

FREDERICO FERNANDES FERREIRA

COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Prochilodus argenteus* SPIX & AGASSIZ, 1829 (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) A MONTANTE E A JUSANTE DA UHE DE TRÊS MARIAS, BACIA DO SÃO FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL.

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

F383c
2015
Ferreira, Frederico Fernandes, 1986-
Comparação citogenética entre populações de *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae) a montante e a jusante da UHE de Três Marias, Bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil / Frederico Fernandes Ferreira. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 38f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.20-26.

1. Peixes. 2. *Prochilodus argenteus*.
3. *Prochilodus costatus*. 4. Citogenética. 5. Cromossomos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

FREDERICO FERNANDES FERREIRA

COMPARAÇÃO CITOGÊNÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Prochilodus argenteus* SPIX & AGASSIZ, 1829 (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) A MONTANTE E A JUSANTE DA UHE DE TRÊS MARIAS, BACIA DO SÃO FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL.

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.

Dra. Denilce Meneses Lopes

Dr. Evanguedes Kalapothakis

Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico este trabalho às pessoas que me guiaram e me acompanharam até aqui, meus queridos pais, professores e amigos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A bacia do rio São Francisco	1
1.2. As barragens hidrelétricas	3
1.3. A família Prochilodontidae	4
1.4. Estudos citogenéticos.....	5
1.5. Relevância do DNA repetitivo	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO.....	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	27
Anexo 1.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Espécime de <i>Prochilodus argenteus</i> coletado na bacia do São Francisco. Foto: Frederico F. Fernandes.	13
Figura 2: Mapa da bacia hidrográfica do São Francisco, indicando as localidades de coleta (vermelho).....	13
Figura 3: Cariótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD5499) e a jusante (B, JD 5371) da UHE de Três Marias, utilizando coloração convencional Giemsa.	27
Figura 4: Diferentes padrões de NORs (setas amarelas) encontrados em ambas as populações de <i>Prochilodus argenteus</i> , em A, um par de marcações, padrão mais comum, em B uma terceira marcação telomérica.	28
Figura 5: Metáfases de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD5488) e a jusante (B, JD 5365) da UHE de Três Marias, utilizando técnica de bandamento C, setas amarelas evidenciam o par heterocromático.	27
Figura 6: Cariótipo de <i>Prochilodus argenteus</i> , após técnica de bandamento C.	28
Figura 7: Cariótipo de <i>Prochilodus argenteus</i> (JD5519) após técnica de Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) utilizando as sondas 18S (vermelho) e 5S rDNA(verde).	28
Figura 8: Cariótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD5492) e a jusante (B, JD 5410) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) utilizando a sonda (GA) ₁₅ (vermelho).....	29
Figura 9: Cariótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD5492) e a jusante (B, JD 5403) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CA) ₁₅ (vermelho).....	30
Figura 10 Cariótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD5491) e a jusante (B, JD 5403) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CAA) ₁₀ (vermelho).	31
Figura 11: Cariótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> a montante (A, JD 5499) e a jusante (B, JD 5365) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CAT) ₁₀ (vermelho).	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Informação citogenética em relação à família Prochilodontidae, gêneros <i>Prochilodus</i> e <i>SemaProchilodus</i>	15
---	----

ANEXOS

Anexo 1- Protocolos	42
----------------------------	----

RESUMO

FERREIRA, Frederico Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Comparação citogenética entre populações de *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae) a montante e a jusante da UHE de Três Marias, Bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Prochilodus argenteus, a curimatá-pacu, juntamente com a sua espécie irmã, *Prochilodus costatus*, representam cerca de 50% da biomassa total da pesca, sendo as espécies migratórias mais abundantes na região de Três Marias e ambas endêmicas da bacia do rio São Francisco. A construção de hidrelétricas altera o ambiente e o fluxo gênico entre populações que podiam não estar isoladas no passado. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar se existem diferenças citogenéticas entre populações de *Prochilodus argenteus* que podem ter ficado isoladas pela barragem de Três Marias, bacia do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil, desde final da década de 1950. Foram coletados 44 espécimes: 14 a montante da represa, perto da cidade de Iguatama, e 30 a jusante (24 no Refúgio Estadual da Vida Silvestre do rio Pandeiros e seis no município de Três Marias). O número diploide de $2n=54$ e a fórmula cariotípica $40m + 14sm$ foram encontrados em todos os indivíduos. Em ambas as populações foram encontrados os seguintes padrões: a banda C apresentou blocos heterocromáticos centroméricos em todos os cromossomos, além de um bloco adicional pericentromérico no segundo par metacêntrico; a Ag-NOR evidenciou marcações simples no segundo par metacêntrico, coincidindo com a constrição secundária. Em aproximadamente 5% das metáfases ocorreu uma terceira marcação na região terminal de apenas um cromossomo. A técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando as sondas 18S e 5S rDNA evidenciou sintonia destas regiões no segundo par metacêntrico, coincidentes com a NOR e a constrição secundária. As sondas repetitivas $(GA)_{15}$ e $(CA)_{15}$ apresentaram marcações na região telomérica de todos os cromossomos e a sonda $(CA)_{15}$ evidenciou blocos na região pericentromérica no quarto par metacêntrico, sugerindo a ocorrência de inversão cromossômica. As sondas $(CAA)_{10}$ e $(CAT)_{10}$ apresentaram marcação na região telomérica na maioria dos braços cromossômicos e, de forma mais difusa, ao longo de alguns cromossomos. Com base nestes padrões, conclui-se que as populações, hoje isoladas pela UHE de Três Marias desde a década de 50, não sofreram diferenciação citogenética e podem ser consideradas como uma população única.

ABSTRACT

FERREIRA, Frederico Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Cytogenetic comparison between populations of *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae) upstream and downstream of the UHE Três Marias, the São Francisco Basin, Minas Gerais, Brazil.** Advisor: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Prochilodus argenteus, the curimatá-pacu, along with its sister species, *Prochilodus costatus* represent about 50% of the total biomass of fish, and migratory species more abundant in the area of Three Marias, both endemic to the São Francisco River basin. The construction of hydroelectric dams changes the environment and precludes gene flow between populations that were not isolated in the past. Thus, the aim of this study was to determine if there cytogenetic differences between populations of *Prochilodus argenteus* that became isolated by the Três Marias Dam, São Francisco Basin, Minas Gerais, Brazil, since late 1950s. Forty-four specimens were collected: 14 upstream of the dam, near the city of Iguatama, and 30 downstream (24 in the Refugio Estadual da Vida Silvestre do rio Pandeiros and six in the Três Marias Dam channel). We found a stable karyotype formula of $40m + 14sm$, $2n=54$. The following patterns were observed in both populations: The C banding showed centromeric heterochromatin blocks in all chromosomes, plus an additional pericentromeric block in the second chromosome metacentric pair. The nucleolus organizer regions (Ag-NOR) occurred on the second metacentric pair, coinciding with the secondary constriction. About 5% of the metaphases showed a third mark in the telomeric region of only one chromosome complements. The Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) with the 18S and 5S rDNA probes revealed synteny of these regions on the second metacentric pair, coinciding with the NOR and the secondary constriction. The $(GA)_{15}$ and $(CA)_{15}$ repetitive DNA probes showed markings on the terminal region of most chromosomes, and the $(CA)_{15}$ repetitive DNA probe hybridized in the pericentromeric region of the fourth chromosome pair, suggesting a chromosomal inversion. The $(CAA)_{10}$ and $(CAT)_{10}$ repetitive DNA probes hybridized on the terminal region of most chromosome arms and along some chromosomes. Based on these cytogenetic patterns, we concluded that the populations now isolated by UHE Três Marias since the 50's did not suffer cytogenetic differentiation and should be considered as a single population.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A bacia do rio São Francisco

O rio São Francisco nasce no Parque Nacional da Serra da Canastra, no sudoeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. Esta bacia drena áreas nos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Distrito Federal, cortando três biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Com 645 mil km², a bacia cobre 7,6% do território nacional. Seus maiores afluentes são: Paraopeba, das Velhas, Paracatu, Urucuia, Corrente e Grande. (Godinho & Godinho, 2003).

As principais usinas hidrelétricas na bacia do rio São Francisco encontram-se na calha principal do rio: Três Marias, construída em 1957, no seu terço superior e as demais (Sobradinho, Itaparica, Moxotó, o complexo de Paulo Afonso e Xingó) encontram-se no terço inferior. Em conjunto, elas têm capacidade de geração de 7.902 MW, e inundaram cerca de 6.250 km² de terras férteis (Godinho & Godinho, 2003). Os afluentes da margem direita, principalmente o Paraopeba e o rio das Velhas, são os mais intensamente poluídos e degradados devido ao maior desenvolvimento econômico das regiões de suas drenagens, como a Grande Belo Horizonte, recebendo esgotos doméstico e industrial, além de resíduos minerários (Alves & Pompeu, 2010). Os afluentes da margem esquerda, embora situados em áreas menos povoadas, vêm experimentando crescente pressão antrópica com o desenvolvimento da agricultura de cerrado. Não obstante, aí se encontra uma das áreas mais bem preservadas de Minas Gerais: a bacia do Urucuia, indicada como área prioritária para a conservação da biodiversidade do Estado, possuindo os últimos grandes remanescentes preservados do Cerrado mineiro (Drummond *et al.*, 2005).

São registradas cerca de 158 espécies de peixes de água doce para a bacia (Britski *et al.*, 1984; Sato & Godinho, 1999), cerca de sete delas são consideradas espécies migratórias de longa distância, com importante valor econômico para a pesca: curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*), curimatá-pioa (*Prochilodus costatus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), matrinhã

(*Brycon orthotaenia*), piau-verdadeiro (*Leporinus obtusidens*), pirá (*Conorhynchus conirostris*) e surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Godinho & Godinho, 2003).

A introdução de espécies exóticas ameaça a fauna local da bacia, que contém dezoito das 32 espécies de peixes ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais (Lins et al., 1997). Várias espécies exóticas já foram encontradas na bacia como o tucunaré (*Cichla* spp.), a corvina (*Plagioscion squamosissimus*), a carpa (*Cyprinus carpio*), o bagre-africano (*Clarias gariepinus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*), a tilápia (*Oreochromis* sp. e *Tilapia* sp.), dentre outras (Sato & Godinho, 1999). A bacia apresenta diferentes status de conservação ao longo da calha principal: considerada relativamente estável no segmento que se estende da foz do rio Abaeté à entrada da represa de Sobradinho, incluindo os rios Urucuia, Carinhanha, Corrente e Grande; vulnerável no trecho do rio São Francisco, a montante da represa de Três Marias, e nos rios Abaeté, Paracatu e Pandeiros; e ameaçada nos rios Pará, Paraopeba, das Velhas, Verde Grande e no baixo São Francisco, a jusante da barragem de Xingó (Sato & Godinho, 1999).

