

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DO DNAr 18S E 5S EM
PIRANHAS (SERRASALMINAE, CHARACIDAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL**

CELESTE MUTUKO NAKAYAMA

SÃO CARLOS-SP

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DO DNAr 18S E 5S EM
PIRANHAS (SERRASALMINAE, CHARACIDAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL**

CELESTE MUTUKO NAKAYAMA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N163cm

Nakayama, Celeste Mutuko.

Citogenética molecular comparativa do DNAr 18S e 5S em piranhas (Serrasalminae, Characidae) Amazônia Central / Celeste Mutuko Nakayama. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 80 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Peixe. 2. Bacia Amazônica. 3. Genes ribossomais. 4. Evolução cromossômica. 5. Citotaxonomia 6. Hidratação. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“CITOGENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA DO DNAr
18S E 5S EM PIRANHAS (SERRASALMINAE,
CHARACIDAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL”.**

Tese de Doutorado de Celeste Mutuko Nakayama

Banca Examinadora


Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo


.....

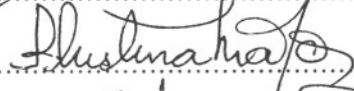
Profa. Dra. Terumi Hatanaka


.....

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho


.....

Profa. Dra. Isabel Cristina Martins dos Santos


.....

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias


.....

SÃO CARLOS - SP
2007

Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo
Orientador

**Dedico este trabalho à Takako
Nakayama, minha mãe.**

A realização desta tese só foi possível pela colaboração:

- do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA), Laboratório de Genética de Peixes, onde 50% das atividades foram desenvolvidas, incluindo toda a captura dos peixes, utilizando a infra-estrutura do Laboratório de Genética de Peixes, da Secretaria da CPBA e os recursos financeiros dos projetos de Pesquisas Institucionais: PPIs: 2-3450 e 13090 e do CNPq: PNOFG/FINEP/PRONEX;

- da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução, Laboratório de Citogenética de Peixes, onde as técnicas citogenéticas moleculares foram desenvolvidas;

- do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Doutorado, viabilizando a execução desse trabalho;

- do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo apoio e oportunidade durante a realização deste trabalho;

- da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela aprovação de auxílio financeiro ao projeto do Programa Integrado de Pesquisa Científica e Tecnológica/PIPT;

- do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pela permissão para a coleta dos peixes e transporte do material genético.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meu muito obrigado a todos que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e de modo muito especial:

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), meu orientador, um profissional digno e ético. Obrigada pela dedicação, eficiência e paciência que teve durante certas fases deste trabalho, mas principalmente pela compreensão.

À Dr^a. Eliana Feldberg, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/CPBA), pela confiança, amizade e incentivo, estando sempre presente, orientando sem medir esforços e me ensinando o caminho da ciência.

À minha mãe Takako Nakayama, pelo exemplo de vida, confiança, incentivo e pelo esforço dedicado na minha formação pessoal, estudantil e profissional.

Aos membros da banca examinadora Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, Dr. Orlando Moreira Filho, Dr^a. Isabel Cristina Martins dos Santos, Dr^a. Ana Lúcia Dias, Dr^a. Terumi Hatanaka pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira – Filho, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio e sugestões no laboratório, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio e compreensão enquanto estive na Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Genética e Evolução.

Ao Prof. Dr. Reinaldo, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio e compreensão como Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Genética e Evolução.

Aos professores do programa de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela dedicação e por todos os seus ensinamentos.

A Gerência Executiva do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) do Amazonas, Dr. Henrique dos Santos Pereira, por ter permitido a coleta de peixes na reserva ecológica do arquipélago de Anavilhanas.

Ao Coordenador do Núcleo de Unidade de Conservação NUC/IBAMA/AM, Leslie Nelson J. Tavares, pela ajuda nos trâmites dos documentos para adquirir a autorização para captura e transporte do material genético.

Ao MSc. Fernando Pinto Gouveia, da Unidade de Conservação do Uatumã, pelo apoio logístico na unidade.

Ao Dr. Jansen Zuanon, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela identificação dos espécimes analisados, pelo incentivo e amizade.

Ao Eldon Feitosa, que sempre esteve presente nos momentos de alegria e tristeza, obrigada pelo apoio e incentivo nas horas mais difíceis.

Ao Dr. Lauro Y. Nakayama, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/GTI), pela ajuda na parte de processamento de dados, no acabamento deste trabalho.

As secretárias Rosemeire, Regiane, Tatiane e Greissi pela colaboração durante esta fase.

À Valcicléia Sarquis Celestino, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/PDIRH), pela ajuda e compreensão nos trâmites das documentações.

Aos secretários do departamento, Cláudio e Tatiane, pela colaboração durante este período.

Aos colegas do laboratório de Citogenética, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), MSc. Aldaléia, Elmira, Breno, Débora, Nifa, Alexandre e Arlindo, pela ajuda sem medir esforços, pelos bons momentos descontraídos e pela amizade.

À MSc. Aldaléia, que sempre esteve presente em todas as etapas deste trabalho, pela colaboração na área computacional e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Citogenética, da Universidade Federal de São Carlos, Liano, Débora, Marcelo e Carol, que muito contribuíram na realização deste trabalho, me ensinaram os primeiros passos da técnica de (FISH). Aos demais colegas Rosângela, Victor, Marc, Daniel Blanco, Marcelo Bello, Wellington, Daniel Kantec, Gustavo, Ernani, Elisângela, Maressa, pela ajuda e pelos bons momentos de descontração no laboratório.

À Débora e Rosangêla, que sempre estiveram presentes compartilhando os bons momentos e pela amizade.

Ao Dr. Jorge Porto, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/CPBA), pela amizade, críticas e sugestões.

Ao técnico Arlindo Batista do Nascimento, pela ajuda nas coletas no campo, nas tarefas do laboratório, pela companhia agradável e descontraída e principalmente pela amizade.

Ao Setor de Apoio do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/CPBA), aos técnicos administrativos Octacy, Arquimimo e José Pereira (Zezinho), pelo apoio na organização das excursões e aos pescadores: Agenor, Carlos Sotero, Francisco, Luiz, Mário, Valter e aos marítimos Smith e Torquato, que além do apoio, proporcionaram momentos agradáveis de descontração durante as excursões.

Resumo

Foram realizados estudos de citogenética básica e molecular em 11 espécies de peixes da subfamília Serrasalminae - *Colossoma macropomum*, *Serrasalmus altispinnis*, *S. elongatus*, *S. gouldingi*, *S. rhombeus*, *S. cf. rhombeus*, *S. serrulatus*, *S. maculatus*, *Pygocentrus nattereri*, *Pristobrycon striolatus* e *Catoprion mento*, coletados em diferentes locais da Amazônia Central. O número diplóide encontrado foi $2n=54$ cromossomos para *Colossoma macropomum*, $2n=62$ para *C. mento* e *P. striolatus*, $2n=60$ para todas as espécies do gênero *Serrasalmus* e *P. nattereri*, exceto *S. cf. rhombeus* que apresentou $2n=58$. Além de diferentes números diplóides, as fórmulas cariotípicas também se mostraram diversificadas, mesmo entre as espécies com o mesmo número de cromossomos, evidenciando alguns principais rearranjos cromossômicos presentes no processo evolutivo desse grupo como fusões/fissões e inversões pericêntricas. Heteromorfismo cromossômico sexual não foi encontrado em nenhuma das espécies analisadas. As regiões organizadoras de nucléolos, evidenciadas pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs), foram sempre teloméricas e múltiplas, variando entre 4 a 12 conforme a espécie. Na maioria das espécies essas regiões foram visualizadas no braço curto de cromossomos subtelo-acrocêntricos. Entretanto, em *Colossoma macropomum* elas foram evidenciadas no braço longo de cromossomos metacêntricos e em *Catoprion mento* no braço curto de cromossomos submetacêntricos e no braço longo de cromossomos subteloacêntricos e acrocêntricos. Os sítios de DNAr 18S foram, na maioria dos casos, coincidentes com os sítios de Ag-RONs, embora tenham ocorrido em maior número ou mesmo em cromossomos/posições distintas daqueles detectados pela Prata. Tais discrepâncias podem ser atribuídas às especificidades de cada uma dessas metodologias empregadas, como também à dificuldade de detecção de alguns sítios de RONS, os

quais são geralmente muito pequenos nos Serrasalminae. A heterocromatina banda-C positiva foi evidenciada na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, sendo algumas regiões mais conspícuas do que outras além de algumas bandas teloméricas características em alguns pares de cromossomos. Todas as espécies de *Serrasalmus* apresentaram um bloco heterocromático proximal no braço longo de um par metacêntrico de tamanho médio, o qual parece ser um marcador desse gênero quanto à posição que ocupa no cariótipo (7^o par), visto que em outras espécies onde ele ocorre, como em *P. nattereri*, esse par é de tamanho maior (3^o par). As seqüências de DNAr 5S foram sempre mapeadas em um único par de cromossomos. Nas espécies de *Serrasalmus* esse par corresponde ao metacêntrico número 7 e em *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento* ao metacêntrico número 3. Por sua vez, em *C. macropomum* os sítios de DNAr 5S se localizaram no braço curto de um metacêntrico menor, provavelmente o de número 12 no cariótipo. Considerando a generalidade dos dados ora obtidos as espécies analisadas dos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* e *Catoprion*, apesar das diferenciações específicas que apresentam, mostram maior proximidade entre si apresentando cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelo-cêntricos e acrocêntricos, localização preferencial dos sítios de DNAr 18S na região telomérica do braço curto dos cromossomos subtelo-acrocêntricos, além de número e localização similar dos sítios de DNAr 5S nos cariótipos. Por sua vez, *C. macropomum* mostra características bem divergentes, com 2n=54 cromossomos meta-submetacêntricos, com sítios de DNAr 18S localizados na região terminal do braço longo e sítios de DNAr 5S intersticiais no braço curto dos cromossomos. Assim sendo, a separação de *C. macropomum* do clado das piranhas, tanto na proposta filogenética de Ortí *et al.* (1996) ou de Machado-Allison (1983), é corroborada pelos nossos dados citogenéticos. Considerando uma posição mais basal para *C. macropomum* na filogenia dos Serrasalminae, rearranjos cromossômicos como

fissões cêntricas, ao lado de inversões pericêntricas, parecem se destacar na diferenciação do cariótipo desse grupo, aumentando o número basal de $2n=54$ meta-submetacêntricos para $2n=58$, 60 e 62 e possibilitando o surgimento de cromossomos com formas distintas daqueles presentes em *C. macropomum*. Igualmente também os sítios de RONS passaram por modificações numéricas e de localização nos cromossomos ao longo da diferenciação cariotípica dos Serrasalminae. Quanto aos sítios de DNAr 5S, sua localização em posição e em cromossomos morfologicamente similares em todas as espécies analisadas de *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* e *Catoprion* sugere que, uma vez estabelecida esta localização a partir de uma condição ancestral distinta, como aquela presente em *C. macropomum*, ela se manteve conservada.

Abstract

Basic and molecular cytogenetic studies have been performed in 11 species of the subfamily Serrasalminae: *Colossoma macropomum*, *Serrasalmus* (*S. altispinnis*, *S. elongatus*, *S. gouldingi*, *S. rhombeus*, *S. cf. rhombeus*, *S. serrulatus* and *S. maculatus*), *Pygocentrus nattereri*, *Pristobrycon striolatus* and *Catopryon mento*, collected along different sites in Central Amazon basin. The diploid number found was $2n=54$ chromosomes in *Colossoma macropomum*, $2n=62$ in *C. mento* and *P. striolatus*, $2n=60$ for all species in the genus *Serrasalmus* and *P. nattereri*, except for *S. cf. rhombeus*, which presented $2n=58$. Besides distinct diploid numbers, variable karyotypical formulae were also detected, even between species with the same chromosomal number, showing the occurrence of chromosomal rearrangements in the evolutionary process of this group, such as fusions and centric fissions and pericentric inversions. No sex chromosome heteromorphism was found in the analyzed species. The silver stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) were always telomeric and multiple, ranging from 4 to 12 marks according to each species. In most species, they were observed on short arms of subtelo-acrocentric chromosomes. However, in *Colossoma macropomum* the Ag-NORs were located at terminal position on long arms and, in *Catopryon mento*, they were present on short arms of submetacentric chromosomes and on long arms of subtelocentric and acrocentric chromosomes. The 18S rDNA sites were usually coincident with Ag-NORs, although they might occur in a higher number or in distinct chromosomes positions in relation to Ag-NORs. These discrepancies may be attributed to either methodological specificities or to difficulties in detecting some NOR sites, since they are commonly very small within Serrasalminae. The C-banded heterochromatin was observed at pericentromeric region of most chromosomes, being some regions more conspicuous than others, besides some telomeric bands in some

chromosomal pairs. All *Serrasalmus* species presented a proximal heterochromatic block on the long arm of a medium-sized metacentric pair, which seems to be a marker for this genus regarding to its karyotype position (7th pair), once it may be present in other species, such as *P. nattereri*, but in a larger chromosome (3rd pair). The 5S rDNA sequences were always mapped in a single chromosomal pair. In *Serrasalmus* species, this pair corresponds to the metacentric pair 7 and in *P. nattereri*, *P. striolatus* and *C. mento*, it corresponds to the medium-sized metacentric pair 3. On its turn, the 5S rDNA sites in *C. macropomum* were located on short arms of a small metacentric, probably corresponding to the 12th pair. Considering the wide array of the present data, the species of the genera *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* and *Catoprion*, in spite of their specific differentiations, showed higher karyotypic similarity with the presence of metacentric, submetacentric, subtelocentric and acrocentric chromosomes, a preferential location of 18S rDNA sites at telomeric region on short arms of subtelocentric chromosomes, besides the number and location of 5S rDNA sites in karyotypes. On the other hand, *C. macropomum* shows quite divergent features, with 2n=54 meta-submetacentric chromosomes, with 18S rDNA sites at terminal region on long arms and interstitial 5S rDNA sites on short arms of chromosomes. Therefore, the location of *C. macropomum* far from the “piranha” clades, according to available phylogeny hypotheses for Serrasalminae, is corroborated by our cytogenetic data. Considering that *C. macropomum* would be a basal representative in the phylogeny of Serrasalminae, chromosomal rearrangements such as centric fissions, besides pericentric inversions, seem to play an important role in the karyotypic differentiation of this group, increasing the basal number of 2n=54 meta-submetacentric to 2n=58, 60 and 62, and giving rise to distinct chromosome forms in relation to those present in *C. macropomum*. Analogously, the NOR sites have also undergone numerical and positional changes in chromosomes along the karyotypical differentiation of

Serrasalminae. As for the 5S rDNA sites, its location in a same position in morphologically similar chromosomes in all analyzed species of the genera *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* and *Catoprion* suggests that, once established this location from a distinctive ancestor condition, as that seen in *C. macropomum*, it has been remained conserved.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Os Peixes Serrasalminae	01
1.2. Marcadores Citogenéticos e Moleculares	03
2. OBJETIVOS	07
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1. Material	09
3.2. Métodos	13
3.2.1. Indução de Mitoses	13
3.2.2. Obtenção de Cromossomos Mitóticos	13
3.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs)	14
3.2.4. Detecção da Heterocromatina Banda C-Positiva	15
3.2.5. Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) com Sondas de DNAr 18S e 5S ..	15
3.2.5.1. Preparação das Sondas	16
3.2.5.2. Marcação das Sondas	16
3.2.5.3. Preparação das Lâminas	17
3.2.5.4. Hibridização e Detecção dos Sinais	17
3.2.6. Análises Cariotípicas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
Capítulo 1. Mapeamento de genes ribossomais e marcadores cromossômicos em três espécies de piranha do gênero <i>Serrasalmus</i> (Characidae, Serrasalminae) da bacia Amazônica	21
Resumo	22
Introdução	24
Material e Métodos	25
Resultados	27

Discussão	28
Tabelas	34
Figuras	36
Capítulo 2. Regiões organizadoras de nucléolos, DNAr 18S e 5S em espécies de Serrasalminae (Characiformes, Serrasalmidae) da Amazônia Central. Contribuições à citotaxonomia do grupo.	41
Resumo	42
Introdução	44
Material e Métodos	46
Resultados	47
Discussão	49
Figuras	56
Tabelas	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Lista de Figuras da Introdução

Figura 1. Locais de coleta das espécies estudadas (Barcelos, Jaú, Anavilhanas, Catalão, Uatumã).	11
Figura 2. Espécies estudadas no presente trabalho: A) <i>Serrasalmus altispinnis</i> (14,0 cm); B) <i>Serrasalmus elongatus</i> (19,5 cm) C) <i>Serrasalmus gouldingi</i> (13,5 cm); D) <i>Serrasalmus rhombeus</i> (17,5 cm); E) <i>Serrasalmus</i> cf. <i>rhombeus</i> (12,5 cm); F) <i>Serrasalmus serrulatus</i> (15,5 cm); G) <i>Serrasalmus maculatus</i> (15,5 cm); H) <i>Pygocentrus nattereri</i> (15 cm); I) <i>Pristobrycon striolatus</i> (14 cm); J) <i>Catoprion mento</i> (11.5 cm); L) <i>Colossoma macropomum</i> (19,0 cm).	12
Tabela 1 - Espécies analisadas de Serrasalminae da Amazônia Central. ♂ = número de machos, ♀ = número de fêmeas, I = número de exemplares com sexo não determinado.	10

Lista de Tabelas do Capítulo I

Tabela 1 - Espécies do gênero <i>Serrasalmus</i> analisadas, locais de coleta na região Amazônica (Brasil) e número de espécimes estudados.	34
Tabela 2 - Características cariotípicas das espécies estudadas.	35

