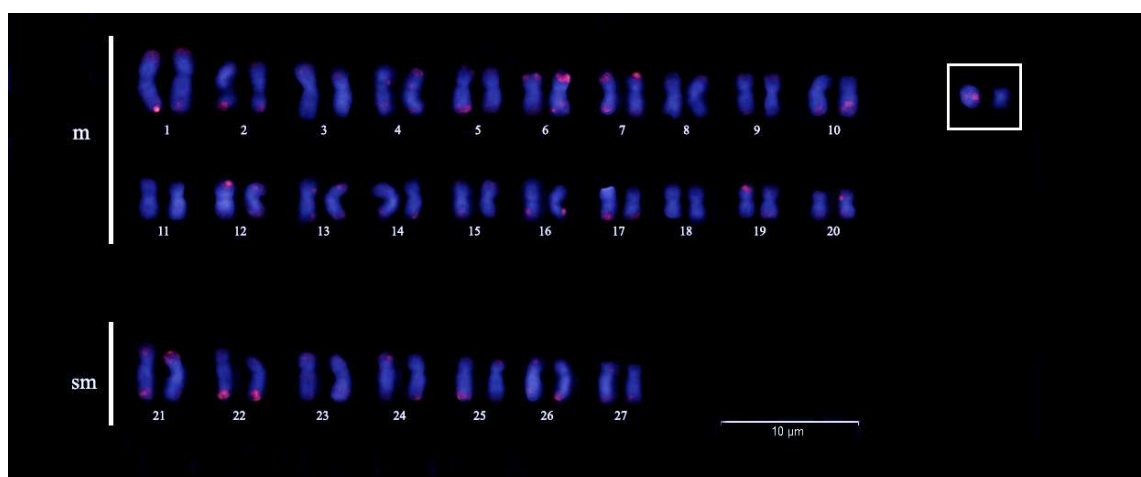


FIG. 17. Variação detectada na FISH com DNA microssatélite (CAT)₁₀ em um indivíduo de *Prochilodus costatus* localizados a montante da UHE Três Marias. O mesmo apresenta dois cromossomos supranumerários, um cromossomo apresenta sinais

conspícuos em sua região centromérica, enquanto o outro cromossomo não marca para a sonda utilizada (caixa).

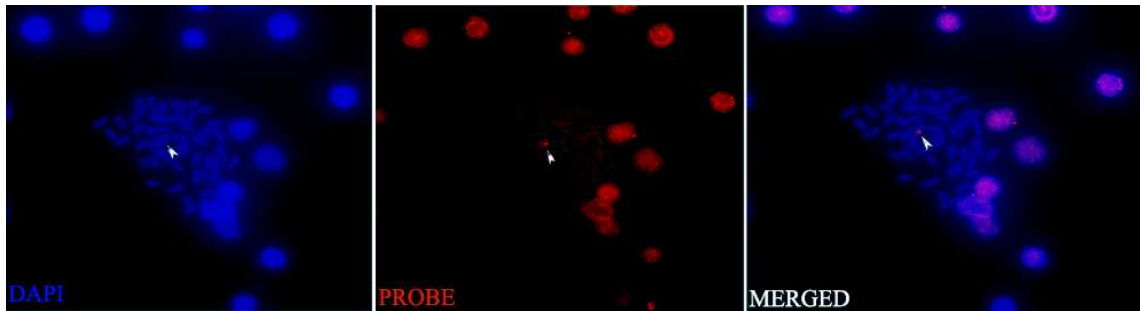


FIG. 18. Pintura cromossômica realizada com a sonda de *Prochilodus costatus*, com a imagem do DAPI, da sonda (PROBE) e a sobreposição das mesmas, que evidenciou marcação apenas no cromossomo supranumerário (cabeças de setas).



FIG. 19. Indivíduos de *P. costatus* coletados que apresentam um (JD5483) e um ou dois (JD5487) cromossomos supranumerários em todas as metáfases analisadas. JD5483 apresenta uma morfologia típica da espécie, enquanto JD5487 é alongado em relação a outros *P. costatus* analisados.