A calha principal do rio São Francisco, a jusante da represa de Três Marias, juntamente com os baixos cursos dos principais afluentes desse trecho, foram considerados como áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade do Estado de Minas Gerais devido à sua riqueza, endemismo e por ser local de reprodução de peixes de piracema (Drummond *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 1998). As principais recomendações para essas áreas são: manejo das descargas da represa de Três Marias, manutenção do regime de cheias, manutenção do trecho lótico, criação de unidade de conservação, manejo dos recursos pesqueiros e recuperação da qualidade da água (Godinho & Godinho, 2003).

1.2. As barragens hidrelétricas

As barragens hidrelétricas produzem forte impacto negativo na pesca, principalmente pelas alterações do regime hidrológico, da disponibilidade de abrigo, das condições físico-químicas da água, da redução da oferta de alimentos, do isolamento dos sítios de desova e a consequente redução da diversidade genética, levando ao declínio da ictiofauna local (Lowe-McConnell, 1987; Godinho & Godinho, 1994; Loures & Pompeu, 2012). Na bacia do rio São Francisco, as espécies migratórias como *Prochilodus argenteus* possuem grande valor pesqueiro e dependem de cheias como mecanismos de gatilhos e de condições térmicas específicas para reprodução, sendo também as mais afetadas pela construção de hidroelétricas (Godinho & Godinho, 2003).

A fragmentação entre as populações de peixes, causada pelas barragens hidroelétricas, pode reduzir o fluxo gênico e, conseqüentemente levar a diferenciação genética entre essas populações (Jager *et al.*, 2001; Neraas & Spruell, 2001; Barroca *et al.*, 2012). Estudos indicam a importância dos rios tributários para reprodução das espécies migratórias, minimizando o impacto ecológico das hidroelétricas no ciclo reprodutivo dessas espécies, como indicado para *Prochilodus argenteus* da região a jusante da barragem de Três Marias, onde o rio Abaeté age como um refúgio reprodutivo para a espécie (Sato *et al.*, 2005). O mesmo é observado para outras espécies endêmicas do rio São Francisco como *Leporinus reinhardti* (Lütken 1875) (Weber *et al.*, 2013) e *Brycon orthotaenia* Günther 1864 (Nunes *et al.*, 2015).

1.3. A família Prochilodontidae

A família Prochilodontidae pertence a ordem dos Characiformes e compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *SemaProchilodus* (6 espécies) (Castro & Vari, 2004), apresentando grande capacidade migratória, abundância natural e ampla distribuição na América do Sul, possuindo elevado interesse comercial em diversos países (Oliveira *et al.*, 2003). Suas espécies se caracterizam morfológicamente pela presença de lábios carnosos equipado com duas séries de dentes numerosos, relativamente pequenos, falciformes ou espatulados ligados aos lábios, formando um disco oral limitado por um anel de pequenos dentes, o trato digestivo demonstra especializações do estômago, ceco pilórico e intestino, mais pronunciadamente na elaboração e o alongamento dos dois últimos sistemas (Castro & Vari, 2004).

Prochilodus argenteus Spix & Agassiz 1829, conhecido popularmente como curimatã-pacu, é caracterizado por possuir corpo relativamente alto, comprimento padrão de aproximadamente 45 cm e 10 ou 11 fileiras horizontais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral. Esta última característica o diferencia da sua espécie-irmã, também endêmica da bacia do São Francisco, *Prochilodus costatus* Valenciennes 1849 que apresenta apenas 8 ou 9 escamas nesta região (Britski *et al.*, 1984; Castro & Vari, 2004). Estas espécies alcançam o maior porte dentro da família Prochilodontidae e representam mais de 50% da biomassa total de pescado, constituindo as espécies migratórias mais abundantes na região de Três Marias (Godinho & Godinho, 2003).

1.4. Estudos citogenéticos

As variações cromossômicas observadas com técnicas de citogenética clássica como a análise cariotípica obtida pela coloração convencional com Giemsa; análise das regiões organizadoras de nucléolo pela impregnação por prata (Ag-NOR); análise das regiões heterocromáticas através do bandamento C; e citogenética molecular utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas específicas e repetitivas; representam importantes ferramentas nos estudos citotaxonômicos em peixes (Vicari *et al.*, 2010; Cioffi, 2013). Estes marcadores permitem uma melhor caracterização das homologias entre os pares de cromossomos homólogos e entre os cromossomos de espécies diferentes (cromossomos homeólogos), assim como uma maior acurácia na determinação da composição do DNA em regiões cromossômicas específicas, representando assim uma ferramenta com grande potencial para detecção de processos de diferenciação entre populações de peixes (Maistro *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2014). As espécies da família Prochilodontidae apresentam em geral, uma grande similaridade cariotípica em termos de número cromossômico e fórmula cariotípica, possuindo apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com cromossomos sexuais restritos apenas a uma espécie (Tabela 1).

Tabela 1: Informação citogenética em relação à família Prochilodontidae, gêneros *Prochilodus* e *SemaProchilodus*, indicando o número de cromossomos B, cromossomos portadores de NOR, sítios de 18S e 5S.

Espécie	Bacia	Cariótipo	B	NOR	18S	5S	Referência
<i>P. argenteus</i>	Três Marias, São Francisco	40m+14sm	0	3	-	-	Pauls & Bertollo, 1990
<i>P. argenteus</i>	Três Marias, São Francisco	40m+14sm	0	2	2*-3	2*-3	Hatanaka & Galetti Jr., 2004
<i>P. argenteus</i>	Rio São Francisco	2n = 54	0	1	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2013
<i>P. argenteus</i>	Três Marias, São Francisco	2n = 54	3	2	2*	2*	Penitente <i>et al.</i> , 2015
<i>P. brevis</i>	Rio Curu, Ceará	40m+14sm	2	2	-	-	Pauls & Bertollo, 1990
<i>P. brevis</i>	Natal, Rio Grande do Norte	2n = 54	0	2	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2013
<i>P. costatus</i>	Três Marias, São Francisco	40m+14sm	0	3	-	-	Pauls & Bertollo, 1990
<i>P. costatus</i>	Baixo São Francisco	2n = 54	0	2	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2013
<i>P. lineatus</i>	Bacia do Rio Paraná	40m+14sm	5	2	-	-	Pauls & Bertollo, 1990

<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	-	-	-	Oliveira <i>et al.</i> , 1997
<i>P. lineatus</i>	Bacia do Rio Paraná	2n = 54	5	-	-	-	Cavallaro <i>et al.</i> , 2000
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	40m+14sm	4	2	-	-	Maistro <i>et al.</i> , 2000
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	2	2*-5	2*	Jesus & Moreira-Filho, 2003
<i>P. lineatus</i>	Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	3	2	2*	2*	Vicari <i>et al.</i> , 2006
<i>P. lineatus</i>	Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	3	2	-	-	Artoni <i>et al.</i> , 2006
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	40m+14sm	7	-	-	-	Artoni <i>et al.</i> , 2006
<i>P. lineatus</i>	Rio Paraná, Argentina	40m+14sm	0	2	2**	-	Gras <i>et al.</i> , 2007
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	2	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2009
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	5	-	-	-	Voltolin <i>et al.</i> , 2010
<i>P. lineatus</i>	Rio Paraná, Argentina	40m+14sm	2	2	2	-	Jorge <i>et al.</i> , 2011
<i>P. lineatus</i>	Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	2	-	-	-	Terencio <i>et al.</i> , 2012
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	4	2	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2013
<i>P. lineatus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	9	-	-	-	Voltolin <i>et al.</i> , 2013b
<i>P. mariae</i>	Rio Orinoco, Venezuela	40m+14sm	3	2	-	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>P. nigricans</i>	Rio Amazonas	40m+14sm	0	2	-	-	Pauls & Bertollo, 1990
<i>P. nigricans</i>	Rio Araguaia	2n = 54	2	-	-	-	Venere <i>et al.</i> , 1999
<i>P. nigricans</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm	0	-	-	-	Terencio <i>et al.</i> , 2012
<i>P. nigricans</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm	0	-	2*	2*	Terencio <i>et al.</i> , 2012b
<i>P. nigricans</i>	Tocantins – Araguaia	2n = 54	1	2	2*	2*	Voltolin <i>et al.</i> , 2013
<i>P. vimboides</i>	Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	40m+14sm	0	-	-	-	Pauls & Bertollo, 1990
<i>S. insignis</i>	Rio Negro, Amazonas	2n = 54	0	2	-	-	Feldberg <i>et al.</i> , 1987
<i>S. insignis</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm	0	-	-	-	Terencio <i>et al.</i> , 2012
<i>S. insignis</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm	0	2	2*	14	Terencio <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. kneri</i>	Rio Orinoco, Venezuela	40m+14sm	0	2	-	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>S. laticeps</i>	Rio Orinoco, Venezuela	40m+14sm	0	2	-	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>S. taeniurus</i>	Rio Negro,	2n = 54 ***	0	2	-	-	Feldberg <i>et al.</i> ,

	Amazonas						1987
<i>S. taeniurus</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm ***	0	-	-	-	Terencio <i>et al.</i> , 2012
<i>S. taeniurus</i>	Rio Negro, Amazonas	40m+14sm ***	0	2	2	16	Terencio <i>et al.</i> , 2012b

Legenda: m= metacêntrico, sm= submetacêntrico, 2n= numero cromossômico, quando

o autor não definiu a fórmula cariotípica (ver materiais e métodos).

* indica sintenia das sondas 18S e 5S rDNA.

** resultado obtido com a sonda 28S rDNA.

*** indica presença do sistema sexual ZZ/ZW.

1.5. Relevância do DNA repetitivo

As sequências de DNA repetitivo constituem a maior fração do genoma dos eucariotos e se dividem em duas classes: repetições em tandem (satélites, minissatélites e microssatélites) e elementos dispersos (transposons e retrotransposons) (Ferreira *et al.*, 2011; Cioffi *et al.*, 2012). Apesar de algumas sequências de DNA repetitivo possuírem funções claras, como DNA ribossomal, centromérico e telomérico, outras regiões eram consideradas até recentemente como “DNA lixo” (Biémont & Vieira, 2006). No entanto, estudos demonstram sua grande importância na manutenção da estrutura genômica, sendo sua formação um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram sua importância no processo de expressão gênica (Liu *et al.*, 2001), recombinação (Biet *et al.*, 1999) e replicação no DNA (Li *et al.*, 2002), tendo também papel na organização estrutural e funcional dos cromossomos e nos processos de diferenciação de cromossomos sexuais, conforme indicado na tilápia *Oreochromis niloticus* (Martins, 2007; Ferreira & Martins, 2008) e nas espécies do gênero *Triportheus* (Yano *et al.*, 2014). Sugere-se, ainda, que estas sequências repetitivas estejam envolvidas em rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, inversões e translocações, tendo grande influência nas variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002).