Lista de Figuras do Capítulo I

Figura 1 – Mapa do local de coleta e imagem das espécies do gênero <i>Serrasalmus</i> analisadas na presente estudo: a) <i>S. altispinnis</i> (□, indivíduo com 16,0cm); b) <i>S. gouldingi</i> (◆ indivíduo com 14,0cm) e <i>S. serrulatus</i> (● indivíduo com 15,5cm).....	36
Figura 2 – Cariótipos de <i>Serrasalmus altispinnis</i> , <i>S. gouldingi</i> e <i>S. serrulatus</i> com coloração Giemsa convencional (a, c, e) e bandamento C (b, d, f), respectivamente.	37
Figura 3 - Cromossomos metafásicos de <i>Serrasalmus altispinnis</i> (a, b), <i>S. gouldingi</i> (c, d) e <i>S. serrulatus</i> (e, f), evidenciando os sítios de rDNA 18S (a, c, e) e de rDNA 5S (b, d, f).	38

Figura 4 - Cromossomos de <i>Serrasalmus altispinnis</i> (a, b), <i>S. gouldingi</i> (c, d) e <i>S. serrulatus</i> (e, f) evidenciando sítios de Ag-NORs (a, c, e) e de rDNA 18S (b, d, f).	39
Figura 5 - Par cromossômico nº 7 de <i>Serrasalmus altispinnis</i> (a, b), <i>S. gouldingi</i> (c, d) e <i>S. serrulatus</i> (e, f) evidenciando a co-localização da região de heterocromatina C-positiva (a, c, e) e do sítio de rDNA 5S (b, d, f).	40

Lista de Tabelas do Capítulo II

Tabela 1 - Espécies analisadas de Serrasalminae da Amazônia Central	10
Tabela 2 - Características cariotípicas das espécies de Serrasalminae estudadas.....	61

Lista de Figuras do Capítulo II

Figura 1. Locais de coletas das espécies estudadas	11
Figura 2. Espécies estudadas no presente trabalho: A) <i>Serrasalmus altispinnis</i> (14,0 cm); B) <i>Serrasalmus elongatus</i> (19,5 cm) C) <i>Serrasalmus gouldingi</i> (13,5 cm); D) <i>Serrasalmus rhombeus</i> (17,5 cm); E) <i>Serrasalmus cf. rhombeus</i> (12,5 cm); F) <i>Serrasalmus serrulatus</i> (15,5 cm); G) <i>Serrasalmus spilopleura</i> (15,5 cm); H) <i>Pygocentrus nattereri</i> (15 cm); I) <i>Pristobrycon striolatus</i> (14 cm); J) <i>Catoprion mento</i> (11.5 cm); L) <i>Colossoma macropomum</i> (19,0 cm).	12
Figura 3 – Cariótipos de <i>Colossoma macropomum</i> e <i>Pygocentrus nattereri</i> com coloração Giemsa convencional (a, c) e bandamento C (b, d), respectivamente.	56
Figura 4 – Cariótipos de <i>Pristobrycon striolatus</i> e <i>Catoprion mento</i> com coloração Giemsa convencional (a, c) e bandamento C (b, d), respectivamente.....	57
Figura 5 – Cromossomos evidenciando em (A) as Ag-RONs e em (B) os sítios de rDNA 18S. 1) <i>Serrasalmus altispinnis</i> ; 2) <i>S. elongatus</i> ; 3) <i>S. gouldingi</i> ; 4) <i>S. maculatus</i> ; 5) <i>S. cf. rhombeus</i> (2n=58); 6) <i>S. rhombeus</i> (2n=60); 7) <i>S. serrulatus</i>	58
Figura 6 – Cromossomos evidenciando em (A) as Ag-RONs e em (B) os sítios de rDNA 18S. 1) <i>Colossoma macropomum</i> ; 2) <i>Pygocentrus nattereri</i> ; 3) <i>Pristobrycon striolatus</i> ; 4) <i>Catoprion mento</i>	59

Figura 7 – A – Cromossomos evidenciando os sítios de heterocromatina C-positiva (A) e de DNAr 5S (B). 1) *Serrasalmus altispinnis*; 2) *S. elongatus*; 3) *S. gouldingi*; 4) *S. maculatus*; 5) *S. rhombeus* (2n=58); 6) *S. rhombeus* (2n=60); 7) *S. serrulatus*; 8) *Colossoma macropomum*; 9) *Pygocentrus nattereri*; 10) *Pristobrycon striolatus*; 11) *Catoprion mento*. Os números abaixo dos pares cromossômicos indicam sua posição no cariótipo das respectivas espécies. Notar a co-localização da heterocromatina e do DNAr 5S nas espécies de *Serrasalmus* e em *P. nattereri*. 60

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Os Peixes Serrasalminae

Os serrasalmíneos são peixes de água doce, amplamente distribuídos na América do Sul, sendo abundantes nas bacias Amazônica, do Paraná-Paraguai e do Orenoco. Habitam uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios e zonas de remanso (Goulding, 1980). Sua alimentação varia de acordo com o seu desenvolvimento ontogenético, incluindo desde zooplâncton, insetos, frutos, até tecido carnoso de peixes e outros animais (Machado-Allison & Fink, 1996).

A taxonomia e sistemática desse grupo ainda apresentam vários aspectos controversos, ocorrendo discordância entre os autores quanto à sua posição sistemática. Gosline (1951) e Nelson (1961) consideram esse grupo como uma subfamília da família Characidae, onde o gênero *Colossoma* seria o mais basal. Por outro lado, Géry (1972) afirma que o seu "status" taxonômico é de família e divide-a em três subfamílias: 1) Serrasalminae, que são as piranhas e pirambebas, com apenas um gênero (*Serrasalmus*) e vários subgêneros (*Pygocentrus*, *Pristobrycon*, *Pygopristis* e *Taddyela*), 2) Subfamília Myleinae, que são os pacus, com os gêneros (*Myleus*, *Mylesinus*, *Colossoma*, *Metynnis*, *Acnodon*, *Mylossoma*, *Utiaritichthys*) e 3) Catoprioninae, representada por apenas um gênero e uma espécie, *Catoprion mento*.

Machado-Allison (1983, 1985) revisou todos os gêneros do grupo e, baseado em caracteres derivados (apomórficos), sugeriu o "status" de uma subfamília monofilética, Serrasalminae, dentro da família Characidae. Entretanto, propôs a existência de duas linhagens independentes: 1) os pacus e 2) as piranhas mais o pacu

Metynnis. Assim, esta subfamília seria constituída por 13 gêneros: *Colossoma*, *Piaractus*, *Mylossoma*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Utiaritichthys*, *Acnodon*, *Metynnis*, *Catoprion*, *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*. Orti *et al.* (1996), com base em dados de rDNA mitocondrial, propôs uma filogenia sem as duas linhagens independentes para os Serrasalminae, onde *Colossoma* ocupa a posição mais basal e as piranhas representam o grupo mais derivado.

Por sua vez, Freeman *et al.* (2007), consideraram as piranhas e pacus como uma família, Serrasalmidae, mas concordando que tanto a identificação como a posição filogenética de muitas espécies ainda é problemática. De fato, várias espécies consideradas como sendo uma única entidade biológica podem representar um complexo de espécies, enquanto que várias outras podem ser englobadas em apenas uma única espécie (Goulding *et al.*, 1988; Nakayama *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2007).

As piranhas são peixes altamente especializados, caracterizados por possuir corpo comprimido, geralmente alto e em forma de disco, apresentando dentes dispostos em série única, resistentes e com bordas altamente cortantes, de hábito predatório. Algumas espécies possuem no ventre, uma quilha serrilhada formada por espinhos e um padrão de coloração variável. A presença de um espinho pré-dorsal nesse grupo de peixes é marcante, o qual está ausente em *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus* e por causa deste caráter, estes três gêneros são considerados os mais primitivos (Géry, 1972; Britski, 1972; Machado-Allison & Fink, 1995).

Na região amazônica, a diversidade de pacus e piranhas é muito grande e nos últimos anos esse grupo vem sendo estudado sob diferentes aspectos, ou seja, morfológicos (Jégu *et al.*, 1991; Jégu, 1992a; b; Jégu *et al.*, 1992; Jégu, 2003), genéticos (Almeida-Val *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2006), parasitológicos (Mizelle & Price, 1965; Boeger & Kritsky, 1988; Kritsky *et al.*, 1979, Thatcher, 1991), reprodutivos

(Leão *et al.*, 1991), citogenéticos (García-Parra, 2000; Nakayama *et al.*, 2000; 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a; Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Nirchio *et al.*, 2003; Gaviria *et al.*, 2005) e moleculares (Ortí *et al.*, 1996; Porto, 1999; Hubert *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2007).

Em relação à citogenética, esse grupo apresenta um número diplóide variando de $2n=54$ a $2n=64$ cromossomos, sendo que os gêneros mais basais apresentam apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, enquanto que os demais gêneros mostram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Os gêneros *Colossoma*, *Piaractus*, *Mylossoma* e *Metynnis* apresentam quatro cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos detectadas pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs), enquanto que nos demais gêneros esse número pode chegar até 12 (Porto *et al.*, 1989; 1991).

Serrasalmus spilopleura, uma das espécies mais estudadas, mostrou uma grande variabilidade cariotípica tanto na bacia do Paraná-Paraguai (Cestari & Galetti Jr., 1992a) como na região da Amazônia Central (Nakayama *et al.*, 2000; Centofante *et al.*, 2002a). Já, para *S. rhombeus* existem evidências de espécies crípticas, sugerindo tratar-se de um complexo de espécies (Nakayama *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006).

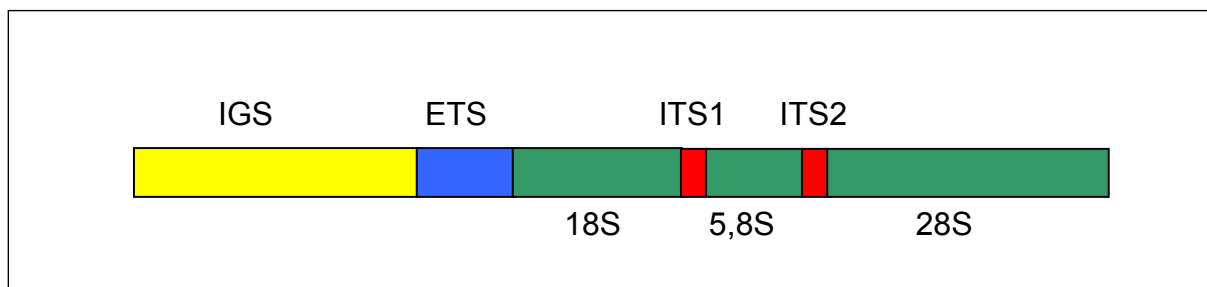
1.2. Marcadores Citogenéticos e Moleculares

A região organizadora de nucléolo (RON) é o local, em nível cromossômico, onde o nucléolo é organizado e permanece temporariamente associado. Em termos funcionais, esta região está relacionada com a síntese do precursor dos RNA ribossômicos (RNA_r) 28S, 18S e 5,8S, que constituirão grande parte do nucléolo

(Macgregor, 1993).

Nos eucariotos superiores, os genes dos RNA ribossômicos encontram-se organizados em duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e pelo DNAr 5S, compostas por unidades repetidas “em tandem”, com milhares de cópias.

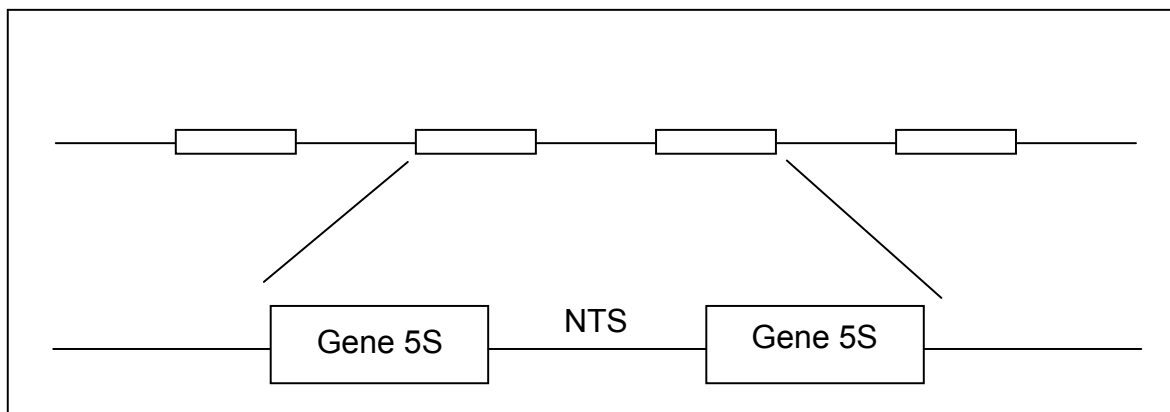
O DNAr 45S consiste de unidades transcricionais que codificam os RNAs ribossômicos 18S, 5,8S e 28S, separadas por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores externos transcritos (ETS), além de espaçador intergênico (IGS) (Markova *et al.*, 1997; Rivera-León & Gerbi, 1997). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs), conforme visualizado na figura abaixo.



Esquema representativo das unidades de repetição do DNAr 45S.

O DNA ribossômico 5S, ao contrário do DNAr 45S, não está diretamente relacionado às RONs, encontrando-se em sítios distintos (Long & David, 1980). Este apresenta repetições que consistem de uma seqüência codificante de 120 pares de bases e de um espaçador não-transcrito (NTS) que é comumente variável em sua seqüência nucleotídica, devido inserções/deleções, mini-repetições e pseudogenes (Long & David, 1980, para revisão). Embora a seqüência nucleotídica do DNAr 5S seja altamente conservada, mesmo entre espécies não relacionadas, as variações nos

NTSs são geralmente espécie-específica (Suzuki *et al.*, 1994; Pendás *et al.*, 1995) e têm sido utilizadas com sucesso em estudos evolutivos.



Esquema representativo das unidades de repetição do DNA 5S (modificado Martins & Wasko, 2004).

Os estudos de RONS têm sido de grande utilidade na caracterização cariotípica dos peixes, assim como em outros grupos zoológicos, considerando que as mesmas correspondem, em muitos casos, a marcadores cromossômicos quanto ao número, localização no cromossomo e posição no cariótipo. Esta variabilidade pode ser usada na diagnose de espécies, populações ou até mesmo indivíduos da mesma linhagem (Galetti Jr. *et al.*, 1984; Phillips & Ihssen, 1985; Amemiya & Gold, 1986, 1988; Feldberg *et al.*, 1992).

Nos Characiformes, muitas espécies apresentam, preferencialmente, apenas um par de cromossomos homólogos portador de RONS. Esta característica aparece como mais representativa em alguns grupos como, por exemplo, Curimatidae (Venere & Galetti Jr., 1989; Feldberg *et al.*, 1992), Anostomidae (Galetti Jr., *et al.*, 1981; 1984), Prochilodontidae (Pauls & Bertollo, 1983; Pauls, 1985; Feldberg *et al.*, 1987), Parodontidae (Moreira Filho *et al.*, 1985), Hemiodontidae (Porto *et al.*, 1993).

Entretanto, casos com mais de um par de cromossomos com sítios organizadores de nucléolo, caracterizando um sistema de RONS múltiplas, também têm sido detectados com freqüência. As piranhas e pacus, por exemplo, estão entre os grupos que apresentam RONS múltiplas (Galetti Jr. *et al.*, 1985; Porto *et al.*, 1992; Cestari & Galetti Jr., 1992a; b; Cestari, 1996; Garcia-Parra, 2000; Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a).

O advento da citogenética molecular proporcionou a obtenção de marcadores cromossômicos mais precisos, possibilitando um estudo mais detalhado sobre a organização do cariótipo e sua diferenciação ao longo do processo evolutivo. Assim, por exemplo, a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) permitiu a localização de seqüências específicas de DNA nos cromossomos metafásicos ou mesmo em núcleos interfásicos, viabilizando a análise de rearranjos cromossômicos, o entendimento da origem dos cromossomos sexuais ou mesmo de alguns cromossomos específicos, como os supranumerários (Almeida-Toledo, 1998; Galetti Jr. & Martins, 2004).

Em peixes neotropicais, a técnica de FISH vem sendo utilizada com freqüência para o mapeamento físico do DNAr 18S e DNAr 5S nos cromossomos, trazendo importantes informações para a caracterização da diversidade e evolução da nossa ictiofauna (Martins & Galetti, 1999; 2000; 2001a; b; Born & Bertollo, 2000; Martins *et al.*, 2000; Wasko *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2006; Carvalho & Dias, 2007; entre outros).

Em vários organismos, os sítios de DNAr 5S estão localizados em um único par cromossômico. Entretanto, em anfíbios (Vitelli *et al.*, 1982; Schmid *et al.*, 1987; Lucchini *et al.*, 1993), assim como em algumas espécies de peixes (Móran *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Murakami & Fujitani, 1998; Martins & Galetti, 1999; 2000), esses sítios podem estar localizados em vários cromossomos. Além disso, em peixes, os locos de DNAr 45S e 5S podem assumir uma organização sintênica (Pendás *et al.*, 1993; Moran

et al., 1996; Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Mantovani *et al.*, 2005), ou podem estar localizados em distintos pares cromossômicos (Martínez *et al.*, 1996; Sajdak *et al.*, 1998; Martins & Galetti, 1999; Born & Bertollo, 2000), o que parece ser a característica mais comumente observada entre os vertebrados (Lucchini *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996; Martins & Galetti Jr., 2001a).

Embora as Ag-RONs, pela sua facilidade, seja a metodologia mais utilizada no estudo das regiões organizadoras de nucléolos entre os peixes, esta técnica não é a mais apropriada para uma caracterização precisa dos sítios de RONS presentes no cariótipo, principalmente nos casos onde a espécie é portadora de um sistema de RONS múltiplas. Isto se deve ao fato das Ag-RONs indicarem apenas os sítios que apresentaram atividade transcricional na interfase precedente (Miller *et al.*, 1976), não evidenciando portanto os demais sítios inativos presentes no cariótipo. Nesse sentido, a análise das Ag-RONs seria então mais apropriada para o reconhecimento da atividade gênica propriamente dita, do que para a detecção e caracterização dos sítios organizadores de nucléolo da espécie.

2. OBJETIVOS

Nos Serrasalminae, as regiões organizadoras de nucléolos têm sido analisadas apenas com o emprego do nitrato de Prata (Ag-RONs), onde foi caracterizado um sistema de RONS múltiplas em todas as espécies já estudadas, com uma variação numérica entre 4 a 12, conforme a espécie. Considerando as limitações da metodologia de Ag-RONs, acima consideradas, além das dificuldades técnicas associadas à detecção de alguns sítios de RONS, muito pequenos em vários cromossomos desses peixes, julgamos importante complementar os dados de Ag-RONs com a metodologia de FISH. Ao mesmo tempo, procuramos estender os

estudos dos genes ribossomais aos sítios de DNAr 5S, visto a ausência de dados disponíveis quanto aos mesmos no grupo. Assim sendo, procuramos encontrar subsídios mais concretos para uma análise da diferenciação cariotípica entre diferentes espécies de serrasalmíneos, bem como possíveis marcadores cromossômicos de interesse para a caracterização das espécies.

Para tanto, foram analisados os cromossomos de diversas espécies de Serrasalmiinae da Amazônia Central, procurando:

- 1- caracterizar o cariótipo de algumas espécies ainda não estudadas;
- 2- detectar o número e a localização dos sítios de RONS, utilizando as metodologias de impregnação cromossômica com o Nitrato de Prata (Ag-RONS) e de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 18S;
- 3- detectar o número e a localização dos sítios de DNAr 5S, empregando a metodologia de FISH com sondas de DNAr 5S;
- 4- comparar os resultados de Ag-RONS com aqueles obtidos pelo método de FISH;
- 5- detectar marcadores cromossômicos, tanto em relação aos genes ribossomais como à heterocromatina banda C-positiva;
- 6- inferir sobre a diferenciação cromossômica desse grupo e o comportamento dos sítios de DNAr 18S e DNAr 5S.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A tabela 1 apresenta a relação das espécies analisadas, os locais de coleta o número e o sexo dos espécimes utilizados no presente trabalho. Os exemplares foram capturados por meio de malhadeiras de um a dois metros de altura, com malhas de diferentes tamanhos (30 -120 mm entre nós) e caniços sob autorização do IBAMA (Processo N° 06/2004).

Na figura 1 encontra-se o mapa dos locais de coleta. A figura 2 apresenta as respectivas espécies analisadas.

Alguns animais foram sacrificados no campo, em laboratórios improvisados em barcos ou nos flutuantes do INPA e do IBAMA, enquanto outros foram trazidos vivos para o laboratório de Genética de Peixes, Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), colocados em aquários bem aerados, aclimatando-os por aproximadamente 3 a 5 dias antes de serem sacrificados.

Os espécimes foram devidamente numerados e registrados, fixados em formol a 10% por uma semana e posteriormente colocados em álcool etílico a 70%, tendo sido classificados pelo pesquisador Dr. Jansen Zuanon (INPA) e mantidos na coleção do Laboratório de Genética de Peixes da CPBA. Exemplares testemunhos serão depositados na Coleção Zoológica do INPA.

Tabela 1 - Espécies analisadas de Serrasalminae da Amazônia Central

Espécies	Locais	♂	♀	I	Total
<i>Colossoma macropomum</i>	Piscicultura	9	4	-	13
<i>Serrasalmus altispinnis</i>	Anavilhanas	8	4	-	12
	Barcelos	8	3	-	11
<i>Serrasalmus elongatus</i>	Catalão/Marchantaria	7	7	-	14
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	Barcelos	6	10	-	16
	Jaú	-	1	-	01
	Anavilhanas	1	-	-	01
<i>Serrasalmus maculatus</i>	Catalão/Marchantaria	10	5	-	15
<i>Serrasalmus cf. rhombeus</i>	Catalão/Marchantaria	11	10	-	21
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Catalão/Marchantaria	8	2	-	10
	Anavilhanas	9	10	-	19
	Uatumã	2	1	-	3
<i>Serrasalmus serrulatus</i>	Anavilhanas	3	4	-	07
	Barcelos	5	7	-	12
	Catalão/Marchantaria	4	3	-	7
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Catalão/Marchantaria	9	10	1	20
<i>Pristobrycon striolatus</i>	Anavilhanas	6	5	1	12
<i>Catoprion mento</i>	Uatumã	7	13	-	20
Total		113	99	2	214

♂ = número de machos, ♀ = número de fêmeas, I = número de exemplares com sexo não determinado.

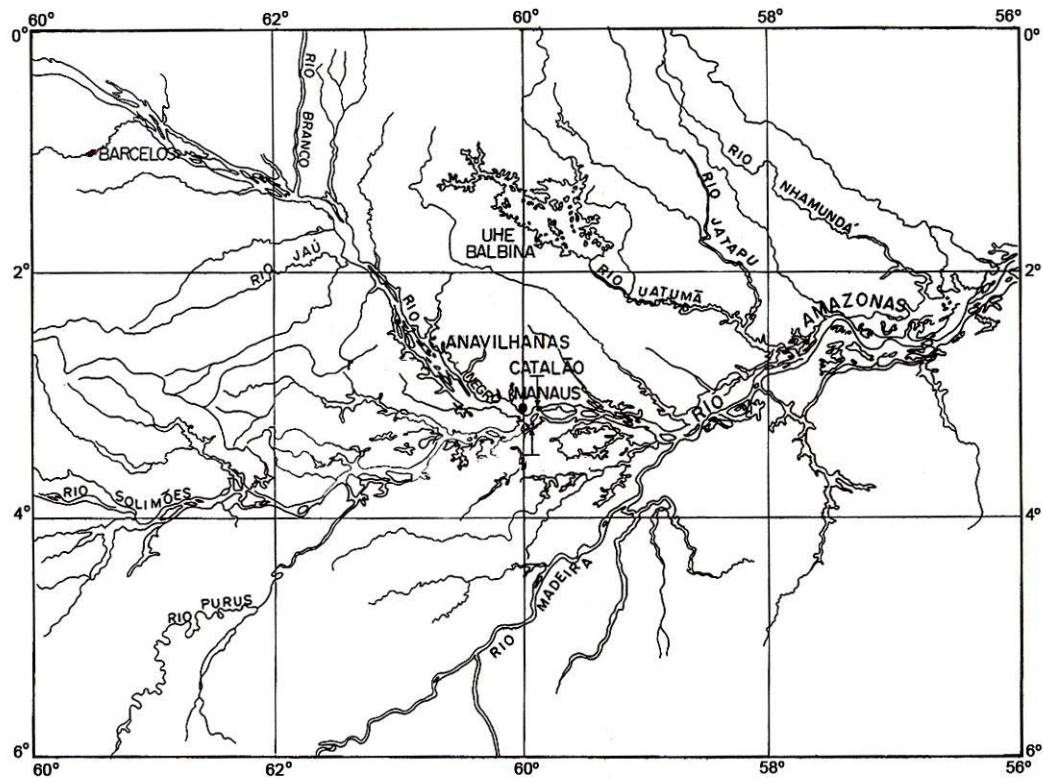


Figura 1. Locais de coleta das espécies estudadas (Barcelos, Jauá, Anavilhanas, Catalão, Uatumã).

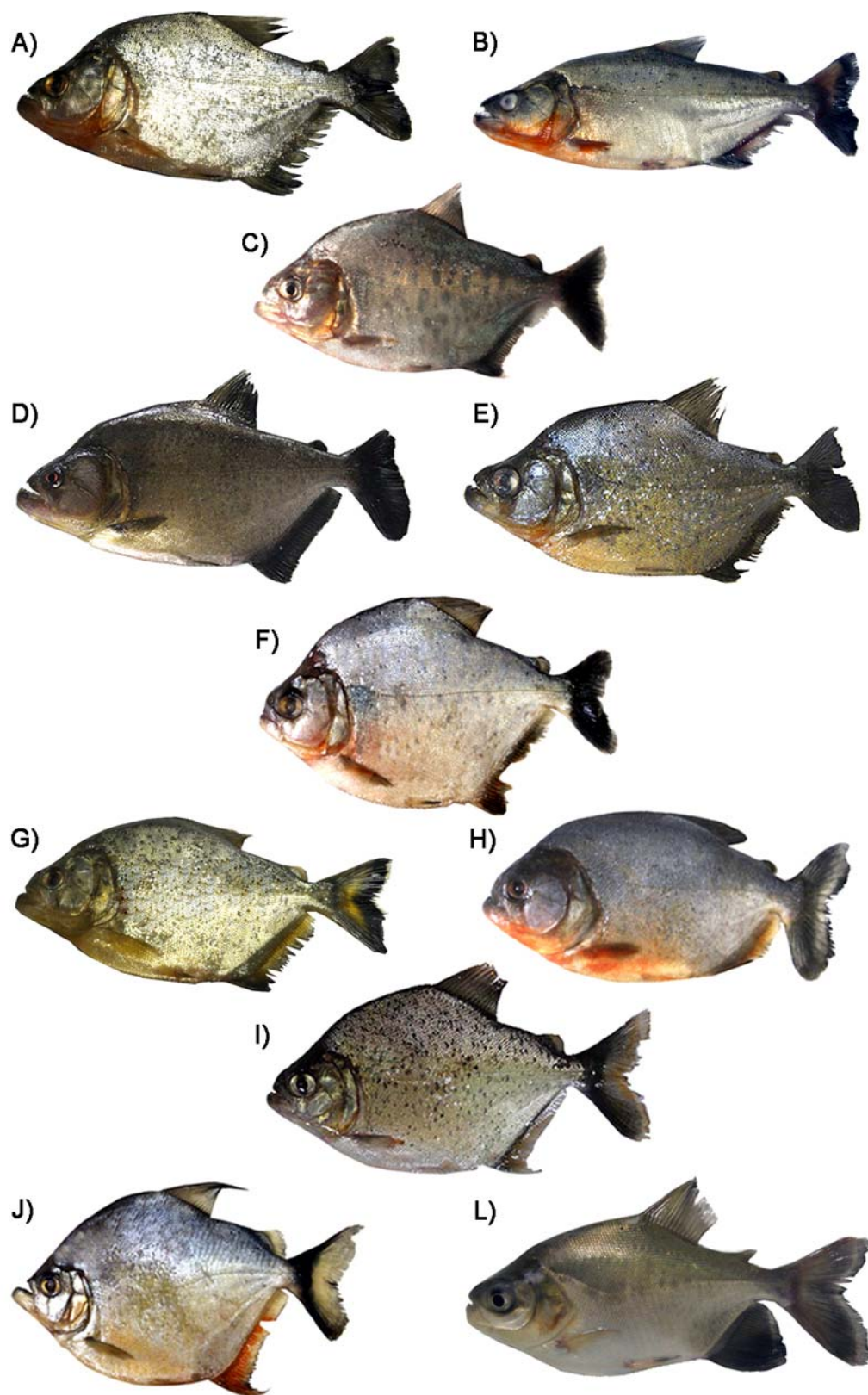


Figura 2. Espécies estudadas no presente trabalho: A) *Serrasalmus altispinnis* (14,0 cm); B) *Serrasalmus elongatus* (19,5 cm) C) *Serrasalmus gouldingi* (13,5 cm); D) *Serrasalmus rhombeus* (17,5 cm); E) *Serrasalmus cf. rhombeus* (12,5 cm); F) *Serrasalmus serrulatus* (15,5 cm); G) *Serrasalmus maculatus* (15,5 cm); H) *Pygocentrus nattereri* (15 cm); I) *Pristobrycon striolatus* (14 cm); J) *Catoprion mento* (11.5 cm); L) *Colossoma macropomum* (19,0 cm).

3.2. Métodos

3.2.1. Indução de mitoses

As preparações cromossômicas de piranhas nem sempre apresentam um índice mitótico satisfatório, o que torna necessário a ativação da proliferação de células *in vivo*. Para tanto foi utilizada a técnica de indução de mitoses por fermento biológico conforme descrito por Oliveira *et al.* (1988). Essa técnica consistiu em preparar uma suspensão de fermento biológico, na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7mL de água. Esta solução foi incubada em estufa a 40° C, durante de 20 minutos, até a solução iniciar a fermentação. Em seguida, foi injetado dorso-lateralmente no peixe, de 1mL dessa suspensão por 100g de peso do animal. Os peixes foram mantidos em tanque, viveiro ou aquário bem aerados, por 24 ou 48 horas antes de serem sacrificados.

3.2.2. Obtenção dos Cromossomos Mitóticos

Para obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica de "air drying", descrita por Bertollo *et al.* (1978). Após a estimulação mitótica, foi injetada no animal uma solução aquosa de colchicina a 0,0125%, na proporção de 1 mL/100 g de peso do animal. Passados 45-60 minutos, o peixe foi anestesiado em água gelada e sacrificado, retirando-se o rim, que é um órgão hematopoiético. O tecido foi lavado rapidamente em solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M e transferido para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl 0,075 M), onde foi fragmentado com auxílio de pinças de dissecação e seringa hipodérmica desprovida de agulha, até se obter uma suspensão celular

homogênea. Esta suspensão celular foi colocada em estufa a 37° C por vinte e cinco minutos. Em seguida o material foi ressuspendido, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo de centrifuga, adicionando-se 3 a 4 gotas de fixador Carnoy, recém preparado (metanol/ácido acético 3:1) e centrifugando por 10 minutos, a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e 10 mL de fixador foi acrescentado, ressuspendendo o material, cuidadosamente, com pipeta Pasteur. Os dois últimos passos foram repetidos por três vezes, sendo que após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, 2ml de fixador foram adicionados e a suspensão celular foi então acondicionada em frascos tipo "Ependorff" e guardado em freezer. Para análise dos cromossomos a suspensão celular foi gotejada sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e seca, colocada sobre um banho-maria a 60° C, e corada com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato, pH 6,8, 0,06M, por 15 minutos.

Parte das análises cromossômicas, principalmente quanto à metodologia de FISH, foi realizada no Laboratório de Citogenética, Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. O transporte do material cromossômico foi autorizado pelo IBAMA (autorização N° 06/2004)

3.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs)

A caracterização das RONs pelo AgNO₃ foi feita conforme a técnica descrita por Howell & Black (1980), que consistiu em colocar a lâmina, já preparada segundo a técnica para cromossomos mitóticos, em ácido clorídrico 1N (HCl) por 3 a 4 minutos à temperatura ambiente, lavando com água destilada e secando ao ar. Em seguida colocou-se sobre a lâmina uma gota de solução de gelatina (2g de gelatina comercial

dissolvida em 100ml de água destilada + 1ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata a 50%, cobrindo a mistura com lamínula. A lâmina foi acondicionada em uma câmara úmida e transferida para a superfície de um banho-maria a 60°C, por 4-5 minutos. Quando a lâmina adquiriu uma coloração marron dourada foi lavada com água destilada, com a retirada da lamínula.

3.2.4. Detecção da Heterocromatina Constitutiva Banda C-Positiva

Para a análise da heterocromatina constitutiva (banda C positiva) foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), que consistiu em tratar os cromossomos mitóticos com HCl 0,2N, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A lâmina foi lavada rapidamente em água destilada e incubada em solução de Hidróxido de Bário 5% a 42°C, recém preparada e filtrada, por um período de 1-2 minutos. A ação do Hidróxido de Bário foi interrompida, imergindo rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2 N a 42°C e lavando com água destilada. Em seguida a lâmina foi incubada em solução 2XSSC (Cloreto de Sódio 0,3M e Citrato Trisódico 0,03M, pH 6,8) a 60°C, por 15 minutos. Novamente a lâmina foi lavada em água destilada, secada ao ar e corada com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8 a 0,06M, por 30 minutos ou corar com iodeto de propídio (25µL de antifading para 0,1µL de iodeto na concentração de 50µg /mL).

3.2.5. Hibridização “*In Situ*” Fluorescente (FISH) com Sondas de DNAr 18S e 5S

A localização do DNA ribossômico 18S e 5S foi realizada pela técnica de hibridização “*in situ*” fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986).

3.2.5.1. Preparação das Sondas

Foram empregados dois tipos de sondas para a localização dessas seqüências nos cromossomos: (1) uma sonda de DNAr 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004); (2) uma sonda de DNAr 5S obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999).

Para a amplificação das sondas foram utilizados 100 ng de DNA molde + 10 ng do “primer”, juntamente com KCl 50mM + Tris pH 8,3 10mM + MgCl₂ 1,5mM + dNTPs (200 mM cada) + 2,5 U de Taq polimerase e 50 µl água MilliQ q.s.p.