As moléculas de RNA ribossomal são codificadas por duas famílias multigênicas distintas, a primeira corresponde ao rDNA 45S que está organizado em matrizes em tandem contendo unidades de transcrição para os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S, enquanto a segunda família ribossomal transcreve o rRNA 5S. As duas classes de rDNA 45S e 5S têm sido extensivamente mapeadas em genomas de peixes (Cioffi & Bertollo, 2012). Na maioria das espécies, estas duas classes se apresentam em cromossomos diferentes enquanto em outras elas ocorrem em sintenia, como é o caso de todas as espécies estudadas do gênero *Prochilodus*, as quais apresentam sintenia dos genes ribossomais 45S e 5S (Jesus & Moreira-Filho, 2003; Voltolin *et al.*, 2013).

As sequências de DNA ribossomal em peixes apresentam diferentes níveis de variação entre os grupos (Vicari *et al.*, 2010; Ugarkovic & Plohl, 2002), e seus padrões de variação têm sido informativos sobre os processos microevolutivos e filogenéticos desses grupos (Vicari *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2012). Estas sequências podem ser facilmente isoladas e encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma, gerando sinais de fácil visualização após hibridização nos cromossomos (Martins *et al.*, 2006). Os primeiros trabalhos de mapeamento físico através das hibridizações *in situ* utilizando como sondas sequências de DNAs repetidos foram feitos com DNA ribossomais (rDNA) 28S, 18S, 5.8S e 5S (Martins *et al.*, 2006).

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples, consistem de motifs curtos (1 a 6 nucleotídeos de comprimento) organizadas por matrizes em tandem (Cioffi & Bertollo, 2012). Esta região genômica possui a capacidade de dar origem a variantes com um número diferente de repetições, podendo ser organizados em trechos longos que consistem de centenas a milhares de unidades de sequências e geralmente associadas à heterocromatina constitutiva em diversas espécies (Martins, 2007). Os microssatélites estão presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, desempenhando funções na manutenção e propagação do material genético nuclear, já que várias proteínas se ligam por afinidade a estas sequências (Csink & Henikoff, 1998). Além disso, o estudo das sequências de DNA repetitivo é importante para o conhecimento da estrutura cromossômica, além da origem e evolução dos cromossomos B cuja composição já estudada indica ser principalmente de DNA repetitivo e sexuais, aonde as regiões teloméricas dos cromossomos W e Y apresentam um grande bloco heterocromático em relação aos respectivos Z e X (Martins *et al.*, 2004; Galetti & Martins, 2004). Sondas de microssatélites (GA)₁₅ e (CA)₁₅ utilizadas em genomas de bagres dos gêneros *Hemibagrus* e *Mystus* exibem uma acumulação notável nas regiões subteloméricas (Supiwong *et al.*, 2014). No genoma da traíra, *Hoplias malabaricus*, 12 diferentes microssatélites evidenciaram hibridização em regiões subteloméricas e heterocromáticas de vários autossomos, com uma quantidade diferenciada de sinal entre os cromossomos sexuais (Cioffi *et al.*, 2011). O estudo

da distribuição cromossômica do DNA repetitivo no genoma de peixes, embora relativamente recente, é uma ferramenta importante na análise da organização genômica e evolução das espécies (Cioffi & Bertollo, 2012).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi realizar uma análise comparativa utilizando marcadores citogenéticos convencionais e moleculares em espécimes de *Prochilodus argenteus* aparentemente isoladas pela UHE de Três Marias, bacia do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil, com o intuito de encontrar possíveis diferenças cromossômicas que possam ter ocorrido nestas populações ao longo dos anos de isolamento por esta barragem possibilitando a diferenciação destas populações sob o ponto de vista citogenético e conseqüentemente sua conservação sob o aspecto ecológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar populações da espécie *Prochilodus argenteus* em relação a macroestrutura cariotípica apresentada pela citogenética clássica.
- Analisar a distribuição e localização cromossômica das classes de DNA ribossomais e repetitivos através da hibridização *in situ* fluorescente nas populações de *Prochilodus argenteus*.
- Comparar os níveis de variação cromossômica entre as populações de *Prochilodus argenteus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta e quatro indivíduos de *Prochilodus argenteus* (Figura 1) foram coletados em três diferentes localidades na bacia do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil: seis no município de Três Marias, a jusante da Usina Hidrelétrica de Três Marias; 24 no Refúgio Estadual da Vida Silvestre do rio Pandeiros, também a jusante desta UHE; e 14 no município de Iguatama, a montante desta UHE (Figura 2). A permissão de coleta SISBIO14975-1 foi fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) ao professor Jorge Abdala Dergam. Os espécimes coletados foram depositados na coleção científica do Museu de Zoologia João Moojen em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (lotes MZUFV4223, MZUFV4340 e MZUFV4341).

Os peixes foram anestesiados e eutanasiados com solução aquosa de óleo de cravo na concentração de 300 mg.L⁻¹ (Lucena *et al.*, 2013) conforme aprovado pela autorização 35/2014 do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa. Os cromossomos mitóticos metafásicos foram obtidos conforme (Bertollo *et al.*, 1978).

As seguintes técnicas citogenéticas foram realizadas: Giemsa para a determinação do número diploide e a fórmula cromossômica; bandamento C para evidenciação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972); bandamento NOR para evidenciação das regiões organizadoras de nucléolo (Howell & Black, 1980); hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com as sondas ribossomais 18S e 5S rDNA e com as sondas repetitivas (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀ e (CAT)₁₀ (Pinkel *et al.*, 1986) (Anexo 1). O registro fotográfico foi feito em microscópio Olympus BX-53, a câmara DP73 e as imagens foram capturadas com o software CellSens. Os cariótipos foram analisados e medidos com auxílio do software Image-Pro Plus® e classificados conforme a razão entre o tamanho dos braços maior pelo menor em metacêntricos (m=1 a 1,77) e submetacêntricos (sm=1,78 a 3,00) (Levan *et al.*, 1964).



Figura 1: Espécime de *Prochilodus argenteus* coletado na bacia do São Francisco. Foto: Frederico F. Fernandes.

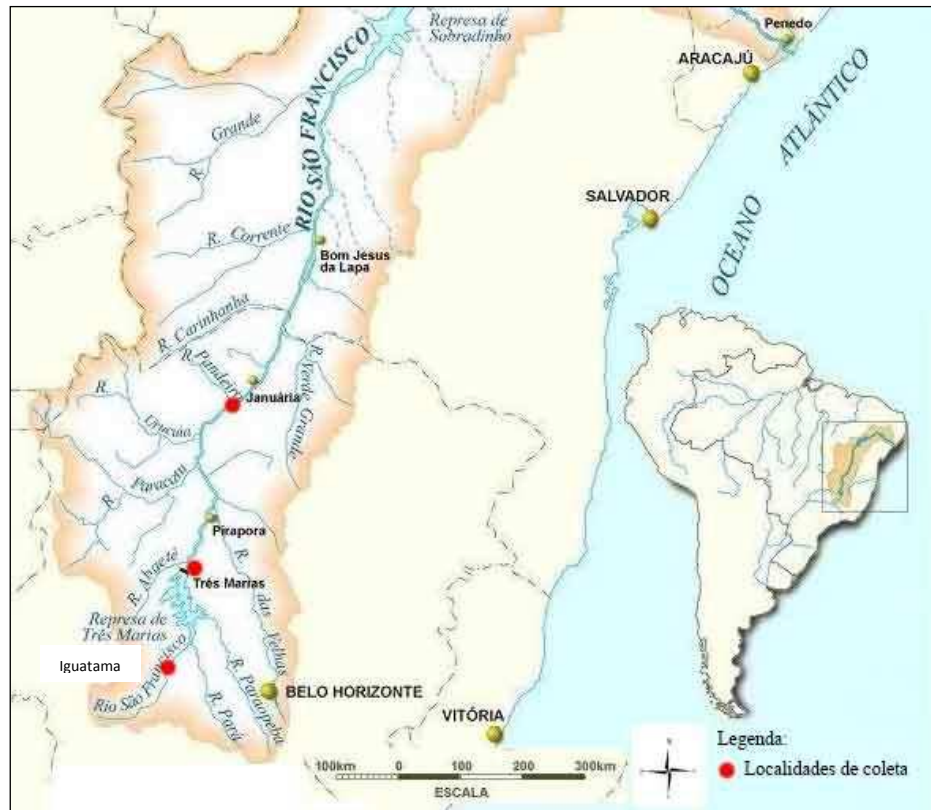


Figura 2: Mapa da bacia hidrográfica do São Francisco, indicando as localidades de coleta (vermelho).

4. RESULTADOS

Foram analisadas 240 metáfases (média de 5 metáfases por espécime). Todos os espécimes apresentaram $2n=54$ cromossomos e fórmula cariotípica $40m+14sm$ (Figura 3). A técnica de banda C marcou a região centromérica de todos os cromossomos e a região pericentromérica do segundo par metacêntrico, coincidente com a constrição secundária, sem variações intra-individuais ou intra-populacionais (Figura 4 e Figura 5). A banda Ag-NOR ocorreu em apenas um par de cromossomos na maior parte das metáfases analisadas e foi também coincidente com a constrição secundária presente no segundo par metacêntrico. Porém, em 5% das 60 metáfases analisadas foram observados um segundo padrão constituído de uma marcação subtelomérica adicional em um dos cromossomos do mesmo par cromossômico (Figura 6).

A técnica de FISH com sondas dos genes ribossomais 18S e 5S mostrou marcação sintênica intersticial localizadas no segundo par metacêntrico (Figura 7). Ambas as marcações foram coincidentes com a constrição secundária, não sendo observadas diferenças entre as populações. A sonda $(GA)_{15}$ evidenciou blocos repetitivos nas posições subteloméricas de todos os cromossomos, sem variação intrapopulacional (Figura 8). Por outro lado, a sonda $(CA)_{15}$ evidenciou blocos repetitivos nas regiões subteloméricas de quase todos os cromossomos; em 80% das metáfases, o quinto par apresentou apenas marcação pericentromérica (Figura 9). As sondas $(CAA)_{10}$ e $(CAT)_{10}$ apresentaram marcações mais difundidas ao longo dos cromossomos e em algumas regiões terminais próximas aos telômeros em grande parte dos cromossomos, além de marcações pericentroméricas em alguns cromossomos (Figura 10 e Figura 11).

5. DISCUSSÃO

Desde o início dos estudos citogenéticos no gênero *Prochilodus* é relatada a similaridade morfológica dos cariótipos entre suas espécies em relação ao número cromossômico e aos tipos morfológicos (m-sm) (Pauls & Bertollo, 1990). Todas as espécies estudadas até o momento apresentam $2n=54$ cromossomos e $NF=108$, possuindo apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com a constrição secundária no segundo par metacêntrico (Pauls & Bertollo, 1983; 1990; Galetti Jr., 1991; Oliveira *et al.*, 1997; Cavallaro *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Jesus & Moreira-Filho, 2003; Jorge *et al.*, 2011; Voltolin *et al.*, 2009; 2013). Esta estabilidade cariotípica é compartilhada com famílias filogeneticamente relacionadas à Prochilodontidae como Parodontidae, Anostomidae e Curimatidae (Galetti *et al.*, 1994).