3.2.5.2. Marcação das Sondas

Para a marcação das sondas foi utilizada a reação de “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, marcação indireta empregando-se a adenina biotilada (14 dATP–biotin - Invitrogen), com posterior detecção pela avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada 490/520 nm - Sigma). A solução de hibridação consistiu de 200 µl de Formamida (50% de Formamida); 80 µL Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µL de 20xSSC (concentração final 2xSSC); 80 µl de H₂O q.s.p., perfazendo um volume total de 400 µL aos quais foram adicionados 1,5 µg de sonda (DNA marcado com biotina). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para denaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

3.2.5.3. Preparação das Lâminas

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma bateria de etanol: 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida, foram tratadas com pepsina 0,005% de HCl a 10mM, por 10 minutos a 37°C e lavadas em PBS à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, ocorreu a fixação com formaldeído 1%+PBS 1x+MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente; lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com 90 µl de formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

3.2.5.4. Hibridização e Detecção dos Sinais

Após a secagem foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” (12 a 16 horas) a 37°C, em câmara úmida contendo solução de formamida 60% em 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 50% em 2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20 por 5 minutos, incubadas em 90 µL de tampão NFDM (Nom Fat Dry Milk) a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda

marcada com biotina, foram colocados sobre as lâminas 90 µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/µl, permanecendo por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. O sinal de hibridação foi intensificado, colocando-se cerca de 90 µl de anti-avidina biotina-conjugada sobre as lâminas, por 30 minutos, seguindo-se três lavagens com solução de Tween 20, cinco minutos cada. Este ciclo foi repetido por mais uma vez e complementado novamente pelo tratamento com avidina-FITC e posterior lavagem com Tween 20. Em seguida, fez-se a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então corados com iodeto de propídio + antifade (100 µg/ml), ou opcionalmente com DAPI + antifade (0,2 µg/ml).

3.2.6. Análises Cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro, estabelecendo-se o número diplóide modal de cada espécie, com análise mínima de 30 metáfases por espécime. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus Bx40, usando-se filme Imagelink (Kodak), regulado para ISO 25, revelado em Dektol (Kodak). As preparações com hibridização *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx50. As imagens foram capturadas com utilização do software CoolSNAP-pro, Image Pro Plus, 4,1 (Media Cybernetics).

Os negativos foram selecionados e copiados em papel Kodabromide F₃. Os cromossomos foram recortados e organizados em pares de homólogos para a montagem dos cariótipos, medidos e classificados em metacêntricos (m),

submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan *et al.* (1964).

O cariótipo foi organizado, separando os cromossomos em ordem decrescente de tamanho, dentro de cada grupo. Para determinação do número fundamental (NF), os cromossomos m, sm, st foram considerados como tendo dois braços e os acrocêntricos com um braço.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dos dados obtidos nesta tese encontram-se organizados em dois capítulos, referentes a trabalhos científicos. O primeiro capítulo já foi submetido para publicação na revista *Genetics and Molecular Biology*, encontrando em fase de análise. O segundo capítulo será posteriormente encaminhado a uma outra revista científica, posteriormente à defesa desta tese.

Capítulo I

Mapeamento de genes ribossomais e marcadores cromossômicos em três espécies de piranha do gênero *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) da bacia Amazônica

Celeste Mutuko Nakayama¹, Eliana Feldberg¹ e Luiz Antônio Carlos Bertollo²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática, Laboratório de Genética de Peixes, Caixa Postal 478, 69011-970 Manaus, AM, Brasil. E-mail: celnaka@inpa.gov.br

²Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, Caixa Postal 676, 13.565-905 São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

Foram realizadas análises cromossômicas em três espécies de piranhas do gênero *Serrasalmus*: *Serrasalmus altispinnis*, *S. gouldingi* e *S. serrulatus*, provenientes do médio e baixo rio Negro, bacia Amazônica. As três espécies apresentaram $2n=60$ cromossomos e número fundamental $NF=110$. O número de cromossomos acrocêntricos foi constante nas três espécies, embora variações tenham sido encontradas quanto aos demais tipos de cromossomos, conferindo assim fórmulas cromossômicas espécies-específicas. *S. altispinnis* apresentou uma fórmula cariotípica diferente daquela previamente apresentada pelos espécimes do rio Pitinga (bacia do Uatumã). Esta divergência intra-específica é, provavelmente, consequência da ausência de fluxo gênico entre as populações, visto que a bacia do rio Uatumã encontra-se atualmente isolada da área de estudo do presente trabalho. A heterocromatina banda C-positiva mostrou-se preferencialmente localizada na região centromérica dos cromossomos nas três espécies, além de alguns outros blocos heterocromáticos diferenciais entre elas. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram sempre teloméricas, múltiplas e preferencialmente situadas no braço curto dos cromossomos subtelo-acrocêntricos, tanto quando analisadas pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs) como pela hibridação fluorescente “in situ” (FISH) com sonda de DNAr 18S. Entretanto, ocorreram variações quanto ao número máximo de sítios detectados, assim como nos cromossomos portadores desses sítios entre as espécies. O DNAr 5S mostrou-se localizado em um único sítio nas três espécies, na região proximal dos braços longos de um par metacêntrico médio, coincidindo com blocos heterocromáticos marcadores para o gênero *Serrasalmus*. Os dados obtidos

evidenciam características cromossômicas que são compartilhadas pelas três espécies analisadas, ao lado de outras, importantes para a sua citotaxonomia.

Palavras-chave: piranhas, evolução cariotípica, Ag-RONs, heterocromatina, genes ribossomais

Introdução

A subfamília Serrasalminae, ou peixes comumente conhecidos por pacus e piranhas, inclui cerca de 80 espécies válidas e 15 gêneros, estritamente Neotropicais. Todos os gêneros estão representados na bacia Amazônica, e apenas seis estão presentes na bacia do Paraná-Paraguai e três na bacia do São Francisco (Jégu, 2003). Vários estudos têm sido realizados visando a caracterização de espécies e a revisão do grupo, abrangendo análises morfológicas, cariotípicas, moleculares, do desenvolvimento e de relações parasito-hospedeiro, entre outras, contribuindo para o progresso da sistemática dos Serrasalminae (Jégu, 2003).

O gênero *Serrasalmus*, o qual engloba as piranhas, é um dos mais diversificados da subfamília Serrasalminae. São peixes altamente especializados e vorazes, com o corpo comprimido, geralmente alto e uma quilha serrilhada no ventre e amplamente distribuída pela América do Sul (Géry 1972; Goulding, 1980; Machado-Allison & Fink, 1995). Vinte e quatro espécies encontram-se bem caracterizadas nesse gênero, além de mais 4 “espécies inquirenda”, ou seja, necessitando uma melhor caracterização (Jégu, 2003). Na realidade, a taxonomia e a sistemática são dificultadas por alguns atributos desse grupo, como o padrão de coloração que pode sofrer alterações durante o processo ontogenético e no período reprodutivo (Géry, 1972; Machado-Allison, 1985).

Dez espécies de *Serrasalmus* já tiveram o cariótipo analisado, sendo que $2n=60$ cromossomos foi sugerido ser o número diplóide basal para esse grupo (Cestari & Galetti Jr, 1992a; Nakayama *et al.*, 2002). Entretanto, cerca de dezessete formas cariotípicas distintas foram descritas, evidenciando uma diversidade cromossômica intra-específica (Nakayama *et al.*, 2002). Assim, por exemplo, para a espécie *S.*

maculatus, anteriormente denominada *S. spilopleura* (Jégu & Santos, 2001), foram descritos quatro citótipos ou formas cariotípicas distintas na bacia Amazônica, na região de confluência dos rios Negro e Solimões (Nakayama *et al.*, 2000; Centofante *et al.*, 2002a), enquanto que para *S. spilopleura*, da bacia do Paraná, foram descritos três citótipos (Cestari & Galetti Jr., 1992a). Por sua vez em *S. rhombeus*, além da forma cariotípica com $2n=60$ cromossomos, foi caracterizada uma espécie críptica com $2n=58$ cromossomos, possivelmente resultante de fusões cromossômicas (Nakayama *et al.*, 2001), além de um novo citótipo (Teixeira *et al.*, 2006).

No presente estudo analisamos a estrutura do cariótipo de mais duas espécies de *Serrasalmus* – *S. gouldingi* e *S. serrulatus* - e de uma nova forma cariotípica de *S. altispinnis*, da bacia Amazônica, com vistas à evolução cariotípica do grupo, dando ênfase à distribuição dos sítios de Ag-NORs e dos genes de rDNA 18S e 5S e à caracterização de alguns cromossomos marcadores para esse grupo.

Material e Métodos

Foram analisados 23 espécimes de *Serrasalmus altispinnis*, 18 espécimes de *S. gouldingi* e 26 espécimes de *S. serrulatus*, provenientes da bacia Amazônica, Estado do Amazonas, Brasil (Figura 1; Tabela 1). Os exemplares foram classificados pelo Prof. Dr. Jansen Zuanon, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e depositados na Coleção de Peixes do Laboratório de Citogenética de Peixes do INPA.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim, utilizando o procedimento *in vivo* descrito por Bertollo *et al.* (1978), após estimulação de mitoses por fermento biológico, conforme descrito por Oliveira *et al.* (1988). Foram analisadas aproximadamente 30 metáfases por indivíduo. Os cromossomos foram

classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e dispostos em ordem decrescente nos cariótipos. O número fundamental, ou número de braços cromossômicos, foi determinado considerando os cromossomos (m), (sm) e (st) portadores de dois braços e os cromossomos (a) portadores de um braço. A heterocromatina C-positiva foi evidenciada pelo bandamento C (Sumner, 1972) e as regiões organizadoras de nucléolos - Ag-NORs – foram identificadas pela coloração com o Nitrato de Prata, conforme Howell & Black (1980).

Foi utilizada a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para a localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos, seguindo a metodologia básica de Pinkel *et al.* (1986). A sonda de rDNA 18S foi obtida a partir do peixe *Prochilodus argenteus* por PCR (Hatanaka & Galetti Jr., 2004), usando os primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'), conforme White *et al.* (1990). A sonda de rDNA 5S foi obtida a partir do peixe *Leporinus obtusidens* por PCR (Martins & Galetti Jr., 1999), usando os primers A (5'-TACGCCGATCTCGTCCGATC-3') e B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), conforme Pendás *et al.* (1994). As sondas foram marcadas por “nick translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (50µg/ml e 200µl de antifading) e analisados em microscópio de epifluorescência, Olympus BX50. As imagens foram capturadas, utilizando-se o Software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Resultados

As três espécies apresentaram $2n=60$ cromossomos e número fundamental igual a 110, com cariótipos sempre constituídos por metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos. Entretanto, foram observadas algumas diferenças quanto às fórmulas cariotípicas, sendo 24m, 20sm, 6st, 10a para *Serrasalmus altispinnis*; 22m, 22sm, 6st, 10a para *S. gouldingi* e 20m, 22sm, 8st, 10a para *S. serrulatus*. A comparação entre os cariótipos de fêmeas e machos não evidenciou heteromorfismo cromossômico sexual em nenhuma das espécies (Tabela 2; Figura 2).

A heterocromatina C-positiva mostrou-se preferencialmente localizada na região pericentromérica dos cromossomos, nas três espécies. Alguns pares cromossômicos evidenciaram blocos heterocromáticos extra-pericentroméricos mais conspícuos, no braço curto ou no braço longo. O par metacêntrico nº 7 se destaca no cariótipo das três espécies, o qual é portador de um sítio C-positivo proeminente, localizado no braço longo na região proximal ao centrômero (Figura 2b, d, f e Figura 5a, c, e).

As Ag-RONs foram múltiplas e sempre teloméricas, localizadas no braço curto de cromossomos acrocêntricos/subtlocêntricos, com variações numéricas intra- e inter-individuais, intra- e inter-específicas, sendo detectado um máximo de 10 sítios em *S. altispinnis*, 8 sítios em *S. gouldingi* e 12 sítios em *S. serrulatus* (Tabela 2; Figura 4 a, c, e). Variações similares foram também observadas em relação aos sítios de rDNA 18S, também sempre presentes em regiões teloméricas. Enquanto que em *S. altispinnis* os sítios 18S foram evidenciados apenas em cromossomos acrocêntricos, em *S. gouldingi* eles foram também detectados em cromossomos subtlocêntricos e

em *S. serrulatus* em cromossomos metacêntricos (Tabela 2; Figura 3 a, c, e; Figura 4 b, d, f).

Os sítios de rDNA 5S apresentaram localização constante no cariótipo das três espécies, sendo sempre intersticiais e proximais ao centrômero, no braco longo de um par de cromossomos metacêntricos, correspondendo ao de número 7 no cariótipo (Tabela 2; Figura 3 b, d, f; Figura 5 b, d, f).

Discussão

Estudos cariotípicos têm sugerido que o número diplóide ancestral das piranhas, gênero *Serrasalmus*, deve ser igual a 60 cromossomos e que outros números diplóides representariam estados derivados nesse grupo (Cestari & Galetti Jr., 1992b; Nakayama *et al.*, 2002).

Os dados obtidos no presente estudo mostram que duas espécies ainda não analisadas, *S. gouldingi* e *S. serrulatus*, também apresentam $2n=60$ cromossomos e $NF=110$, o mesmo ocorrendo para uma nova forma cariotípica de *S. altispinnis*. Entretanto, apesar das três espécies apresentarem o mesmo número diplóide e o mesmo número de braços cromossômicos, foram detectadas diferenças em suas fórmulas cariotípicas, indicando que cada uma delas passou por rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos diferenciais durante a evolução cariotípica.

Nakayama *et al.* (2002), analisando *S. altispinnis* do rio Pitinga (bacia do Uatumã) detectaram um cariótipo com 20m, 28sm, 2st, 10a e $NF=110$, o que contrasta com os espécimes ora estudados provenientes do médio rio Negro, os quais se caracterizaram por 22m, 22sm, 6st, 10a e $NF=110$. Assim sendo, fica evidente que esta espécie apresenta uma variabilidade cromossômica associada

com a sua distribuição geográfica, e que prováveis inversões pericêntricas, em pelo menos seis cromossomos de uma das formas cariotípicas, devem estar associadas com a variabilidade detectada, considerando também a constância do NF=110. A fixação desses rearranjos deve ter sido facilitada pela ausência de fluxo gênico entre as duas populações. Segundo Forsberg *et al* (2000) a paisagem amazônica é composta por blocos estruturais separados por extensos sistemas de falhas. Estes blocos se movem, ajustando-se lentamente, alterando cursos de alguns rios na Amazônia Central. De fato, atualmente não existe mais conexão entre as bacias do rio Uatumã e do rio Negro, sendo que a separação entre elas pode ter ocorrido no final do terciário e início do quaternário, quando ocorreu o surgimento das cachoeiras e corredeiras no leito do rio Uatumã (Forsberg *et al.*, 2000; Nogueira & Sarges, 2001; Costa *et al.*, 2001; Müller & Carvalho, 2005). A associação futura desses dados cromossômicos, com caracteres morfológicos e genéticos poderá evidenciar se essas duas formas cariotípicas de *S. altispinnis* já seriam representativas de espécies distintas, presentes nesse grupo, ou então representativos de duas populações em processo evolutivo diferencial.

A distribuição da heterocromatina banda C-positiva foi semelhante nas três espécies, estando preferencialmente situada na região centromérica dos cromossomos, algumas bandas mostrando-se mais destacadas do que de outras. Entretanto, pode-se considerar que uma quantidade decrescente de heterocromatina caracteriza, como um todo, o cariótipo de *S. altispinnis*, *S. gouldingi* e *S. serrulatus*, respectivamente, ao lado de algumas bandas que podem ser espécie-específicas dependendo de uma análise mais detalhada das bandas C em estudos posteriores. Como um destaque importante, observa-se uma banda C-positiva no braço longo do par metacêntrico nº. 7, compartilhada pelas três espécies. Nakayama *et al.* (2002) e

Centofante *et al.* (2002a) sugeriram que esta banda pode constituir uma característica marcadora para o gênero *Serrasalmus*.

S. serrulatus já foi considerada pertencente ao gênero *Pristobrycon*, *P. serrulatus* (Goulding, 1980; Ortí *et al.*, 1996), tendo sido posteriormente remanejada para o gênero *Serrasalmus* (Jégu & Santos, 1988; Jégu, 2003). Assim sendo, as características presentes n^o. 7 vem também corroborar a inclusão dessa espécie no gênero *Serrasalmus*.

Todas as espécies da subfamília Serrasalminae já analisadas apresentaram vários sítios de genes ribossomais, com variações inter- e intra-individuais entre 4 a 12 Ag-RONs, caracterizando assim um sistema de RONS múltiplas (Galetti Jr. *et al.*, 1985; Cestari & Galetti Jr., 1992a; b; Martins-Santos *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a).

Particularmente no gênero *Serrasalmus*, as Ag-RONs encontram-se sempre situadas no braço curto de cromossomos acro-sutelocêntricos (Galetti Jr. *et al.*, 1985; Cestari & Galetti Jr., 1992a;b; Martins-Santos *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a), coincidentemente com o que foi também observado nas três espécies ora estudadas. Entretanto, o número máximo de Ag-RONs detectadas foi distinto entre essas espécies, sendo 10 em *S. altispinnis*, 8 em *S. gouldingi* e 12 em *S. serrulatus*. Por sua vez, o número máximo de sítios de DNAr 18S também foi coincidente com o número máximo de Ag-RONs em cada uma das espécies, embora a localização desses sítios nem sempre foi correspondente, considerando as duas metodologias de análise, com exceção de *S. altispinnis*, onde esta concordância foi observada. Entretanto, em *S. gouldingi* e *S. serrulatus*, sítios de DNAr 18S foram observados em cromossomos não correspondentes àqueles ocupados pelas Ag-RONs, como subtlocêntricos e metacêntricos, respectivamente.

Em contrapartida, alguns cromossomos apresentando Ag-RONs também não evidenciaram os sítios esperados de DNAr 18S.

No que se refere às Ag-RONs, esses resultados podem ser explicados por uma atividade gênica diferencial entre os distintos sítios presentes no genoma das espécies, visto que somente as RONs que estiveram ativas na interfase precedente são evidenciadas por esta metodologia (Miller *et al.*, 1976). De fato, a inatividade de alguns sítios ribossômicos é uma característica comumente encontrada entre os peixes, tanto naqueles que apresentam RONs múltiplas, como *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000); *Astyanax scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Kavalco & Moreira-Filho, 2003); *Astyanax parahybae*, *A. intermedius* e *A. giton* (Kavalco & Moreira-Filho, 2003), como naqueles que apresentam RONs simples, como algumas espécies de Cichlidae e Curimatidae (Feldberg & Bertollo, 1985; Feldberg *et al.*, 1992; Santos, 2006). Por outro lado, a não detecção de alguns sítios de RONs por FISH pode estar relacionada com o tamanho diminuto dessas regiões, que geralmente se mostram bem pontuais. É provável que a hibridação dos cistrons 18S com a sonda correspondente seja dificultada, ou tenha uma visualização imperceptível, pelo número reduzido de cópias gênicas presentes em alguns sítios. Assim sendo, o número real de sítios de RONs, presente no cariótipo de *S. gouldingi* e *S. serrulatus*, deve ser maior do que aquele detectado tanto pela impregnação por Nitrato de Prata como por FISH. A priori, poderíamos supor que pelo menos 10 sítios deveriam estar presentes em *S. gouldingi* e 14 em *S. serrulatus*, considerando a provável presença de sítios 18S em todos os pares ou homólogos esperados e nos quais os mesmos não foram visualizados (Figura 4 d, f). Por outro lado, não se pode também descartar que uma transposição de RONs possa também ter ocorrido entre diferentes cromossomos, propiciando assim a diversidade observada quanto à posição dessas regiões no cariótipo dessas espécies.

Em vários organismos, o DNAr 5S está localizado em um único par cromossômico. Entretanto, entre os anfíbios (Vitelli *et al.*, 1982; Schmid *et al.*, 1987; Lucchini *et al.*, 1993), bem como entre algumas espécies de peixes (Moran *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Murakami & Fujitani, 1998; Martins & Galetti Jr., 1999; 2000), os cistrons de DNAr 5S localizam-se em vários cromossomos. Além disso, os locos de DNAr 45S e 5S podem assumir uma organização sintênica (Pendás *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1996; Hatanaka & Galetti Jr., 2004; Mantovani *et al.*, 2005), ou podem estar localizados em pares cromossômicos distintos (Martínez *et al.*, 1996; Sajdak *et al.*, 1998; Martins & Galetti Jr., 1999; Born & Bertollo, 2000), o que parece ser a característica mais comumente observada entre os peixes, como é o caso do presente trabalho.

As três espécies estudadas mostraram a localização de um sítio de DNAr 5S na região intersticial do braço longo de um único par cromossômico metacêntrico médio, na região proximal ao centrômero. Coincidentemente, este sítio mostra uma correspondência com a banda de heterocromatina C-positiva, presente neste mesmo par cromossômico (nº. 7). Assim sendo, juntamente com esta banda heterocromática, a localização do sítio 5S também parece constituir uma característica compartilhada em *Serrasalmus*, evidenciando mais um possível marcador cromossômico importante para esse gênero.

As relações evolutivas entre as espécies de piranhas ainda não se encontram bem definidas, continuando como objeto de diversos estudos atuais. Frequentemente, dados moleculares vêm sendo acrescentados a estudos morfológicos, procurando checar a robustez da monofilia deste grupo de peixes, em distintos níveis, desde espécies até família e/ou subfamília (Freeman *et al.*, 2007). Paralelamente, os dados cromossômicos têm também evidenciado características

importantes para a citotaxonomia e o inter-relacionamento das espécies desse grupo. Assim, por um lado, características relativamente conservadas como o número diplóide, o número fundamental e a presença de possíveis cromossomos marcadores, a exemplo do par metacêntrico número 7, corroboram a inter-relação entre as espécies analisadas. Por outro lado, características diferenciais como as fórmulas cariotípicas, bandas heterocromáticas espécies-específicas, assim como o número e a localização dos sítios de DNAr 18S constituem importantes características para a citotaxonomia dessas espécies, chegando mesmo a evidenciar possíveis casos de espécies crípticas, como considerado para *S. altispinnis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. J.A.S.Zuanon pelo auxílio na classificação dos exemplares e A.C. dos Santos pela sua ajuda nas figuras deste artigo. Este trabalho teve suporte do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), através do projeto intitucionais PPI 2-3450, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Programa de apoio a Núcleos de Excelência em Ciência e Tecnologia (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)/Programa Integrado de Pesquisa e Inovação Tecnológica (PIPT) e IBAMA – Licença Nº 049/2004 e 006/2004. C.M.Nakayama recebeu bolsa de doutorado do CNPq.

Referências

As referências bibliográficas deste artigo estão reunidas no final desta tese.

Tabela 1 - Espécies do gênero *Serrasalmus* analisadas, locais de coleta na região Amazônica (Brasil) e número de espécimes estudados.

Espécies	Locais	♂	♀	Total
<i>Serrasalmus altispinnis</i>	Anavilhanas	08	04	12
	Barcelos	08	03	11
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	Barcelos	06	10	16
	Jaú	-	01	01
	Anavilhanas	01	-	01
<i>Serrasalmus serrulatus</i>	Anavilhanas	03	04	07
	Barcelos	05	07	12
	Catalão	04	03	07
Total		35	32	67

Tabela 2 - Características cariotípicas das espécies estudadas.

Espécies	2n/NF	Fórmulas cariotípicas	Ag-NORs	18S	5S
<i>Serrasalmus altispinnis</i>	60/110	24m+20sm+6st+10a	6 – 10a, p, t	10a, p, t	2m
<i>S. gouldingi</i>	60/110	22m+22sm+6st+10a	5 – 8a, p, t	6a, p, t + 2st, p, t	2m
<i>S. serrulatus</i>	60/110	20m+22sm+8st+10a	4 -12st-a, p, t	8a, p, t + 2st, p, t +1m, p, t +1m, p, t	2m

2n= número diplóide modal; NF = número fundamental; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; p = braço curto; q = braço longo; t = terminal; Ag-NORs = sítios de regiões organizadoras de nucléolo evidenciados pelo nitrato de prata; 18S = nº máximo de sítios de rDNA 18S evidenciados por FISH; 5S = nº máximo de sítios de rDNA 5S FISH evidenciados por FISH.

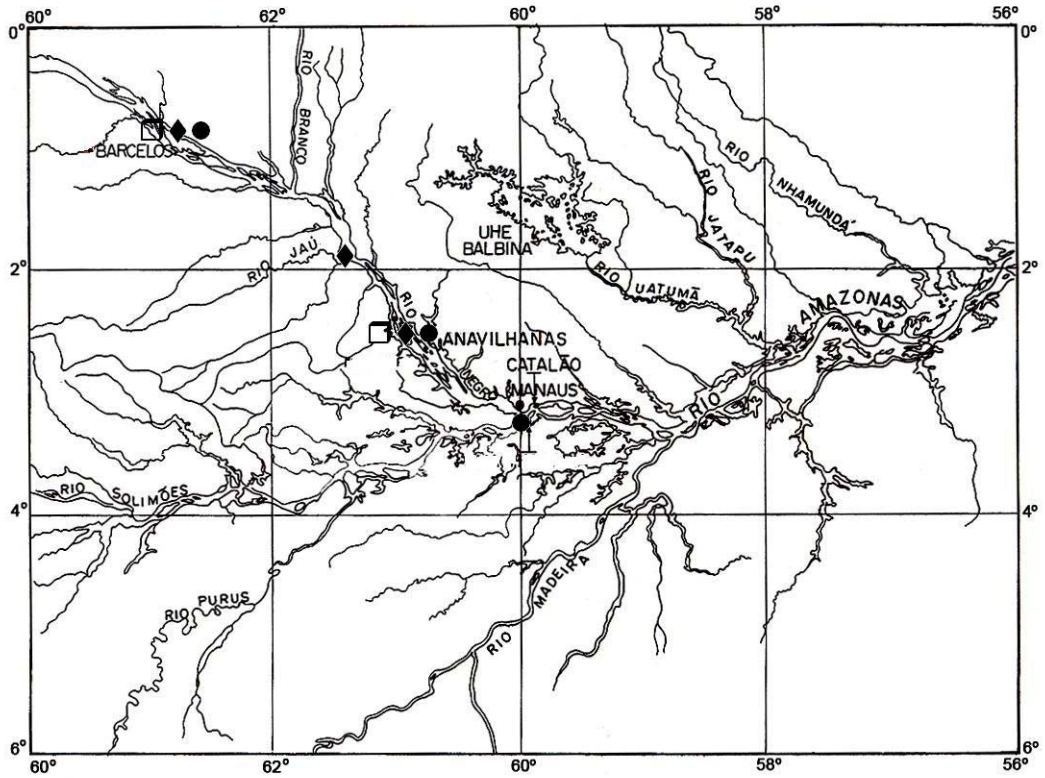


Figura 1 – Mapa do local de coleta e imagem das espécies do gênero *Serrasalmus* analisadas na presente estudo: a) *S. altispinnis* (□, indivíduo com 16,0cm); b) *S. gouldingi* (◆ indivíduo com 14,0cm) e *S. serrulatus* (● indivíduo com 15,5cm).

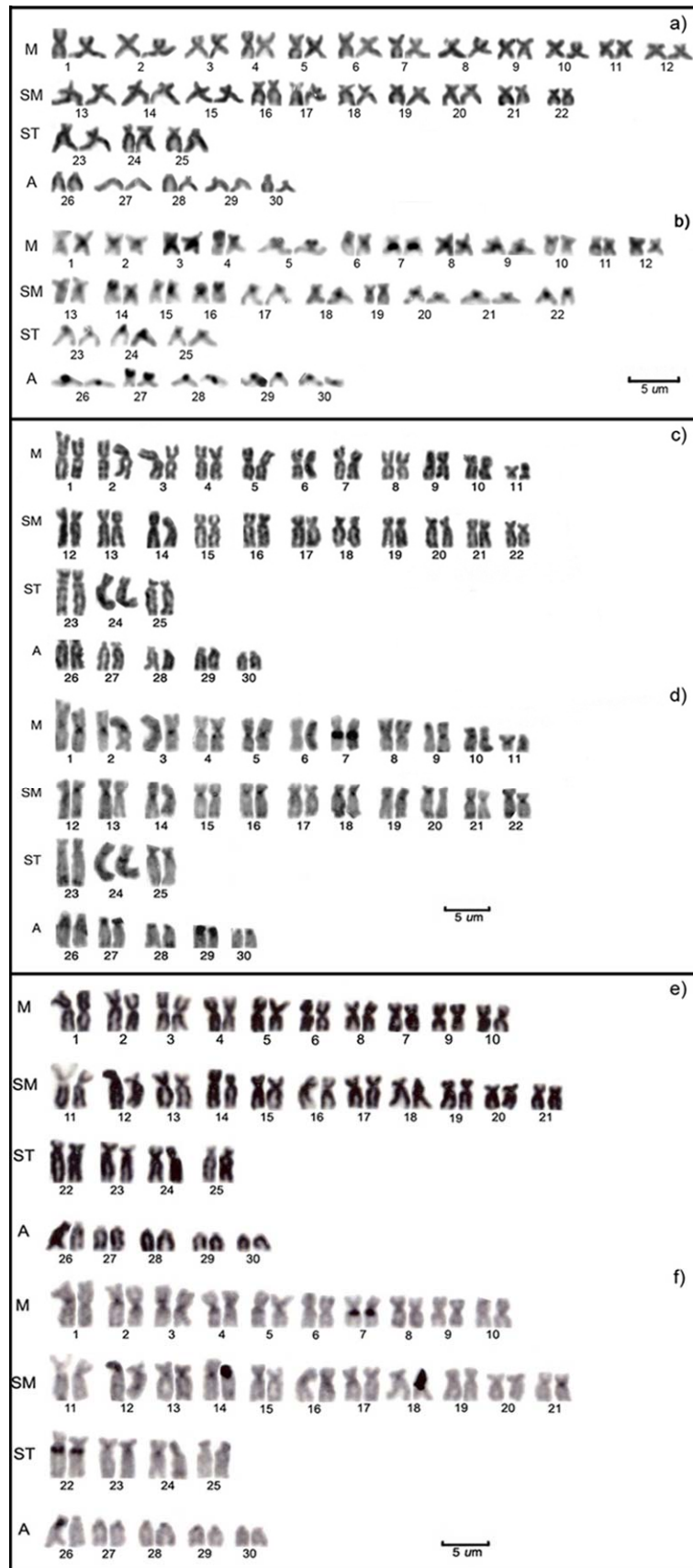


Figura 2 – Cariótipos de *Serrasalmus altispinnis*, *S. gouldingi* e *S. serrulatus* com coloração Giemsa convencional (a, c, e) e bandamento C (b, d, f), respectivamente.

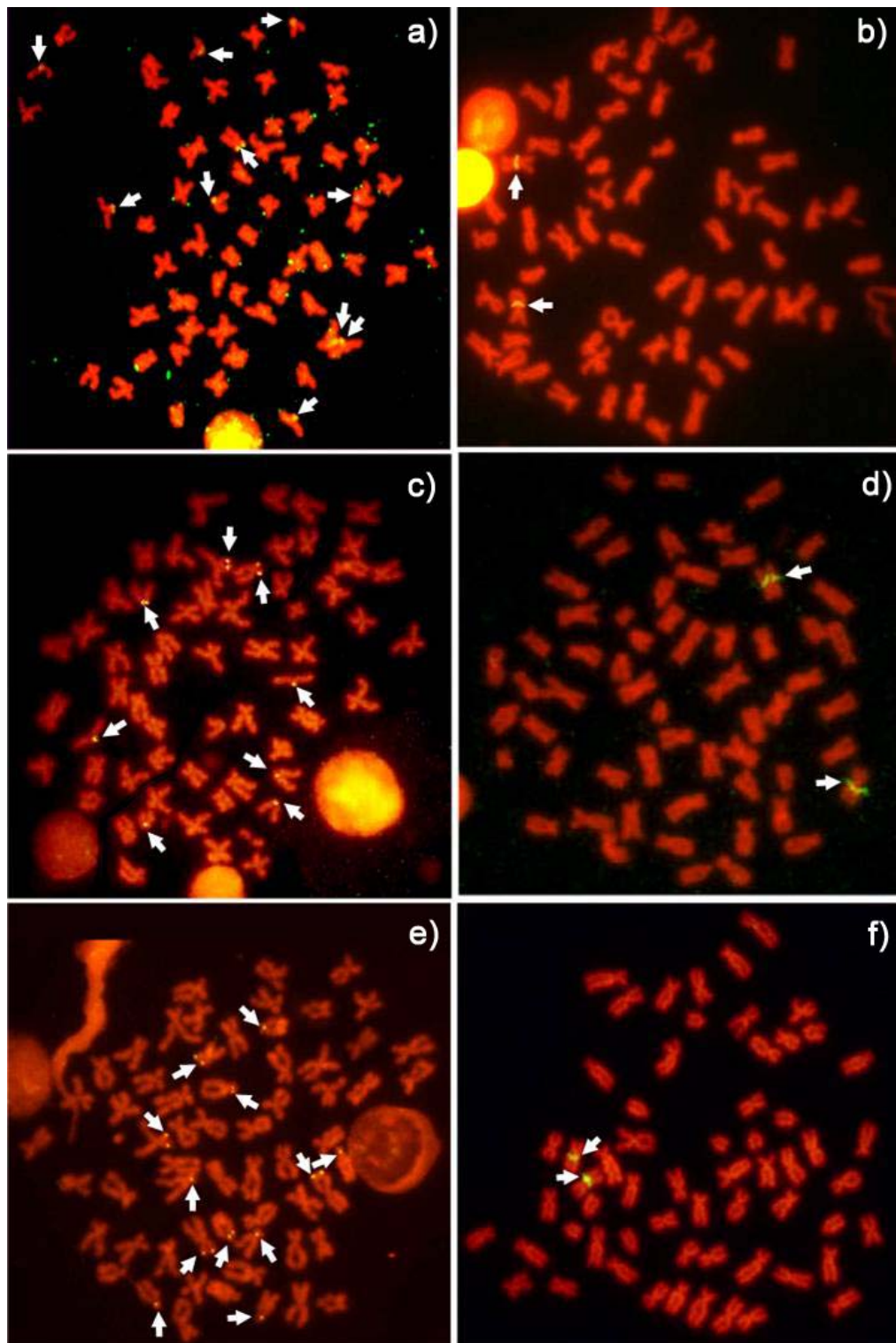


Figura 3 - Cromossomos metafásicos de *Serrasalmus altispinnis* (a, b), *S. gouldingi* (c, d) e *S. serrulatus* (e, f), evidenciando os sítios de rDNA 18S (a, c, e) e de rDNA 5S (b, d, f).