Possíveis variações do número diploide no gênero *Prochilodus* estão relacionadas com a ocorrência de cromossomos supranumerários ou Bs. No presente trabalho não foram identificados cromossomos B em *P. argenteus*, de forma consistente aos resultados obtidos em estudos anteriores. (Pauls & Bertollo, 1990; Artoni *et al.*, 2006; Hatanaka & Galetti Jr, 2004; Voltolin *et al.*, 2013). Recentemente, porém, foram encontrados até três cromossomos B em indivíduos desta espécie em matrizes derivadas de populações naturais da bacia do rio São Francisco, capturadas próximas à região de Três Marias (Penitente *et al.*, 2015).

O padrão de banda C de blocos heterocromáticos centroméricos em todos os cromossomos é um caráter conservado dentro do gênero *Prochilodus* (Pauls & Bertollo, 1990). No presente trabalho foi encontrado um bloco adicional intersticial no segundo par metacêntrico, como já descrito em *P. argenteus*, *P. brevis*, *P. costatus* e *P. nigricans* (Voltolin *et al.*, 2013). Diversos estudos realizados em *P. lineatus*, além da heterocromatina centromérica e do bloco adicional no par metacêntrico, ocorre marcação eventual na região telomérica de um par submetacêntrico (Maistro *et al.*, 2000; Artoni *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006; Gras *et al.*, 2007). Estudos em *SemaProchilodus*, gênero da família Prochilodontidae, mostram o mesmo padrão de marcações centroméricas nas espécies *S. insignis* (Terencio *et al.*, 2012) e *S. laticeps*

(Oliveira *et al.*, 2003), sugerindo se tratar de um caráter primitivo dentro da família. Em *S. kneri*, um bloco heterocromático adicional foi observado no braço longo do par cromossômico 24, sugerindo que pequenos arranjos estruturais sejam o principal mecanismo causador de diversificação cariotípica na família (Oliveira *et al.*, 2003).

A NOR restrita a um par de cromossomos homólogos é considerada uma simpliomorfia dentro da família Prochilodontidae, ocorrendo em *Prochilodus* e *SemaProchilodus* (Pauls & Bertollo, 1990; Oliveira *et al.*, 2003; Terencio *et al.*, 2012; Voltolin *et al.*, 2013). No presente trabalho, o segundo par metacêntrico foi marcado com NORs no braço longo, de forma coincidente com a constrição secundária e com o bloco conspícuo de heterocromatina. Adicionalmente, cerca de 3,3% das metáfases analisadas na população a montante da UHE Três Marias e 1,7% das metáfases da população a jusante, mostraram uma terceira marcação terminal em um dos cromossomos do segundo par metacêntrico. Uma marcação adicional de NOR na região subtelomérica já havia sido relatada em *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus* (Pauls & Bertollo, 1990; Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Gras *et al.*, 2007).

No presente estudo foi observado que o FISH com ambas as sonda ribossomais 18S e 5S rDNA diferiram da NOR por apresentarem apenas um par de marcações, indicando que as variações no número de NORs podem ser devido à inespecificidade da técnica (Howell, 1987), visto que as marcações ocorrem nas regiões organizadoras de nucléolo que estavam ativas na última interfase celular (Sumner, 2003). Diferentemente, Hatanaka & Galetti Jr. (2004) indicam ocasionalmente uma terceira marcação tanto do gene 18S quanto do 5S na população de *P. argenteus* da região de Três Marias. Em *P. lineatus* também é relatada uma variação na quantidade de genes 18S marcados, variando de dois a cinco marcações em diferentes populações (Jesus & Moreira-Filho, 2003). Estudos citogenéticos em espécies do gênero *SemaProchilodus* indicam grande variação em relação ao número e posição de marcações do gene 5S rDNA, variando de 14 a 16 marcas em contraste com um único par de marcações do gene 18S rDNA, sugerindo uma maior estabilidade relativa do cístron 18S dentro desta família (Terencio *et al.*, 2012).

Ambas as sondas ribossomais, 18S e 5S rDNA, marcadas pelo FISH evidenciaram a sintenia destes marcadores no segundo par metacêntrico, coincidentes com a constrição secundária. Apesar de incomum entre vertebrados, a posição sintênica e intersticial dos genes 18S e 5S em *Prochilodus* é comum e já foi descrita em *P. argenteus*, *P. lineatus*, *P. brevis*, *P. costaus* e *P. nigricans* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Voltolin *et al.*, 2013). Estudos anteriores em outras 43 espécies de peixes, de diferentes ordens: Acipenseriformes, Anguilliformes, Characiformes, Perciformes, Salmoniformes e Tetraodontiformes indicam uma tendência geral para localização intersticial do gene 5S rDNA em peixes (Martins & Galetti, 2001).

O FISH utilizando sondas repetitivas tem sido bastante utilizado em estudos populacionais de peixes por serem potencialmente mais variáveis e, portanto, úteis como ferramenta para a diferenciação genética entre as formas cariotípicas (Jesus & Moreira-Filho, 2003; Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Voltolin *et al.*, 2013; Cioffi *et al.*, 2011). As sondas repetitivas (GA)₁₅ e (CA)₁₅ apresentaram bandas na região terminal próxima ao telômero em todos os braços cromossômicos. Diferentemente da sonda (GA)₁₅ que mostrou apenas marcações teloméricas, a sonda (CA)₁₅ apresentou marcações adicionais na região pericentromérica em 80% das metáfases analisadas, sugerindo que pode ter ocorrido um processo de inversão paracêntrica no braço menor do quinto par metacêntrico, porém sem mostrar diferenças entre os indivíduos ou entre as populações. A ocorrência de sítios teloméricos na região intersticial em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foi indicativa, posteriormente confirmada, de eventos de fusão cromossômica que ocorreram durante a diferenciação cariotípica desta espécie (Chew *et al.*, 2002; Mota-Velasco *et al.*, 2010)

As sondas (CAT)₁₀ e (CAA)₁₀ apresentaram o mesmo padrão de regiões subteloméricas e algumas marcações ao longo dos cromossomos, porém sem mostrar diferenças entre os indivíduos ou entre as populações. Este padrão preferencialmente terminal já foi descrito para outras espécies utilizando as mesmas sondas em da ordem Characiformes: *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2011); *Leporinus reinhardtii*, *Triportheus auritus* (Cioffi *et al.*, 2012); *Leporinus elongatus*, *L. conirostris*, *L. obtusidens* (Poltronieri *et al.*, 2013); *Triportheus*

trifurcatus (Yano *et al.*, 2014); e também em espécies da ordem Siluriformes: *Imparfinis schubarti*, *Steindachneridion scripta*, *Rineloricaria latirostris* e *Mystus bocourti* (Vanzela *et al.*, 2002; Supiwong *et al.*, 2013). Diferentemente do padrão geral, a sonda (CAT)₁₀ em diversas espécies de *Leporinus* apresentam sinais de hibridização mais intensa em apenas 2 autossomos na região terminal (Poltronieri *et al.*, 2013). Estudos em *Semaprochilodus*, gênero filogeneticamente relacionado, utilizando sequências repetitivas com o microssatélite (TTAGGG)_n, indicou a localização sempre restrita nas regiões terminais de todos os cromossomos, como o encontrado para as sondas repetitivas utilizadas no presente trabalho (Terencio *et al.*, 2012).

Outros estudos moleculares, com sequências de microssatélites em *Prochilodus* corroboram o alto grau de conservação das regiões genômicas em diferentes populações desse gênero, assim como os dados de citogenética clássica (Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2010; Hatanaka *et al.*, 2002). Ferramentas moleculares analisando diferenças entre sequências de microssatélites foram utilizadas para evidenciar estruturação genética populacional em *P. magdalenae* do Rio Magdalena (Berdugo & Barandica, 2014). Hatanaka *et al.* (2006) também relataram estruturação genética em populações de *P. argenteus* na região do médio São Francisco com os mesmos marcadores. Porém, estudos posteriores utilizando as mesmas ferramentas, não encontraram estruturação entre as populações de *P. argenteus* da mesma área de coleta, indicando que a espécie pode constituir uma única população (Sanchez *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2013). Este resultado também foi relatado para *P. costatus* na mesma região (Carvalho-Costa *et al.*, 2008). Barroca *et al.*, (2012) analisando complexos hipervariáveis de sequências de microssatélites indicam como comum pequenas variações dentro e entre as populações de *P. costatus* a jusante e a montante de Três Marias, sugerindo o sucesso do trabalho realizado na CODEVASF na manutenção da variabilidade genética entre as populações.

De acordo com Oliveira *et al.* (2009), espécies com alta mobilidade e compostas por populações com grande número de indivíduos tendem a manter constituições cromossômicas

mais estáveis, corroborando assim, os resultados deste trabalho que indicam que as populações de *P. argenteus* coletadas em diferentes localidades ao longo da UHE de Três Marias se assemelham bastante do ponto de vista citogenético, confirmando o forte conservadorismo proposto para esta espécie e indicando que estas populações fazem parte de um estoque panmítico, porém pequenas variações indicam que as populações podem apresentar características citogenéticas únicas que diferenciem as mesmas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Estação de Piscicultura da Companhia Desenvolvimento Vale São Francisco (CODEVASF) e Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, C. B. M., & Pompeu, P. S. (2010). *Peixes do Rio das Velhas : Passado e Presente PEIXES DO RIO DAS VELHAS : passado e presente.*
- Artoni, R. F., Vicari, M. R., Endler, A. L., Cavallaro, Z. I., De Jesus, C. M., De Almeida, M. C., ... Bertollo, L. A. C. (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*, *127*, 277–284. <http://doi.org/10.1007/s10709-005-4846-1>
- Barroca, T. M., Santos, G. B., Duarte, N. V. R., & 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. <http://doi.org/10.4238/2012.September.27.4>
- Berdugo, G. O., & Barandica, J. C. N. (2014). Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena river basin and its tributaries, Colombia. *Genetics and Molecular Biology*, *37*, 37–45. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572014000100008>
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S., & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (pisces, erythrinidae). *Revista Brasileira de Genetica*, *1*(2), 103–120.
- Biémont, C., & Vieira, C. (2006). Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, *443*(7111), 521–524. <http://doi.org/10.1038/443521a>
- Biet, E., Sun, J. S., & Dutreix, M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: An effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, *27*(2), 596–600. <http://doi.org/10.1093/nar/27.2.596>
- Carvalho-Costa, L. F., Hatanaka, T., & Galetti, P. M. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, *31*, 377–380. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200036>
- Castro, R. M. C., & Vari, R. P. (2004). *Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes) : a phylogenetic and revisionary study. Smithsonian Contributions to Zoology.* <http://doi.org/10.5479/si.00810282.622>
- Cavallaro, Z. I., Bertollo, L. a C., Perfectti, F., & Camacho, J. P. M. (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, *8*(7), 627–634. <http://doi.org/10.1023/A:1009242209375>

- Chew, J. S. K., Oliveira, C., Wright, J. M., & Dobson, M. J. (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, *111*(1), 45–52. <http://doi.org/10.1007/s00412-002-0187-3>
- Cioffi, M. B. (2013). Molecular Cytogenetics of Fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, *141*(2-3), 75–242.
- Cioffi, M. B., & Bertollo, L. a C. (2012). Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in Fish. *Genome Dynamics*, *7*, 197–221. <http://doi.org/10.1159/000337950>
- Cioffi, M. B., Kejnovsky, E., & Bertollo, L. a C. (2011). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, *132*(4), 289–296. <http://doi.org/10.1159/000322058>
- Cioffi, M. de B., Kejnovský, E., Marquioni, V., Poltronieri, J., Molina, W., Diniz, D., & Bertollo, L. A. (2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular Cytogenetics*, *5*(1), 28. <http://doi.org/10.1186/1755-8166-5-28>
- Csink, A. K., & Henikoff, S. (1998). Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, *143*(1), 13–22. <http://doi.org/10.1083/jcb.143.1.13>
- Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A., & Antonini, Y. (2005). Biodiversidade em Minas Gerais. *Biodiversidade Em Minas Gerais*, *2 ed*, 72–81.
- Feldberg, E., Bertollo, L. A. C., Toledo, L. F. D. A., Foresti, F., Filho, O. M., & Santos, A. F. Dos. (1987). (Pisces, Prochilodontidae). *Genome*, *29*(1), 1–4. <http://doi.org/10.1139/g87-001>
- Ferreira, D. C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, *132*(1-2), 64–70. <http://doi.org/10.1159/000319620>
- Ferreira, I. a., & Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, *39*(4), 411–418. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2007.02.010>
- Galetti Jr., P. M. (1991). Chromosome complement of induced hybrids of the fish *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus* (Prochilodontidae, characiformes). *Revista Brasileira de Genética*, *14*, 203–207.
- Galetti, P. M., Bertollo, L. a C., & Moreira, O. (1994). Trends in Chromosome Evolution of Neotropical Characiform Fishes. *Caryologia*, *47*(3-4), 289–297. <http://doi.org/10.1080/00087114.1994.10797307>

- Galetti, P. M., & Martins, C. (2004). Capítulo 3 - Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. *FISH- Conceitos E Aplicações Na Citogenética*, 61–88.
- Godinho, H. P., & Godinho, A. L. (2003). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*.
- Gras, D. E., Brassesco, M. S., Markariani, R., & Roncati, H. a. (2007). (Pisces : Characiformes) from the middle Paraná River , Santa Fe City , Argentina, *1*(2), 113–119.
- Hatanaka, T., & Galetti Jr, P. M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, *1829*(122), 239–244.
- Howell, W. M., & Black, D. a. (1980). Department of Biology , Samford University , Birmingham (Alabama 35209 , USA), 14 January 1980 Effects of anesthesia , surgical manipulation and dehydration on the nucleic acid and protein content of the pituitary and hypothalamus of the frog ~ Institut. *Experientia*, (36), 1014–1015.
- Jager, H. I., Chandler, J. a., Lepla, K. B., & Van Winkle, W. (2001). A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology of Fishes*, *60*(4), 347–361. <http://doi.org/10.1023/A:1011036127663>
- Jesus, C. M. de, Galetti Jr., P. M., Valentini, S. R., & Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, *118*, 25–32.
- Jesus, C. M. de, & Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia*, *56*(3), 281–287. <http://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589336>
- Jorge, L. C., Sanchez, S., & Moreira Filho, O. (2011). Chromosomal Characterization of *Prochilodus lineatus* from Paraná River, Corrientes, Argentina. I. B Chromosomes and NOR Banding. *Cytologia*, *76*(2), 219–222.
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, a., Klonowski, P., Kohany, O., & Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*, *110*(1-4), 462–467. <http://doi.org/10.1159/000084979>
- Kidwell, M. G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, *115*(1), 49–63. <http://doi.org/10.1023/A:1016072014259>
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. . (1964). Nomenclature for centromeric position at chromosomes. *Hereditas*, 201–220. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>

- Li, Y.-C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, a, & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putativa functions, and mutational mechanism: a review. *Molecular Ecology*, *11*, 253–256.
- Liu, Z., Li, P., Kocabas, a, Karsi, a, & Ju, Z. (2001). Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *289*(2), 317–324. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5978>
- Loures, R. C., & Pompeu, P. S. (2012). Temporal variation in fish community in the tailrace at Tres Marias Hydroelectric Dam, Sao Francisco River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, *10*(4), 731–740. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252012000400006>
- Lowe-McConnell, R. H. (1987). Ecological Studies in Tropical Fish Communities. *Tropical Fish Ecology*, *3*(I), 27–28.
- Lucena, Carlos Alberto S. Calegari, B. B., Pereira, E. H. L., & Dallegrave, E. (2013). O uso de oleo de cravo na eutanasia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, *105*, 20–24.
- Maistro, E. L., 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. <http://doi.org/10.1023/A:1004063031965>
- Martins, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In *Fish Cytogenetics* (pp. 421–453). Retrieved from http://www2.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/home_depto/Cesar/documentos/Capitulos_Livros/4a-ChromRepetitivea.pdf
- Martins, C., Ferreira, I. A., Oliveira, C., Foresti, F., & Galetti, P. M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, *127*(1-3), 133–141. <http://doi.org/10.1007/s10709-005-2674-y>
- Martins, C., & Galetti, P. M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? *Genetica*, *111*, 439–446. <http://doi.org/10.1023/A:1013799516717>
- Martins, C., Oliveira, C., Wasko, A. P., & Wright, J. M. (2004). Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture*, *231*(1-4), 37–49. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.017>
- Melo, B. F., 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. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252013000300016>

- Molina, W. F., da Costa, G. W. W. F., de Bello Cioffi, M., & Bertollo, L. A. C. (2012). Chromosomal differentiation and speciation in sister-species of Grammatidae (Perciformes) from the Western Atlantic. *Helgoland Marine Research*, 66(3), 363–370. <http://doi.org/10.1007/s10152-011-0276-x>
- Mota-Velasco, J. C., Ferreira, I. A., Cioffi, M. B., Ocalewicz, K., Campos-Ramos, R., Shirak, A., ... Penman, D. J. (2010). Characterisation of the chromosome fusions in *Oreochromis karongae*. *Chromosome Research*, 18(5), 575–586. <http://doi.org/10.1007/s10577-010-9141-z>
- NERAAS, L. P., & SPRUELL, P. (2001). Blackwell Science, Ltd Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, 10, 1153–1164.
- Nunes, D. M. F., Magalhães, A. L. B., Weber, A. A., Gomes, R. Z., Normando, F. T., Santiago, K. B., ... Bazzoli, N. (2015). Influence of a large dam and importance of an undammed tributary on the reproductive ecology of the threatened fish matrinxã *Brycon orthotaenia* Günther, 1864 (Characiformes: Bryconidae) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, (ahead), 00–00. <http://doi.org/10.1590/1982-0224-20140084>
- Oliveira, C., Foresti, F., & Hilsdorf, a. W. S. (2009). Genetics of neotropical fish: From chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 81–100. <http://doi.org/10.1007/s10695-008-9250-1>
- Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, Á., & 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. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252003000100005>
- Oliveira, C., Saboya, S. M. R., Foresti, F., Senhorini, J. A., & Bernardino, G. (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, 79(5), 473–476. <http://doi.org/10.1038/sj.hdy.6882210>
- Pauls, E., & Bertollo, L. a C. (1983). Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36 (4), 307–314. <http://doi.org/10.1080/00087114.1983.10797671>
- Pauls, E., & Bertollo, L. a C. (1990). Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81, 117–123. <http://doi.org/10.1007/BF00226450>
- 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. <http://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i1.8587>
- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2934–2938. <http://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>

- Poltronieri, J., Marquioni, V., Bertollo, L. A., Kejnovsky, E., Molina, W. F., Liehr, T., & Cioffi, M. B. (2013). Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (characiformes, anostomidae): Unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, *142*(1), 40–45. <http://doi.org/10.1159/000355908>
- Sanches, A., Galetti Jr., P. M., Galzerani, F., Derazo, J., Cutilak Bianchi, B., & Hatanaka, T. (2012). Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the Sao Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *40*(1), 177–186. <http://doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-17>
- Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., Boschi, M. B., & Miranda, M. O. T. (2005). Influence of the Abaete River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, southeastern Brazil. *River Research and Applications*, *21*(8), 939–950. <http://doi.org/10.1002/rra.859>
- Sumner, a T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl Cell Res*, *75*(1971), 304–306.
- Sumner, A. T. (2003). *CHROMOSOMES: ORGANIZATION AND FUNCTION*.
- Supiwong, W., Liehr, T., & Cioffi, M. B. (2013). Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Cytogenetics*, 1–7. <http://doi.org/10.1186/1755-8166-6-51>
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., ... Tanomtong, A. (2014). Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): A comparative chromosome mapping study. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, *253*(4), 316–320. <http://doi.org/10.1016/j.jcz.2014.02.004>
- Terencio, M. L., Schneider, C. H., Gross, M. C., Nogaroto, V., de Almeida, M. C., Artoni, R. F., ... Feldberg, E. (2012). Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. *Genetica*, *140*(2012), 505–512. <http://doi.org/10.1007/s10709-013-9699-4>
- Terencio, M. L., Schneider, C. H., Gross, M. C., Vicari, M. R., & Feldberg, E. (2012). Stable karyotypes: A general rule for the fish of the family Prochilodontidae? *Hydrobiologia*, *686*, 147–156. <http://doi.org/10.1007/s10750-012-1006-3>
- Ugarkovic, D., & Plohl, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles - causes and effects. *The EMBO Journal*, *21*(22), 5955–5959.
- Vanzela, A. L. ., Swarça, A. C., Dias, A. L., Stolf, R., Ruas, P. M., Ruas, C. F., ... Giuliano-Caetano, L. (2002). Vanzela et al., 2002 talvez GA9+C.pdf. *Cytologia*, *67*, 9–13.
- Vicari, M. R., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. a C. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case

report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(1), 67–72. <http://doi.org/10.1159/000151318>

- Vicari, M. R., de Almeida, M. C., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., & Artoni, R. F. (2006). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29(1737), 621–625. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572006000400008>
- Vicari, M. R., Nogaroto, V., Noletto, R. B., Cestari, M. M., Cioffi, M. B., Almeida, M. C., ... Artoni, R. F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76, 1094–1116. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x>
- Voltolin, T. A., Penitente, M., Mendonça, B. B., Senhorini, J. A., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2013). Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 347–352. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572013000300008>
- Voltolin, T. A., Senhorini, J. A., Oliveira, C., Foresti, F., Borlolozzi, J., & Porto-foresti, F. (2009). Cytogenetic Markers in Wild Population of Curimbata(*prochilodus lineatus*) from Mogi-Guacu River. *Cytogenetics*, 74(3), 281–287.
- Weber, A. A., Ferreira Nunes, D. M., Zeferino Gomes, R., Rizzo, E., Biana Santiago, K., & Bazzoli, N. (2013). Downstream impacts of a dam and influence of a tributary on the reproductive success of *Leporinus reinhardti* in São Francisco River. *Aquatic Biology*, 19(2), 195–200. <http://doi.org/10.3354/ab00531>
- Yano, C. F., Poltronieri, J., Bertollo, L. A. C., Artoni, R. F., Liehr, T., & de Bello Cioffi, M. (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triplocheilichthys trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *PLoS ONE*, 9(3), e90946. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090946>



Figura 3: Cariótipos de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD5499) e a jusante (B, JD 5371) da UHE de Três Marias, utilizando coloração convencional Giemsa.