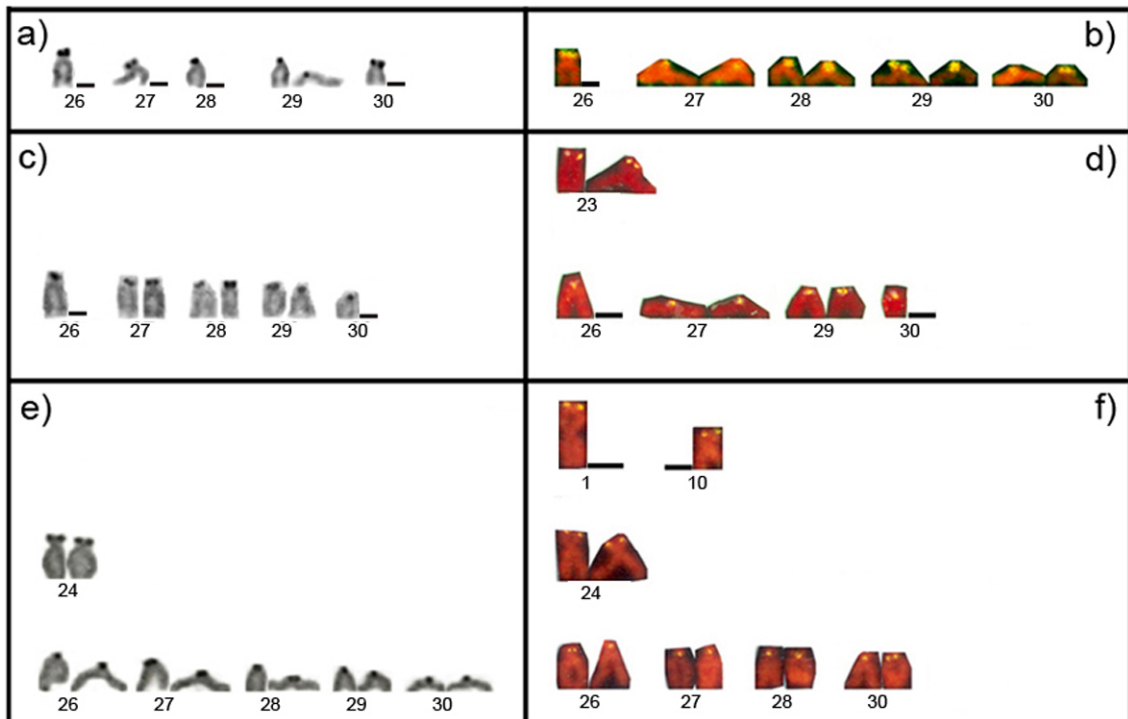


Figura 4 - Cromossomos de *Serrasalmus altispinnis* (a, b), *S. gouldingi* (c, d) e *S. serrulatus* (e, f) evidenciando sítios de Ag-NORs (a, c, e) e de rDNA 18S (b, d, f).

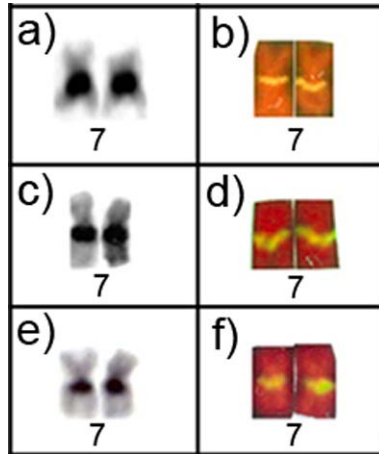


Figura 5 - Par cromossômico nº 7 de *Serrasalmus altispinnis* (a, b), *S. gouldingi* (c, d) e *S. serrulatus* (e, f) evidenciando a co-localização da região de heterocromatina C-positiva (a, c, e) e do sítio de rDNA 5S (b, d, f).

Capítulo II

Regiões organizadoras de nucléolos, DNAr 18S e 5S em espécies de Serrasalminae (Characiformes, Serrasalmidae) da Amazônia Central. Contribuições à citotaxonomia do grupo.

Celeste Mutuko Nakayama¹, Eliana Feldberg¹ e Luiz Antônio Carlos Bertollo²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática, Laboratório de Genética de Peixes, Caixa Postal 478, 69011-970 Manaus, AM, Brasil. E-mail: celnaka@inpa.gov.br

²Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, Caixa Postal 676, 13.565-905 São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

Foram analisadas as regiões organizadoras de nucléolos pela coloração com o Nitrato de Prata (Ag-RONs) e a localização cromossômica dos genes DNAr 18S e 5S em 11 espécies da subfamília Serrasalminae da Amazônia Central, incluindo *Colossoma macropomum*, considerada a espécie basal da subfamília e representantes dos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Catoprion*. Todas as espécies do gênero *Serrasalmus* apresentaram $2n=60$ cromossomos, exceto *S. cf. rhombeus*, que apresentou $2n=58$, *Pygocentrus nattereri* apresentou $2n=60$. *Pristobrycon striolatus* e *Catoprion mento* apresentaram $2n=62$ e *C. macropomum* $2n=54$. Apenas *C. macropomum* possui todos os cromossomos meta-submetacêntricos. Nas demais espécies as fórmulas cariotípicas, embora distintas, apresentam cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos. As regiões organizadoras de nucléolos, visualizadas com o Nitrato de Prata (Ag-RONs), foram múltiplas e sempre terminais nos cromossomos, localizadas no braço curto de cromossomos acro- subtlocêntricos na maioria das espécies, exceto em *C. macropomum* onde foram observadas no braço longo de cromossomos meta-submetacêntricos e em *C. mento*, onde se localizaram no braço curto de cromossomos submetacêntricos e no braço longo de cromossomos subtelo-acrocêntricos. Os sítios de DNAr 18S foram analisados por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e, em muitos casos, coincidentes com as Ag-RONs. Contudo, puderam ser também observadas algumas discordâncias entre essas duas metodologias, podendo ocorrer um número maior de sítios 18S, assim como uma localização distinta desses sítios nos cromossomos de algumas espécies. Tais resultados foram atribuídos à especificidade

do Nitrato de Prata apenas para com os sítios de RONS ativos, assim como a possíveis dificuldades de detecção de alguns sítios por FISH, em decorrência do tamanho bastante reduzido. A heterocromatina C-positiva mostrou-se localizada, preferencialmente, na região centromérica dos cromossomos, destacando-se um par metacêntrico com uma banda C-positiva no braço longo, próxima ao centrômero, bem evidenciada em todas as espécies de *Serrasalmus* (par 7) e em *P. nattereri* (par 3). O DNAr 5S foi observado em apenas um par de cromossomos em todas as espécies. Em *Serrasalmus* esse par foi correspondente ao de número 7 no cariótipo e em *P. nattereri* ao de número 3, havendo co-localização dos sítios 5S com a banda C-positiva. Em *P. striolatus* e *C. mento* o par portador dos sítios 5S também foi o de número 3, porém não foram coincidentes com blocos de heterocromatina como as espécies anteriores. Em *C. macropomum* esse par é menor, provavelmente o 12^o, e com uma localização distinta dos genes ribossomais, ou seja, na região intersticial do braço curto do cromossomo. Os dados cromossômicos obtidos mostram uma clara divergência de *Colossoma* dos demais gêneros de Serrasalminae. Considerando esse gênero como o mais basal na filogenia dos Serrasalminae, rearranjos cromossômicos como fissões cêntricas e inversões pericêntricas parecem se destacar na diferenciação cariotípica do grupo, assim como modificações envolvendo o número e a posição das RONS nos cromossomos. Por sua vez, os sítios de DNAr 5S se apresentam mais conservados no grupo, mantendo o número e a posição em cromossomos aparentemente homeólogos entre as espécies, com exceção de *C. macropomum*.

Palavras chaves: genes ribossomais, citotaxonomia, relações evolutivas, piranhas.

Introdução

As técnicas de bandeamento cromossômico têm sido de grande utilidade na citogenética de peixes Neotropicais, possibilitando detectar marcadores cromossômicos potenciais para estudos da diferenciação cariotípica deste grupo de vertebrados. Dentre essas metodologias, a análise das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) pelo Nitrato de Prata (Ag-RONs) tem sido uma das mais utilizadas, principalmente a partir da década de 80, fornecendo importantes subsídios para estudos citotaxonômicos e evolutivos (Galetti Jr *et al.*, 1984; Gold, 1984; Venere & Galetti Jr., 1989; Feldberg *et al.*, 1992; 2003). Entretanto, esta ferramenta de estudo mostra algumas limitações, sendo mais resolutiva em grupos de peixes que apresentam uma diversidade interespecífica quanto a este marcador, uma vez que para famílias como Parodontidae, Hemiodontidae, Prochilodontidae, Salmoninae, que apresentam RONs simples e localizadas em cromossomos correspondentes, este marcador não é tão elucidativo (Feldberg *et al.*, 1992). Além disso, principalmente em grupos que apresentam um sistema de RONs múltiplas, nem todas as regiões organizadoras de nucléolos possivelmente estejam ativas concomitantemente, não sendo assim evidenciadas pelo Nitrato de Prata (Miller *et al.*, 1976). A família Characidae, a qual inclui a subfamília Serrasalminae, é conhecida como um grupo de peixes que apresenta sistemas simples e múltiplos de regiões organizadoras de nucléolos e de atividade variável (Falcão & Bertollo, 1985; Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Mantovani *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2001; 2002).

A partir da década de 90, os estudos cromossômicos em peixes deram um salto qualitativo, com a utilização da citogenética molecular, com o emprego de corantes fluorescentes (Cromomicina A₃ e Mitramicina) e a hibridização *in situ* fluorescente.

Estas duas metodologias também vêm sendo aplicadas com sucesso no estudo das RONS em cromossomos metafásicos, visto que podem evidenciar tanto as regiões ativas na interfase precedente quanto às inativas, sendo particularmente importantes em espécies que apresentam RONS múltiplas, como a subfamília Serrasalminae, onde as Ag-RONS mostram diferenças numéricas acentuadas (4-12) entre as espécies. Considerando a filogenia proposta por Ortí *et al.* (1996), as espécies mais basais apresentam quatro cromossomos portadores de Ag-RONS e números diplóides mais baixos ($2n=54$), com cromossomos preferencialmente de dois braços. Por outro lado, um número maior de RONS está presente nas espécies consideradas derivadas, onde o número diplóide é também mais elevado ($2n=60$ e 62), com alguns cromossomos apresentando um único braço, os quais são os portadores das RONS. (Galetti Jr. *et al.*, 1985; Martins-Santos *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a; Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Nirchio *et al.*, 2003; Gaviria *et al.*, 2005).

Assim sendo, considerando que a análise dos genes ribossomais pode contribuir para o melhor conhecimento e caracterização desses sítios dentro do genoma de uma espécie, o presente trabalho teve como objetivo determinar a localização dos genes DNAr 18S e 5S em algumas espécies de Serrasalminae da Amazônia Central, incluindo a espécie *Colossoma macropomum*, considerada a espécie basal da subfamília e as espécies mais derivadas, que são as piranhas dos gêneros *Serrasalmus*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, com vistas à obtenção de novos subsídios quanto à diversificação cariotípica desse grupo.

Material e métodos

Foram analisadas 11 espécies da subfamília Serrasalminae: *Serrasalmus* (*S. altispinnis*, *S. elongatus*, *S. gouldingi*, *S. rhombeus*, *S. cf. rhombeus*, *S. serrulatus*; *S. maculatus*), *Pristobrycon striolatus*, *Pygocentrus nattereri*, *Catoprion mento* e *Colossoma macropomum* (Tabela 1). Os exemplares foram coletados no baixo (Catalão) e no médio (Anavilhanas e Barcelos) rio Negro, rio Jaú e rio Uatumã, à jusante da Usina Hidrelétrica de Balbina (Figuras 1 e 2). Os exemplares foram classificados pelo Prof. Dr. Jansen Zuanon, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e mantidos na coleção do Laboratório de Genética de Peixes da CPBA. A Tabela 1 e as Figuras 1 e 2 encontram-se apresentadas como figuras 3 e 4 no item 3 - Material e Métodos - da Introdução da tese.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais, utilizando o procedimento *in vivo* descrito por Bertollo *et al.* (1978), após estimulação de mitoses por fermento biológico, conforme descrito por Oliveira *et al.* (1988). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a) e dispostos em ordem decrescente de tamanho nos cariótipos (Levan *et al.*, 1964). O número fundamental, ou número de braços cromossômicos, foi determinado considerando os cromossomos (m), (sm) e (st) apresentando dois braços e os cromossomos (a) apresentando um único braço. A heterocromatina constitutiva (bandas C) foi evidenciada segundo a técnica de Sumner (1972). As regiões organizadoras de nucléolos foram identificadas pela coloração com o Nitrato de Prata (Ag-RONs), conforme Howell & Black (1980) e pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), seguindo a metodologia básica de Pinkel *et al.* (1986). A sonda de DNAr 18S foi obtida a partir do peixe *Prochilodus argenteus* por PCR

(Hatanaka & Galetti Jr., 2004), usando os primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'), conforme White *et al.* (1990).

Para a detecção dos sítios ribossômicos 5S foi utilizada uma sonda de DNAr 5S, obtida a partir do peixe *Leporinus obtusidens* por PCR (Martins & Galetti Jr., 1999), usando os primers A (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), conforme Pendás *et al.* (1994). As sondas foram marcadas por "nick translation" (BioNick Labeling System – Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídio (50µg/ml e 200µl de antifading) e analisados em microscópio de epifluorescência, Olympus BX50. As imagens foram capturadas, utilizando-se o Software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Resultados

A Tabela 2 resume os resultados cariotípicos das 11 espécies estudadas. Destas, uma apresentou $2n=54$ cromossomos (*Colossoma macropomum*), duas apresentaram $2n=62$ (*Catoprion mento*, *Pristobrycon striolatus*), uma $2n=58$ (*Serrasalmus cf. rhombeus*) e sete $2n=60$. O número de braços (NF) variou de 106 a 118, não tendo sido detectado nenhum heteromorfismo cromossômico sexual pela análise comparativa dos cariótipos de machos e fêmeas. Os cariótipos das espécies *C. macropomum* (26m+28sm), *P. nattereri* (20m+28sm+2st+10a), *P. striolatus* (22m+22sm+6st+12a) e *C. mento* (26m+26sm+4st+6a) estão sendo apresentados pela primeira vez, com coloração Giemsa convencional e com bandamento C (Figuras 3 e 4). As demais espécies já tiveram os cariótipos publicados em trabalhos anteriores

(Nakayama *et al.*, 2000; 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a; Capítulo I) razão pela qual não estão sendo novamente re-apresentados.

A heterocromatina constitutiva banda C-positiva mostrou-se localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos, em todas as espécies. Entretanto, alguns possíveis blocos espécie-específicos, parecem ocorrer, conforme já relatado em estudos anteriores para o gênero *Serrasalmus* (Nakayama *et al.*, 2001; 2002; Centofante *et al.*, 2002a). Destacam-se a presença de um bloco heterocromático intersticial no braço longo do par metacêntrico nº 7 nas espécies desse gênero (Capítulo I). Em *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento* também foram observados segmentos heterocromáticos mais conspícuos em alguns pares cromossômicos (Figuras 3d, 4b e d), que serão melhor analisados em estudos futuros mais detalhados sobre o bandamento C nessas espécies.

Todas as espécies apresentaram Ag-RONs múltiplas, localizadas em posição terminal nos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, com variações numéricas (Tabela 2; Figura 5A). *Catoprion mento* e *Colossoma macropomum* foram as únicas espécies que fugiram a essa regra. Assim, *C. mento* evidenciou RONS nos braços curtos de quatro cromossomos submetacêntricos, assim como nos braços longos de quatro cromossomos subtelocêntricos e de dois cromossomos acrocêntricos. Por sua vez, *C. macropomum* apresentou Ag-RONs em posição terminal nos braços longos de quatro cromossomos metacêntricos (Tabela 2; Figura 6A). Os sítios de DNAr 18S foram, em geral, coincidentes ou em número maior do que os sítios de Ag-RONs, embora a localização cromossômica tenha mostrado algumas poucas divergências entre essas duas metodologias, em algumas espécies (Tabela 2; Figuras 5B; 6B).

O DNAr 5S foi sempre localizado em apenas um único par de cromossomos, em posição intersticial no braço longo, próximo ao centrômero. *C. macropomum* foi novamente uma exceção, onde este sítio situou-se no braço curto e em apenas um dos homólogos do par (possivelmente o de número 12 no cariótipo). Nas espécies do gênero *Serrasalmus* esta marcação foi coincidente com um bloco de heterocromatina, presente no par metacêntrico número 7 do cariótipo. Em *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento*, o sítio de DNAr 5S foi evidenciado no braço longo do par metacêntrico número 3, em uma posição similar aos sítios detectados nas espécies de *Serrasalmus*. Pelo menos em *P. nattereri* há também uma correlação do sítio 5S com uma banda de heterocromatina C-positiva (Tabela 2, Figura 7).

Discussão

O sistema de RONS múltiplas dos serrasalmíneos já vem sendo analisado desde a década de 80, a partir dos trabalhos de Galetti Jr. *et al.* (1985), passando por vários outros pesquisadores como Cestari & Galetti Jr. (1992a; b), Martins-Santos *et al.* (1994), Nakayama *et al.* (2001; 2002), Centofante *et al.* (2002a), Almeida-Toledo *et al.* (1987), Nirchio *et al.* (2003) e Gaviria *et al.* (2005). Nesse grupo, as Ag-RONS encontram-se geralmente localizadas na região telomérica do braço curto de cromossomos subtelo/acrocêntricos embora, em algumas espécies, possam estar também localizadas na extremidade distal do braço longo de alguns cromossomos. Entretanto, a variabilidade dessas regiões torna-se muito mais evidente quando comparadas numericamente, com variações acentuadas tanto inter- como intraespecificamente, desde quatro sítios presentes em *C. macropomum* até 12 em *S. rhombeus* (Tabela 2).