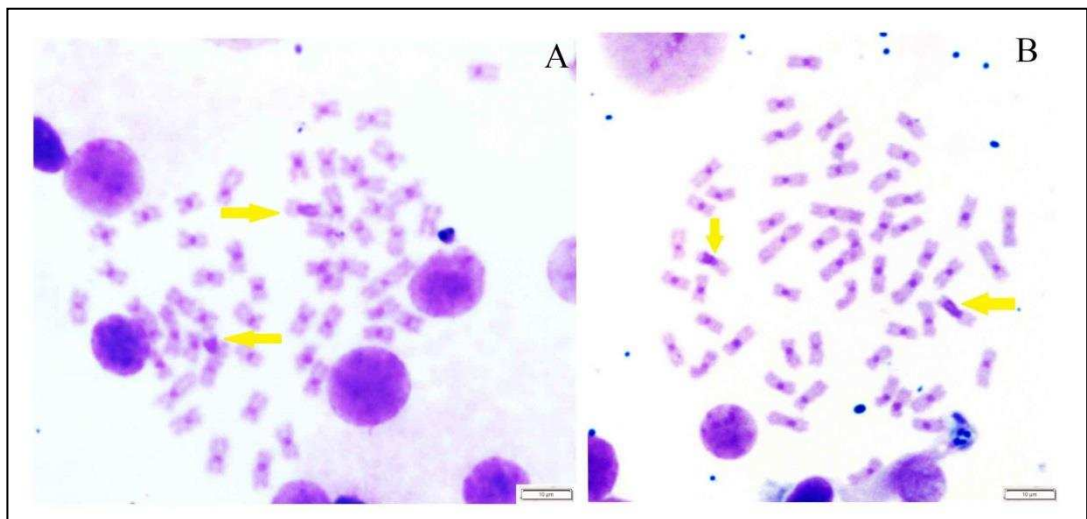


Figura 4: Metáfases de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD5488) e a jusante (B, JD 5365) da UHE de Três Marias, utilizando técnica de bandamento C, setas amarelas evidenciam o par heterocromático.

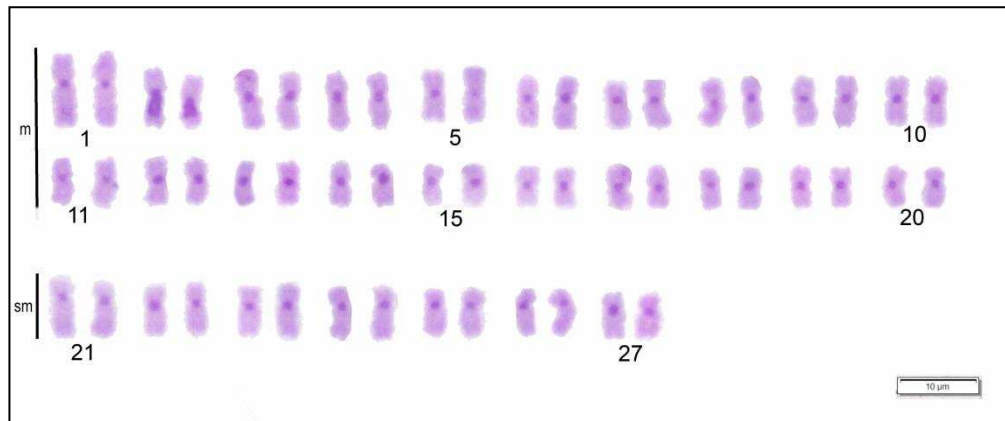


Figura 5: Cariótipo de *Prochilodus argenteus*, após técnica de bandamento C, evidenciando o segundo par metacêntrico.

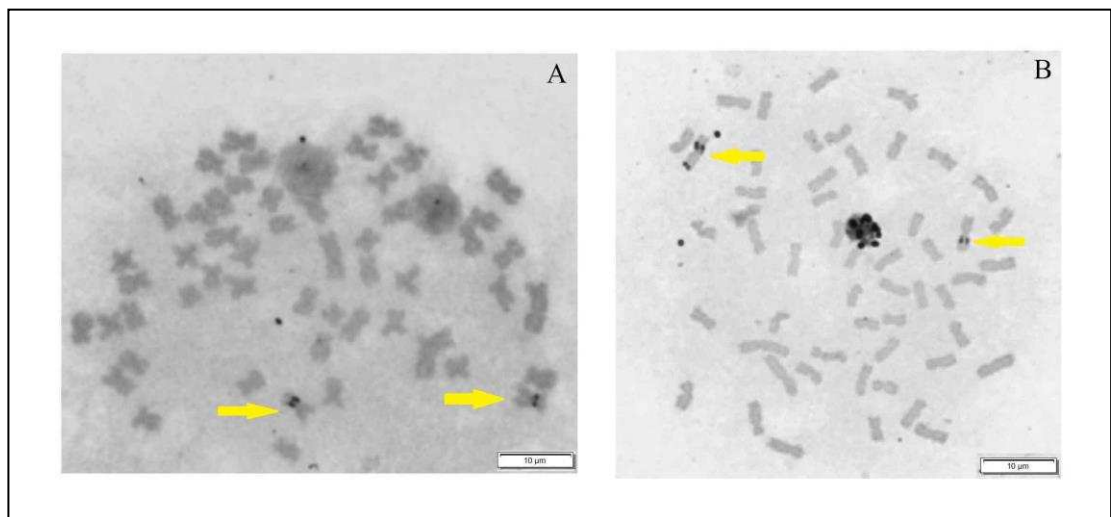


Figura 6: Diferentes padrões de NORs (setas amarelas) encontrados em ambas as populações de *Prochilodus argenteus*, em A, um par de marcações, padrão mais comum, em B uma terceira marcação telomérica.

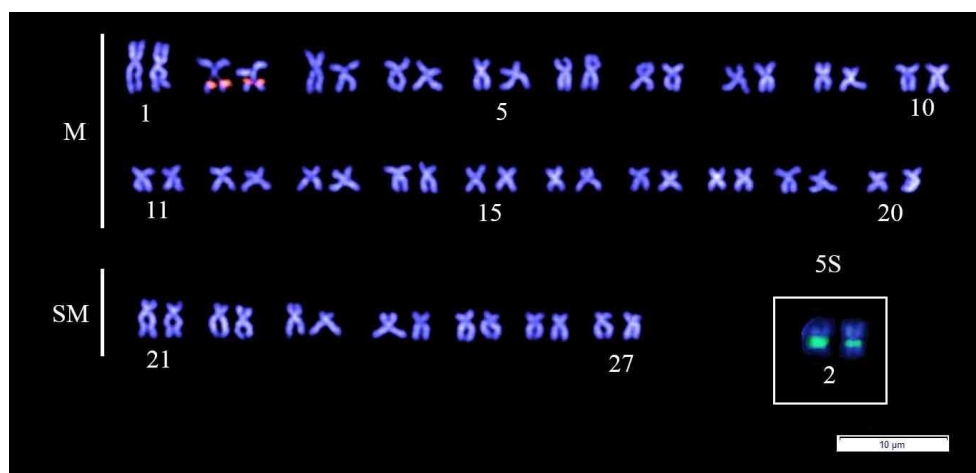


Figura 7: Cariótipo de *Prochilodus argenteus* (JD5519) após técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando as sondas 18S (vermelho) e 5S rDNA(verde).

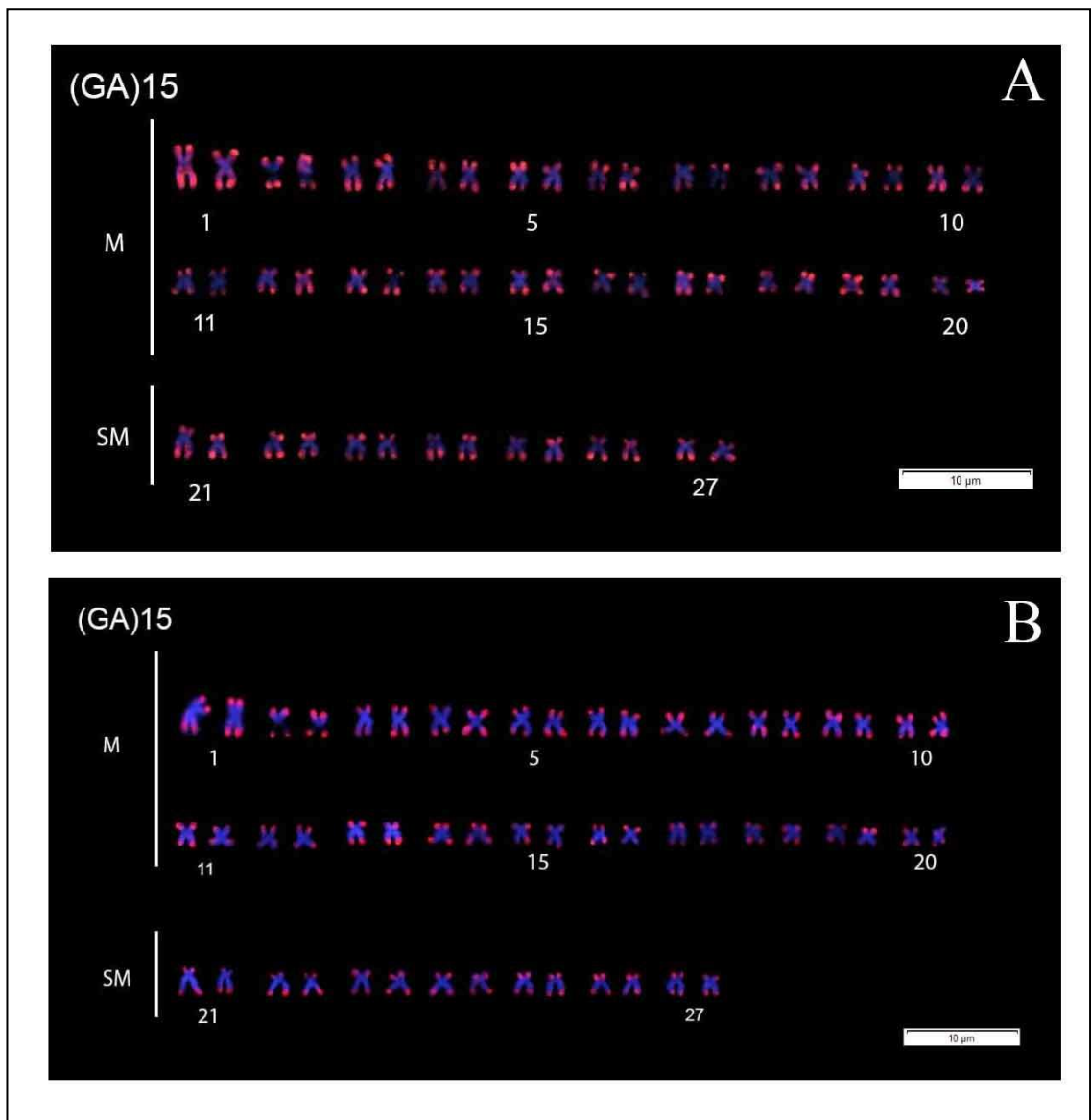


Figura 8: Cariótipos de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD5492) e a jusante (B, JD 5410) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando a sonda (GA)₁₅ (vermelho).

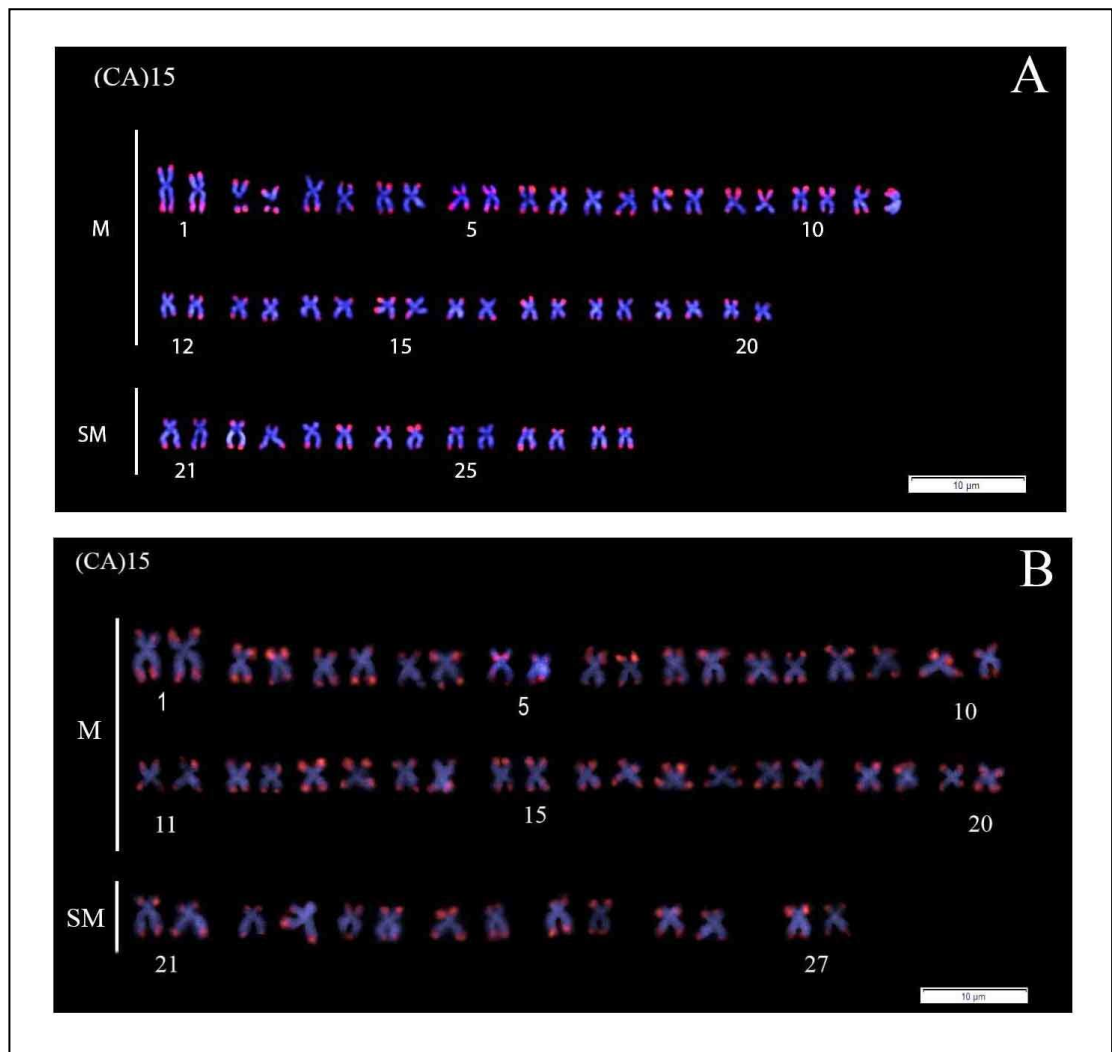


Figura 9: Cariótipos de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD5492) e a jusante (B, JD 5403) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CA)₁₅ (vermelho).

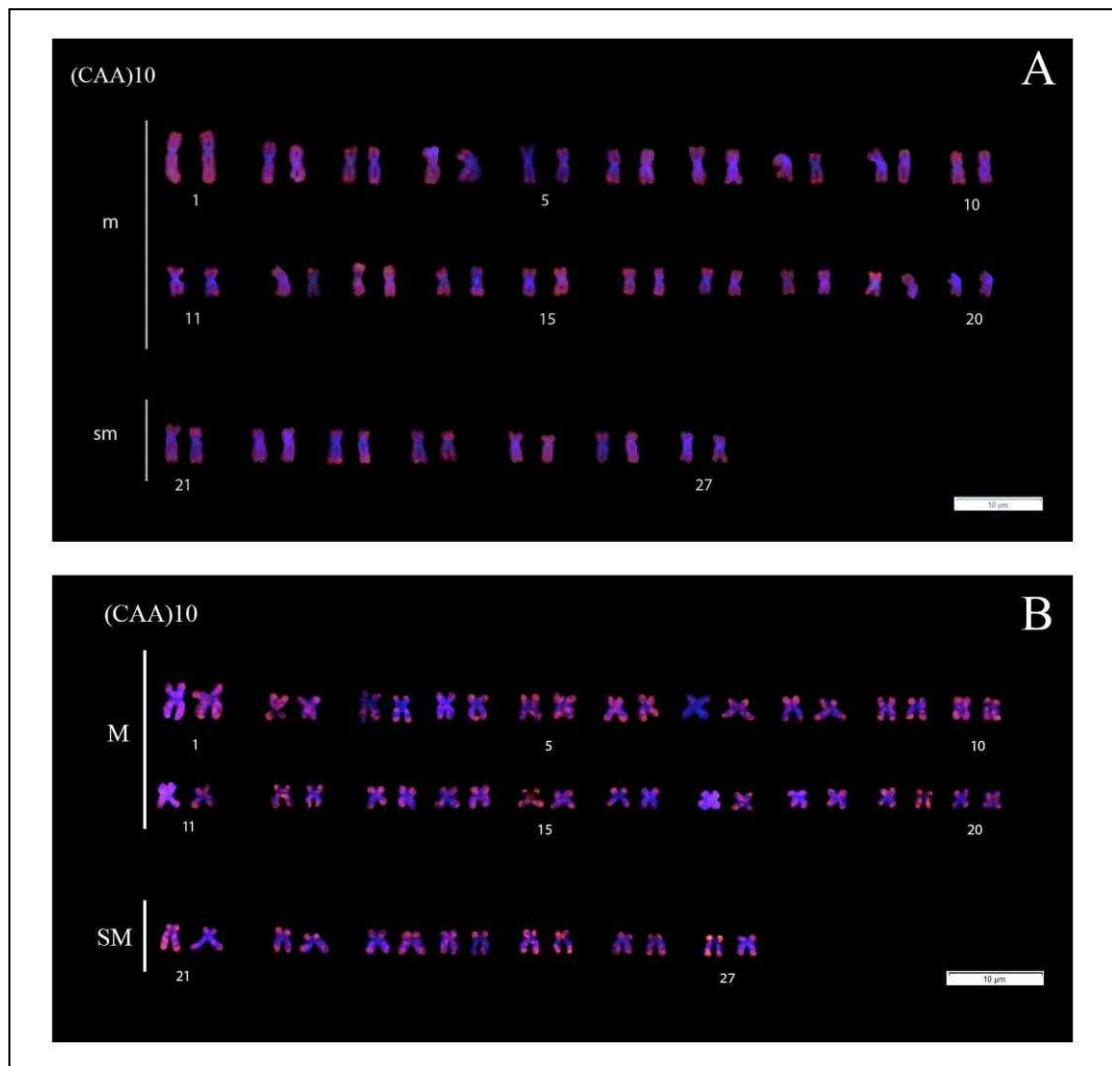


Figura 10 Cariótipos de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD5491) e a jusante (B, JD 5403) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CAA)₁₀ (vermelho).