Esta variabilidade interespecífica quanto ao número de Ag-RONs pôde ser também confirmada pelo número de sítios de DNAr 18S presentes nos cariótipos, o que possibilita afirmar que, além de alguns outros caracteres como número diplóide, número fundamental e, conseqüentemente, fórmulas cariotípicas, as espécies de Serrasalminae também passaram por diferenciações cariotípicas quanto aos sítios de genes ribossomais (Tabela 2). Entretanto, nem sempre foi constatada uma perfeita correspondência entre o número dos sinais detectados por FISH com o número de RONS detectadas pelo Nitrato de Prata. Em várias espécies analisadas, o número máximo de sítios de DNAr 18S foi superior ao número máximo de Ag-RONs, o que pode ser explicado pelo fato da hibridização fluorescente *in situ* detectar os genes responsáveis pela organização do nucléolo presentes no genoma, independentemente dos mesmos estarem ativos ou não, contrariamente ao que ocorre com o emprego do Nitrato de Prata (Miller *et al.*, 1976). Assim sendo, alguns sítios de DNAr 18S, não evidenciados pela coloração com o Nitrato de Prata, poderiam corresponder a regiões não ativas no genoma. Por sua vez, em *S. rhombeus*, *S. serrulatus* e *C. mento*, algumas divergências quanto à localização dos sítios das RONS nos cromossomos foram também observadas comparando as duas metodologias utilizadas (Tabela 2). Ao lado das especificidades associadas às metodologias, um outro fator que poderia estar influenciando as divergências observadas é o tamanho diminuto das RONS nos Serrasalminae, muitas delas bem pontuais. Assim, é provável que a hibridização dos cístrons de DNAr 18S com a sonda correspondente seja dificultada, ou tenha sua visualização impossibilitada pelo número reduzido de cópias gênicas presentes em alguns sítios.

O DNAr 5S, em cerca de 67 espécies de peixes de diferentes ordens, apresenta localização mais freqüente na região intersticial dos cromossomos, estando geralmente

localizado em um único par do cariótipo, podendo representar uma condição preferencial para esse grupo (Martins & Wasko, 2004). Em todas as espécies de serrasalmíneos analisadas, o DNAr 5S foi igualmente detectado em posição intersticial, no braço longo de um par metacêntrico, sem correspondência com qualquer sítio de RON. Este cromossomo provavelmente corresponde ao par número 7 nas espécies de *Serrasalmus*, enquanto que para *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento* ele corresponde a um par aparentemente maior, provavelmente o de número 3 no cariótipo. A posição precisa desse par no cariótipo das diferentes espécies de Serrasalminae é difícil de ser confirmado na ausência de outros marcadores, em decorrência da similaridade presente entre vários pares de cromossomos. Entretanto, aparentemente trata-se de um cromossomo homólogo para *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Catoprion*, considerando a sua morfologia e posição correspondente dos sítios de DNAr 5S. Por outro lado, em *C. macropomum* o DNAr 5S foi detectado no braço curto de um cromossomo não perfeitamente identificado, mas de tamanho menor do que aquele observado nas demais espécies, possivelmente o de número 12 do cariótipo. Além disso, apenas um dos homólogos desse par evidenciou os sinais de hibridização esperados. Em alguns outros grupos de peixes Neotropicais, como os Anostomidae, Parodontidae e Prochilodontidae, o cromossomo portador dos genes DNAr 5S parece manter-se também conservado, sugerindo que eventos de evolução cromossômica não alterou significativamente esse par em grupos relacionados (Martins & Galetti Jr., 1999; 2000; Vicente *et al.*, 2001; Centofante *et al.*, 2002b; Jesus & Moreira Filho, 2003; Hatanaka & Galetti Jr., 2004).

Embora o objetivo mais específico deste trabalho tenha sido uma análise dos sítios das Ag-RONs, do DNAr 18S e 5S, uma visão geral dos resultados obtidos com a heterocromatina C-positiva evidência que diferenciações interespecíficas podem ser

também observadas, tanto no que se refere à quantidade de material heterocromático quanto à sua distribuição nos cromossomos. Entretanto, independentemente desse contexto, que seguramente requer uma análise complementar mais pormenorizada para um detalhamento mais preciso das diferenciações interespecíficas, merece destaque o fato de que os cromossomos portadores do DNAr 5S apresentam uma banda C positiva característica, localizada no braço longo e proximal ao centrômero, correlacionada com a localização dos genes ribossomais. Esta característica foi verificada em todas as espécies de *Serrasalmus* analisadas, assim como em *P. nattereri*. Sua presença em outras espécies requer análises mais conclusivas sobre o padrão de bandamento C.

A filogenia proposta por Machado-Allison (1983), com base em caracteres osteológicos, miológicos e de anatomia interna, subdivide os Serrasalminae em dois grupos distintos: o dos pacus e o das piranhas. No grupo dos pacus, *Colossoma* está como um dos gêneros mais derivados. Entre os gêneros de piranhas *Catoprion* seria o mais basal, seguido por *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*, esses dois últimos os mais derivados. Por outro lado, Ortí *et al.* (1996) apresentam uma filogenia molecular baseada em DNAr mitocondrial, onde não há uma separação entre os grupos pacus e piranhas, sendo *Colossoma* o gênero basal para a subfamília. Nesta filogenia, entre os gêneros de piranhas, *Catoprion* continua sendo o mais basal, juntamente com *P. striolatus*, sendo seguidos por outras espécies de *Pristobrycon*, *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, não sendo apresentados dados sobre *Pygopristis*. Considerando os dados ora obtidos, as espécies dos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Catoprion*, embora com algumas variações no número diplóide, mostram várias similaridades entre si. Todas apresentam cariótipos constituídos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e

acrocêntricos, divergindo assim de *C. macropomum*, com $2n=54$ cromossomos meta-submetacêntricos (Tabela 2). Da mesma forma, enquanto em *C. macropomum* os sítios de DNAr 18S estão localizados na região terminal do braço longo dos cromossomos, todas as demais espécies mostram uma localização preferencial na região telomérica do braço curto nos cromossomos subtelo-acrocêntricos, com algumas raras exceções (Tabela 2). O número e a localização dos sítios de DNAr 5S em cromossomos similares também reforçam uma maior proximidade para *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* e *Catoprion*, assim como a separação de *Colossoma* também quanto a esta característica. Assim sendo, tanto a proposta filogenética de Machado-Allison (1983) como a de Ortí *et al.* (1996) estão sendo corroboradas quanto ao distanciamento de *Colossoma* das espécies de piranhas, por várias características do cariótipo. Por sua vez, a nítida co-localização dos sítios de DNAr 5S e banda C-positiva nas espécies de *Serrasalmus* e *P. nattereri*, assim como o mesmo número diplóide ($2n=60$) dessas espécies, corroboram a maior proximidade desses dois grupos de piranhas na filogenia de Ortí *et al.* (1996).

Considerando a posição mais basal para *C. macropomum* na filogenia dos Serrasalminae (Ortí *et al.*, 1996), rearranjos cromossômicos, como fissões cêntricas, estariam associadas na diferenciação do cariótipo desse grupo, aumentando o número basal de $2n=54$ meta-submetacêntricos para $2n=58$, 60 e 62 e surgimento de cromossomos acrocêntricos. Igualmente possíveis seriam fusões cêntricas e/ou fusões em tandem a partir de cariótipos mais basais de piranhas (como o de *C. mento* e *P. striolatus*, $2n=62$), para cariótipos mais derivados (como os das espécies de *Serrasalmus*, $2n=58-60$ e de *P. nattereri*, $2n=60$), segundo a proposta de Ortí *et al.* (1996). Contudo, alterações cromossômicas adicionais, como inversões pericêntricas, necessitariam estar igualmente envolvidas, visto que os rearranjos Robertsonianos, os

quais modificam o número diplóide não explicariam, por si só, a variabilidade das fórmulas cariotípicas presentes no grupo. Da mesma forma, os sítios de RONS também passaram por modificações numéricas e de localização nos cromossomos ao longo da diferenciação cariotípica dos Serrasalminae, alterando sua posição apenas em cromossomos meta-submetacêntricos, como em *C. macropomum*, para uma localização preferencial em cromossomos subtelo-acrocêntricos nos demais gêneros estudados. Neste contexto, é possível que alguns poucos cromossomos meta-submetacêntricos portadores de DNAr 18S, detectados em *S. rhombeus*, *S. serrulatus* e *C. mento*, sejam ainda representativos da situação ancestral presente em *C. macropomum*.

Especificamente quanto aos sítios de DNAr 5S, sua localização e posição em cromossomos morfológicamente similares em todas as espécies analisadas de *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycom* e *Catoprion* sugere que, uma vez estabelecida esta localização a partir de uma condição ancestral distinta, como aquela presente em *C. macropomum*, ela se manteve conservada nesses gêneros. Em *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento* este cromossomo parece ocupar uma posição mais inicial no cariótipo, enquanto que em *Serrasalmus*, como consequência de diferenciações estabelecidas ao longo do processo evolutivo, seu provável posicionamento corresponde ao de número 7 no cariótipo. Assim sendo, o que tornaria esse cromossomo um provável marcador para o gênero *Serrasalmus* não seria basicamente a presença e a posição do DNAr 5S e a sua co-localização com um sítio de heterocromatina C-positiva, visto que estas características também são compartilhadas por espécies de outros gêneros de Serrasalminae, mas antes a posição diferenciada que ele ocupa no cariótipo desse gênero (par sete).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. J.A.S.Zuanon pelo auxílio na classificação dos exemplares e A. C. dos Santos pela sua ajuda nas figuras deste artigo. Este trabalho teve suporte do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), através do projeto institucionais PPI 2-3450, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) /Programa de apoio a Núcleos de Excelência em Ciência e Tecnologia (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) /Programa Integrado de Pesquisa e Inovação Tecnológica (PIPT) e IBAMA – Licença Nº 049/2004 e 006/2004. C.M.Nakayama recebeu bolsa de doutorado do CNPq.

Referências

As referências bibliográficas deste artigo estão reunidas no final desta tese.

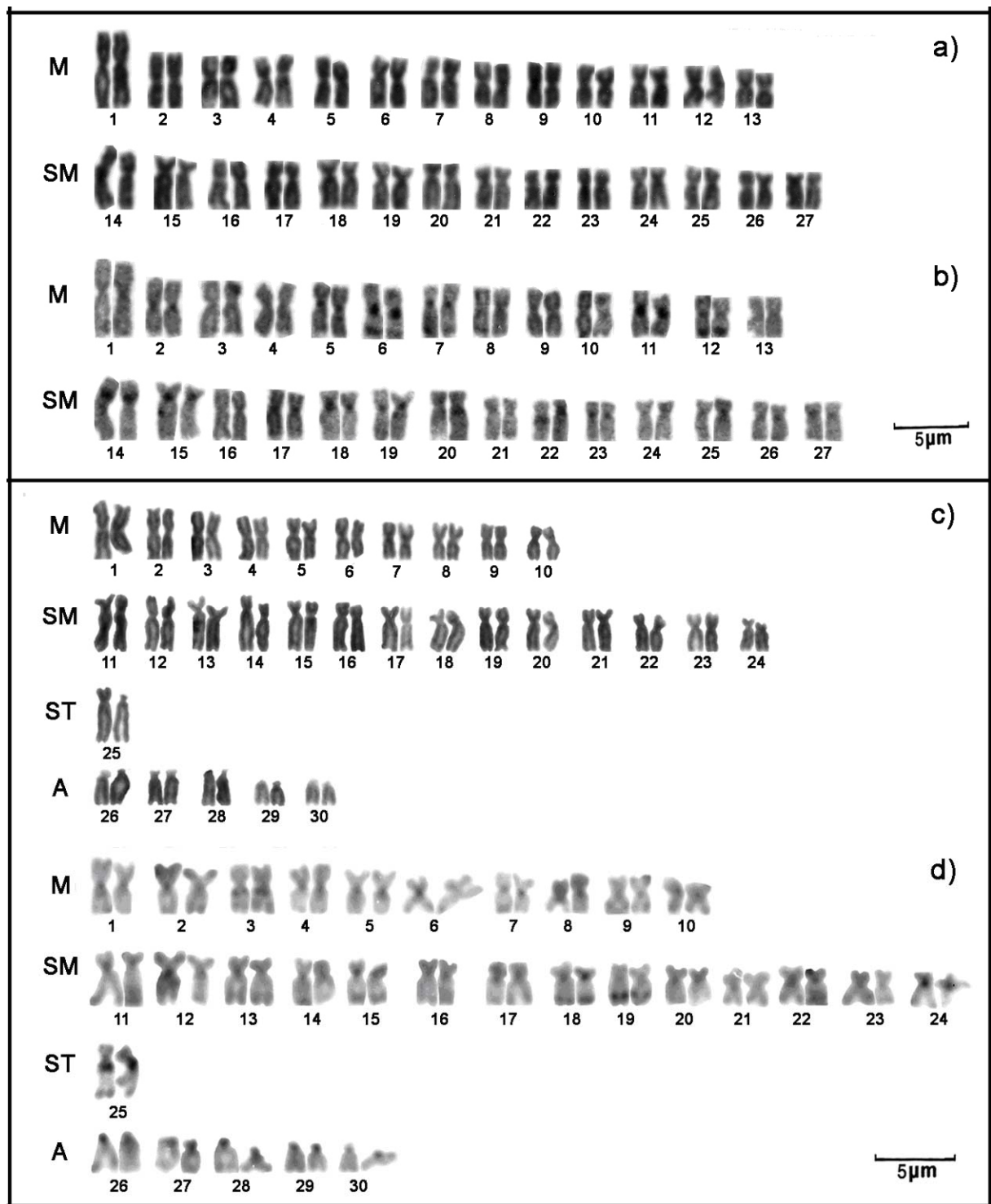


Figura 3 – Cariótipos de *Colossoma macropomum* e *Pygocentrus nattereri* com coloração Giemsa convencional (a, c) e bandamento C (b, d), respectivamente.

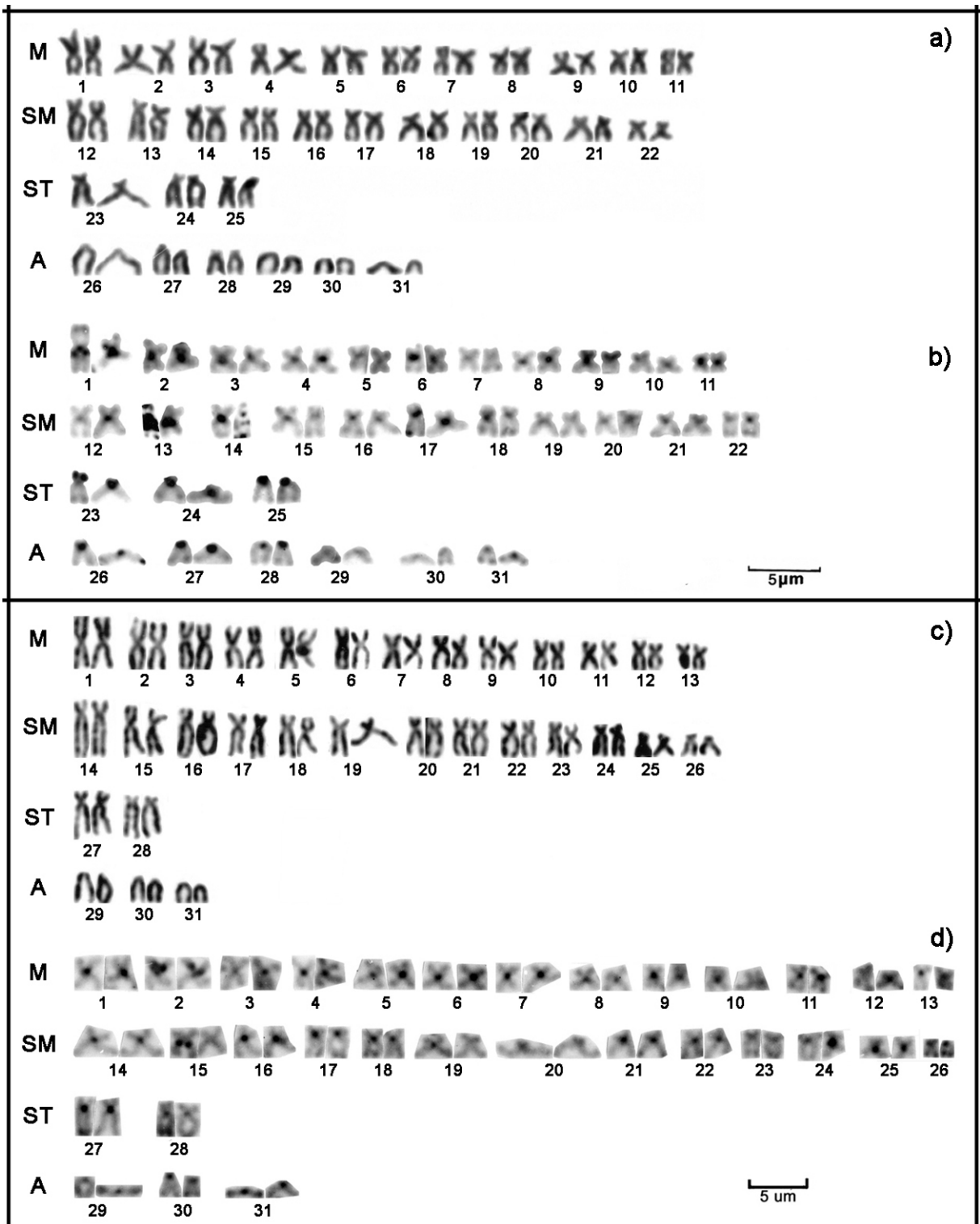


Figura 4 – Cariótipos de *Pristobrycon striolatus* e *Catoprion mento* com coloração Giemsa convencional (a, c) e bandamento C (b, d), respectivamente.