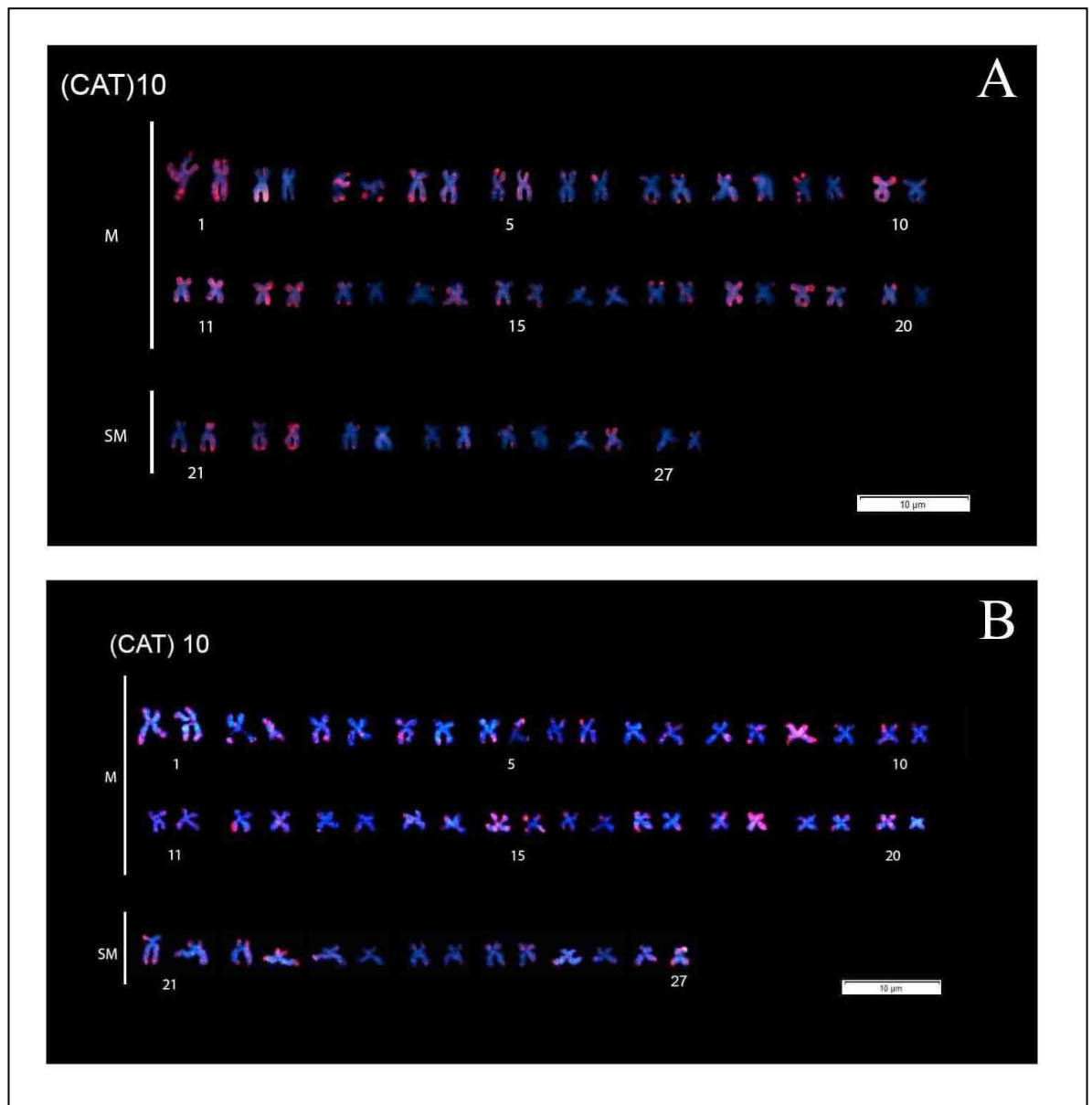


Figura 11: Cariótipos de *Prochilodus argenteus* a montante (A, JD 5499) e a jusante (B, JD 5365) da UHE de Três Marias, após técnica de Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) utilizando a sonda (CAT)₁₀ (vermelho).

ANEXOS

Anexo 1- Protocolos

Processamento dos animais segundo Bertollo *et al.* (1978):

1. Injetar no ventre do animal, entre as nadadeiras peitorais e as pélvicas, solução aquosa de colchicina 0,025% na proporção de 1 mL/100 g de peso corporal;
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado durante 20 minutos. Faltando 2 minutos para completar o tempo do colchicina, transferir os peixes para solução de óleo de cravo 4% a fim de anestesiá-los. Eutanasiar o animal e retirar o rim anterior. Bem como retirar fígado, coração e brânquias, fixá-los em 1,5 – 2,0 mL de etanol 100% em tubo eppendorf e armazená-los em freezer -20°C para análises moleculares;
3. Lavar o material em solução hipotônica de KCl 0,075 M, transferindo-o para pequenas cubas de vidro contendo 7 mL de solução hipotônica.
4. Fragmentar o material com auxílio de pinças pequenas de ponta reta. Completar a separação celular por meio de leves movimentos de aspiração e expiração do material com o auxílio de uma seringa hipodérmica até obter uma suspensão celular homogênea;
5. Incubar a solução obtida a 36-37° C durante 20 minutos;
6. Ressuspender o material com cuidado, com ajuda de uma pipeta Pasteur, transferir a suspensão obtida para um tubo falcon e acrescentar 7 gotas de fixador (metanol: ácido acético 3:1) recém preparado;
7. Ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
8. Adicionar vagarosamente 7 mL de fixador recém preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo;
9. Ressuspender o material com auxílio de pipeta Pasteur;
10. Repetir os passos 7 a 9 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1,5 mL de fixador e ressuspender bem o material e pingar na lâmina ou guardar no freezer em tubos Eppendorf;
11. Para pingar o material, utilizar lâmina bem limpa, mantida em água destilada ou álcool 70% na geladeira. Aquecê-la em água destilada até a temperatura de 60º e pingar o material;
12. Corar com corante Giemsa 5% por 5 minutos.

Análises citogenéticas:

Coloração convencional Giemsa

- Pingar de 2 a 3 gotas da suspensão, armazenada em freezer -20°C , com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina úmida e recém aquecida em água destilada a 60°C e deixar secar ao ar.
- Corar com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (9,5 mL de tampão fosfato + 0,5 mL de solução-mãe de Giemsa), durante 5 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar.

Banda C

Protocolo modificado de Sumner (1972):

- Preparo da solução de hidróxido de bário 5%: pesar 5 gramas de hidróxido de bário P.A. ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em 100 mL de água destilada. Deixar homogeneizar por uma hora. Em seguida, filtrar a solução em papel de filtro e colocar em jarra de coplin em banho maria 42°C ;
- Descorar as lâminas com fixador 3 metanol:1 ácido acético, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
- Preparo do ácido clorídrico 0,2%: Misturar ácido clorídrico comercial com água destilada na proporção de 1 HCl: 4 H_2O ; colocar em jarra de coplin em banho maria 42°C ;
- Preparo da solução salina 2xSSC pH 7,0: Dissolver 8,765g de NaCl e 4,41g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 500 mL de água destilada; colocar em jarra de coplin em banho maria 60°C ;
- Procedimento:
 1. Deixar por 5 minutos na solução de HCl;
 2. Lavar em água destilada e deixar secar ao ar;
 3. Deixar por 30 segundos na solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$;

4. Lavar rapidamente na solução de HCl e, em seguida, em água destilada, deixar secar ao ar;
5. Deixar por uma hora na solução salina 2xSSC;
6. Lavar em água destilada e deixar secar ao ar;
7. Corar a lâmina com Giemsa 5% por três minutos.

Banda NOR

Protocolo modificado de Howell e Black (1980):

- Preparo da solução reveladora a base de gelatina: dissolver 1g de gelatina branca sem sabor em 50 mL de água destilada morna e adicionar 0,5 ml de ácido fórmico;
- Preparo da solução de nitrato de prata P.A. (AgNO₃) 50%: pesar 0,5g de nitrato de prata e dissolver em 1mL de água destilada (observação: o eppendorf deve ser protegido da luz com papel alumínio para evitar oxidação da prata);

Procedimento:

- Descorar as lâminas com fixador 3 metanol: 1 ácido acético, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
- Adicionar 4 gotas de nitrato de prata, 2 gotas de solução reveladora a base de gelatina e 2 gotas de água destilada, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida em estufa 60°C;
- Observar a coloração da lâmina até que a mesma adquira cor marrom-dourada, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

Protocolo de FISH para sondas específicas 18S e 5S rDNA segundo Pinkel *et al.*, 1986

PCR para sonda 18S:

	Reação PCR 1x (microlitros)
H ₂ O	13,4
Tampão 10x	2,0
MgCl ₂ 25 mM	1,2
dNTP	0,2
Primer 18SF	1,0
Primer 18SR	1,0
Taq polimerase	0,2

DNA	1,0
Total	20,0

Programa no termociclador:

	18 S
94° C	3 min
94° C	1 min
55° C	1 min
72° C	2 min
35 times to 2	
72° C	5 min
4° C	24 h

PCR para sonda 5S:

	Reação PCR 1x (microlitros)
H ₂ O	13,4
Tampão 10x	2,0
MgCl ₂ 25 mM	1,2
dNTP	0,2
Primer A	1,0
Primer B	1,0
Taq polimerase	0,2
DNA	1,0
Total	20,0

Programa no termociclador:

	5 S
94° C	2 min
94° C	1 min
52° C	1 min
72° C	1 min 30 seg
35 times to 2	
72° C	5 min
4° C	24 h

Marcação da Sonda:

Método de Nick translation utilizando o kit Dig-Nick Mix e kit Nick-Biotina Mix (Roche). Mix para 8 lâminas:

Tubo 18S: 3,5microlitros do PCR18S + 4microlitros Biotina + 12,5microlitros água

Tubo 5S: 3,5microlitros do PCR5S + 4microlitros Digoxigenina + 12,5microlitros água

Centrifugar brevemente e incubar por 90 min a 16°C no termociclador. Parar a reação com a adição de 1 microlitro de EDTA 0,5M e colocar no termociclador por 10 min a 65°C. Armazenar em geladeira até seu uso (ou em freezer -20°C).

1° Dia

1. Preparar as lâminas (podem ser corridas previamente e descoradas)
2. Limpar lamínulas com álcool comercial
3. Adicionar 100 microlitros de RNase na lâmina, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida 37°C por 1 hora
4. Preparar o MIX por lâmina: 2 microlitros 18S + 2 microlitros 5S + 16 microlitros HybMix (pode ser colocado no freezer até a desnaturação no PCR)
5. Retirar as lamínulas e lavar em 2xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
6. Ligar placa aquecedora 72°C
7. Secar as lâminas ao ar
8. Adicionar 50 microlitros de pepsina 0,005%, cobrir com lamínula por 10 min temperatura ambiente
9. 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
10. Formaldeído 10% por 10 min temperatura ambiente (preparar na hora: 100 mL 1xPBS + 1 mL formaldeído)
11. 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
12. Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 min cada
13. Secar ao ar
14. Adicionar 100 microlitros de formamida 70%, cobrir com lamínula e colocar na placa aquecedora 72°C por 2min30seg
15. Desidratar em série alcoólica: 50% GELADO, 70% e 100% por 2 min cada
16. Secar ao ar
17. Desnaturalizar o MIX em termociclador (programa FISHSC: 10 min 85°C e 2 min 4°C)
18. Adicionar 20 microlitros do MIX por lâmina, cobrir com lamínula e deixar overnight em câmara úmida 37°C.

2° Dia

1. 2xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
2. 1xSSC por 5 min temperatura ambiente (Shaker)
3. Incubar 10 min em 3% NFDM 4xSSC (preparar na hora: 80 mL água destilada + 20 mL 20xSSC + 3 gr leite em pó MOLICO)

4. Lavar em 2xSSC rapidamente
5. Aplicar 100 microlitros de solução de detecção em cada lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 1h em câmara úmida 37°C (preparar na hora: 976 microlitros de NFDm + 9 microlitros de streptavidin-cy3 + 15 microlitros de antidigoxigeninarodamina)
6. 3x 5min em 4xSSCTween temperatura ambiente (Shaker) (Trocar a solução a cada 5 min)
7. Lavar rapidamente em 1xPBS
8. Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 min cada
9. Secar ao ar
10. Adicionar 2 gotas de solução DAPI e cobrir com lamínulas
11. Conservar na geladeira (e no escuro) até tirar as fotos.