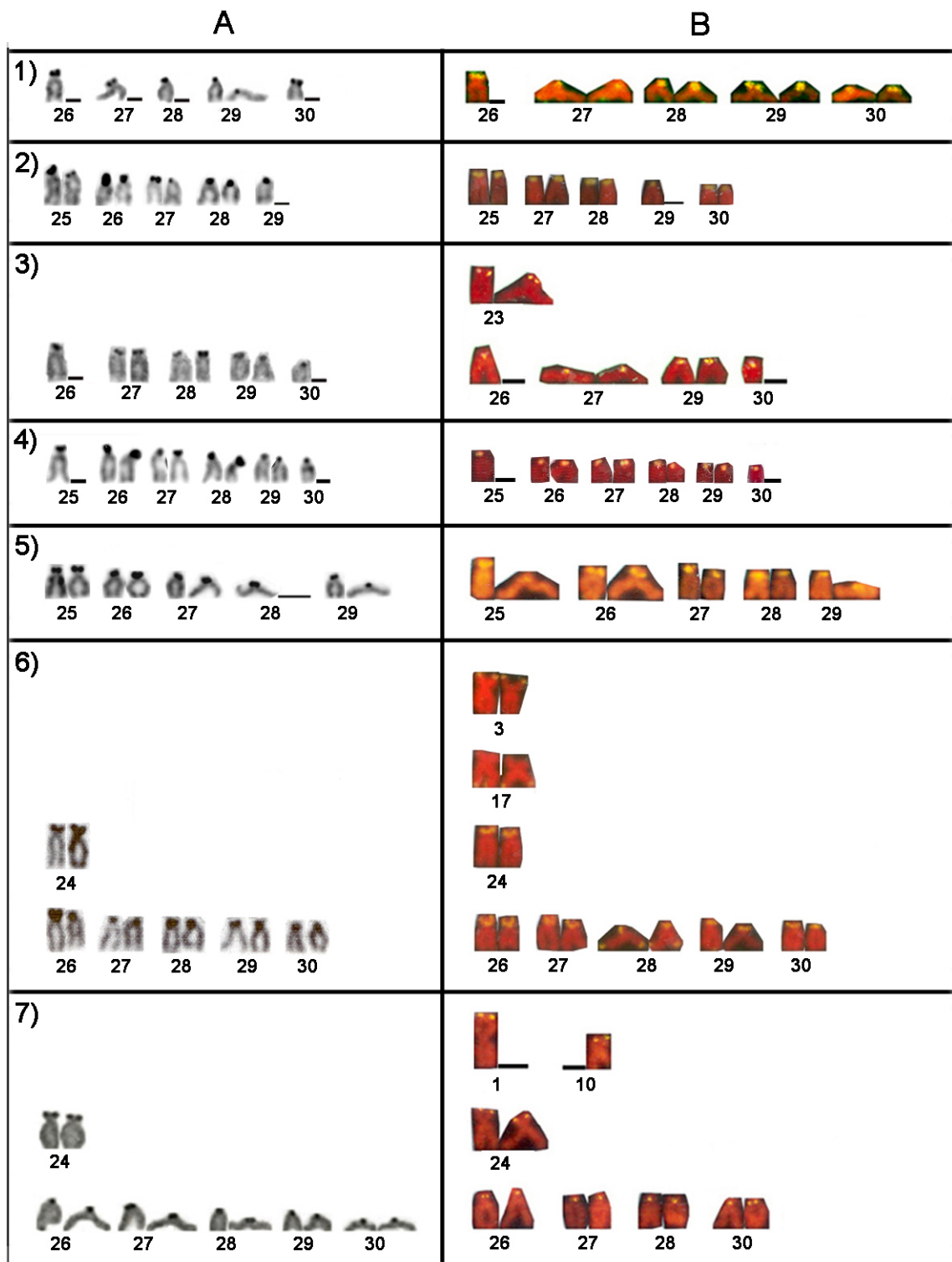


Figura 5 – Cromossomos evidenciando em (A) as Ag-RONs e em (B) os sítios de rDNA 18S. 1) *Serrasalmus altispinnis*; 2) *S. elongatus*; 3) *S. gouldingi*; 4) *S. maculatus*; 5) *S. cf. rhombeus* (2n=58); 6) *S. rhombeus* (2n=60); 7) *S. serrulatus*.

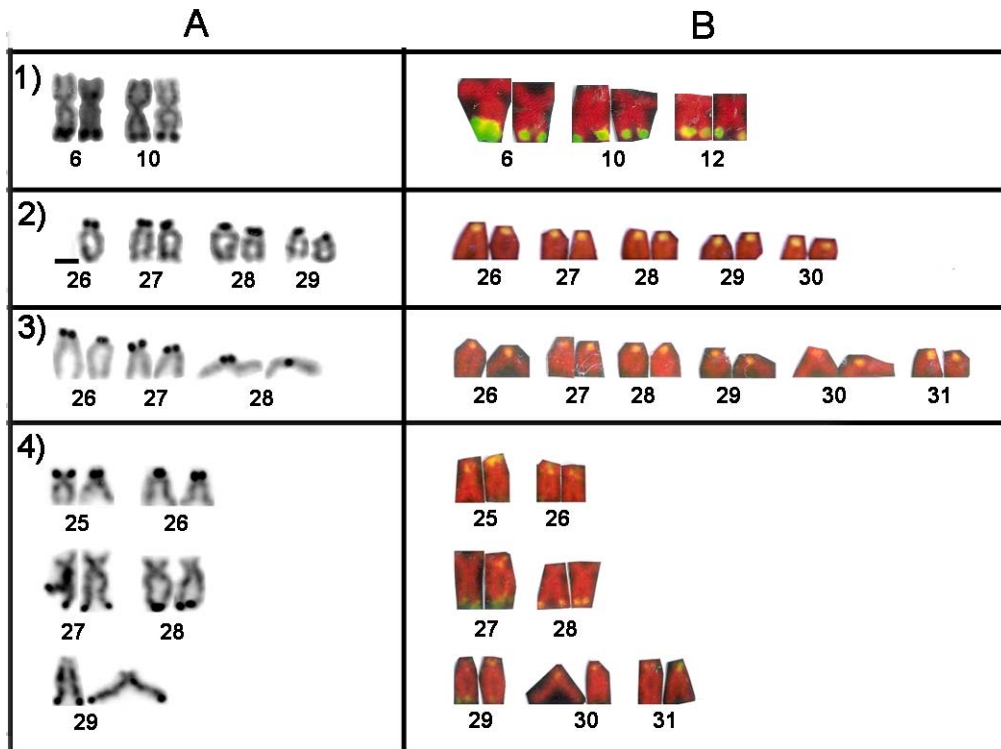


Figura 6 – Cromossomos evidenciando em (A) as Ag-RONs e em (B) os sítios de rDNA 18S. 1) *Colossoma macropomum*; 2) *Pygocentrus nattereri*; 3) *Pristobrycon striolatus*; 4) *Catoprion mento*.

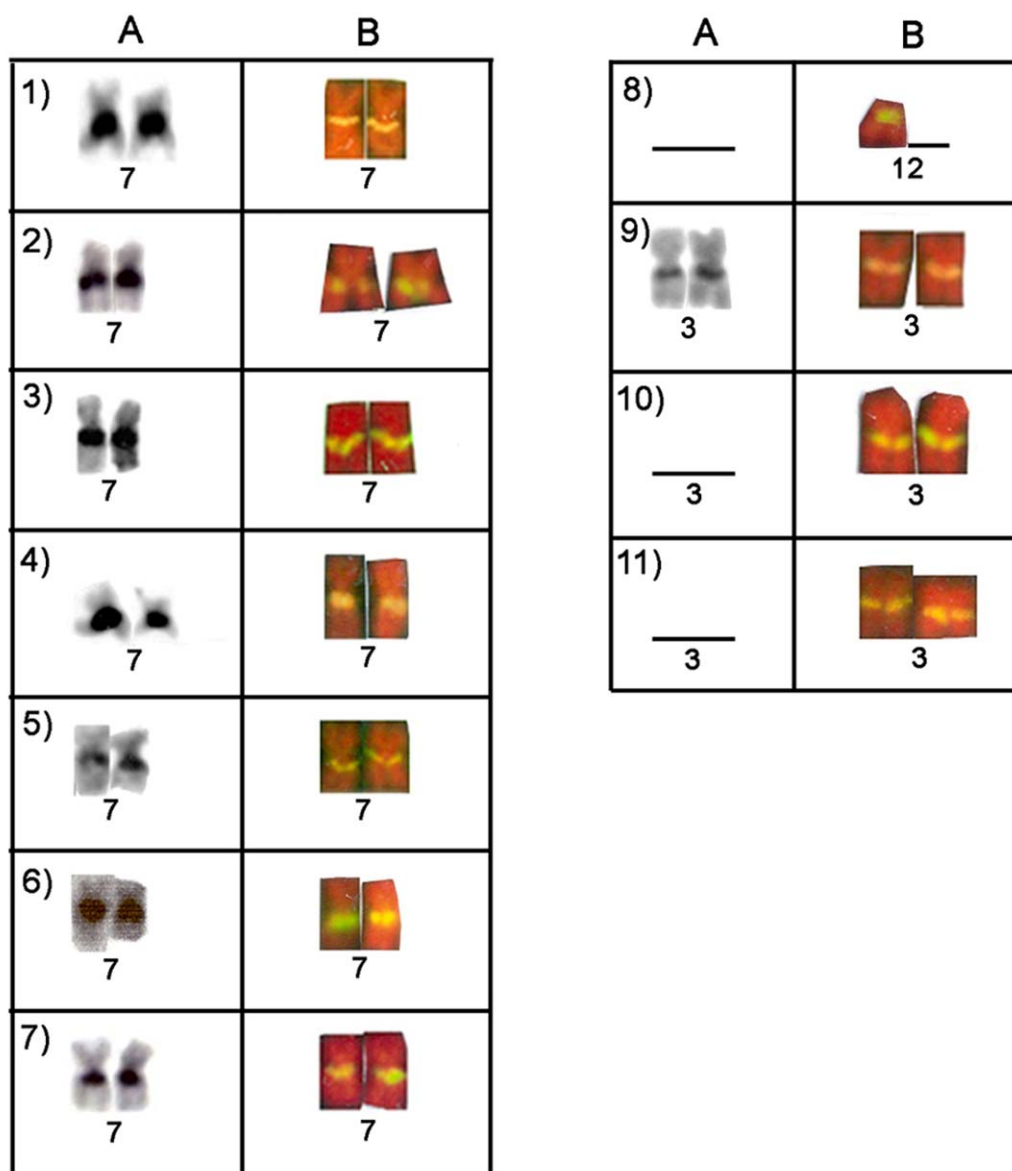


Figura 7 – A – Cromossomos evidenciando os sítios de heterocromatina C-positiva (A) e de DNAr 5S (B). 1) *Serrasalmus altispinnis*; 2) *S. elongatus*; 3) *S. gouldingi*; 4) *S. maculatus*; 5) *S. rhombeus* (2n=58); 6) *S. rhombeus* (2n=60); 7) *S. serrulatus*; 8) *Colossoma macropomum*; 9) *Pygocentrus nattereri*; 10) *Pristobrycon striolatus*; 11) *Catoprion mento*. Os números abaixo dos pares cromossômicos indicam sua posição no cariótipo das respectivas espécies. Notar a co-localização da heterocromatina e do DNAr 5S nas espécies de *Serrasalmus* e em *P. nattereri*.

Tabela 2 - Características cariotípicas das espécies de Serrasalminae estudadas.

Espécies	2n	NF	Fórmulas cariotípicas	Ag-NORs	Sítios 18S	Sítios 5S
<i>Colossoma macropomum</i>	54	108	26m+28sm	4m-sm, q, t	6m-sm, q, t	1m-sm, 12º par
<i>Serrasalmus altispinnis</i>	60	110	24m+20sm+6st+10a	6 – 10a p, t	10a p, t	2m 7º par
<i>S. elongatus</i>	60	108	22m+22sm+4st+12a	6 – 9a, p, t	9a, p, t	2m, 7º par
<i>S. gouldingi</i>	60	110	22m+22sm+6st+10a	5 – 8a, p, t	6a, p, t + 2st, p, t	2m, 7º par
<i>S. maculatus*</i>	60	108	24m+20sm+4st+12a	6 – 10a, p, t	10a, p, t	2m, 7º par
<i>S. rhombeus</i>	60	110	20m+24sm+6st+10a	5 -10a, p, t + 2st, p, t	10a, p, t + 2st, p, t + 2sm, q, t + 2m, p, t	2m, 7º par
<i>S. cf. rhombeus</i>	58	106	22m+24sm+2st+10a	5 -9a, p, t	10a, p, t	2m, 7º par
<i>S. serrulatus</i>	60	110	20m+22sm+8st+10a	4 -12st-a, p, t	8a, p, t + 2st, p, t +1m, q, t +1m, p, t	2m, 7º par
<i>Pygocentrus nattereri</i>	60	110	20m+28sm+2st+10a	5 – 7a, p, t	10a, p, t	2m, 3º par
<i>Pristobrycon striolatus</i>	62	112	22m+22sm+6st+12a	4 – 6a, p, t	12a, p, t	2m, 3º par
<i>Catoprion mento</i>	62	118	26m+26sm+4st+6a	4sm, p, t + 4st, q, t + 2a, q, t	4sm, p, t + 4st, q, t + 6a, p, t	2m, 3º par

2n= número diplóide modal, m= metacêntrico, sm=submetacêntrico, st= subteloicêntrico, a=acrocêntrico, NF= número fundamental ou número de braços, p=braço curto, q=braço longo, t=terminal, Ag-NOR=sítios de regiões organizadoras de nucléolo evidenciados pelo nitrato de prata, nº máximo de sítios de rDNA 18S evidenciados por FISH, nº máximo de sítios de rDNA 5S evidenciados por FISH. *Esta corresponde a *S. spilopleura* citótipo A de Nakayama *et al.* (2000); Centofante *et al.* (2002a).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS / CONCLUSÕES

A árvore filogenética para a subfamília Serrasalminae, proposta por Ortí *et al.* (1996), apresenta o gênero *Colossoma* como o mais basal para esta subfamília, sendo que, entre as piranhas, *Catoprion* e *P. striolatus* ocupam uma posição mais basal, sendo seguidos por outras espécies de *Pristobrycon*, *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, como os representantes mais derivados. Comparando as características do cariótipo de *C. macropomum* com aquelas das demais espécies estudadas, fica evidente que diferentes rearranjos cromossômicos ocorreram durante o processo evolutivo deste grupo de peixes. Tais rearranjos modificaram o número diplóide de $2n=54$ cromossomos meta-submetacêntricos, para $2n=62$, 60 e 58 cromossomos, com fórmulas cariotípicas diferenciadas, apresentando quantidades distintas de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos.

Especificamente no que se refere ao gênero *Serrasalmus*, os resultados ora obtidos corroboram propostas anteriormente já apresentadas de que $2n=60$ cromossomos deve ser o número diplóide basal para este gênero. À medida que novas espécies vão sendo analisadas, vão sendo também ampliados os casos de diversidade presente nos cromossomos desse grupo. Destaca-se, por exemplo, o caso de *S. maculatus*, anteriormente classificada como *S. spilopleura* (Jégu & Santos, 2001), onde um polimorfismo estrutural e diferentes citótipos foram detectados na Amazônia (Nakayama *et al.*, 2000; Centofante *et al.*, 2002a), assim como na bacia do Paraná (Cestari & Galetti Jr., 1992a). Também significativo é a evidência de um complexo de espécies presente em *S. rhombeus* (Nakayama *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006), assim como distintos cariótipos encontrados em *S. altispinnis*, considerando as regiões do médio rio Negro e do rio Pitinga - bacia do Uatumã (Nakayama *et al.*, 2002).

Outra característica marcante dos Serrasalminae é a presença de um sistema de RONS múltiplas em todas as espécies, preferencialmente localizadas na extremidade do braço curto de cromossomos subtelo-acrocêntricos, evidenciadas tanto pelo tratamento dos cromossomos com o Nitrato de Prata (Ag-RONS), como pela hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S. *C. macropomum* foi a única espécie analisada que apresentou todas as RONS situadas na região telomérica do braço longo dos cromossomos. As Ag-RONS mostraram, em geral, uma variabilidade numérica intra- e inter-individual, possivelmente decorrente da visualização apenas dos sítios que estiveram ativos na intérfase precedente à metáfase analisada (Miller *et al.*, 1976). Os sítios de DNAr 18S foram, geralmente, concordantes com as Ag-RONS, embora algumas variações numéricas e/ou de localização nos cromossomos foram também constatadas, neste caso, provavelmente, devido a problemas de natureza técnica, visto que muitos sítios de RONS nos Serrasalminae são bastante pequenos, podendo dificultar sua hibridação com a sonda correspondente, ou mesmo a sua detecção nos cromossomos.

A variabilidade observada com os genes ribossomais 18S contrastou com a estabilidade numérica e de posição nos cromossomos apresentada pelos sítios dos genes 5S, sempre presente em cromossomos metacêntricos, na região intersticial do braço longo proximal ao centrômero. *C. macropomum* diferiu também quanto à esta característica, apresentando esses sítios na região intersticial do braço curto, de um par de tamanho menor que aquele evidenciado nas demais espécies. Em todas as espécies de *Serrasalmus*, assim como em *P. nattereri*, os sítios 5S estão também co-localizados com uma banda C-positiva característica. Enquanto que em *P. nattereri*, *P. striolatus* e *C. mento* este cromossomo parece ocupar uma posição mais inicial no cariótipo, provavelmente o de número 3, em *Serrasalmus*, como

conseqüência de diferenciações estabelecidas ao longo do processo evolutivo, seu provável posicionamento corresponde ao de número 7 no cariótipo. Assim sendo, esse cromossomo pode representar um provável marcador para o gênero *Serrasalmus*, não pela presença e a posição do DNAr 5S/heterocromatina C-positiva, visto que estas características também são compartilhadas por outras espécies, mas sim pela posição particular que ele ocupa nos cariótipos desse gênero.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, somados aos já descritos na literatura, contribuem de maneira significativa para o entendimento da evolução cromossômica, taxonomia e sistemática deste grupo de peixes, uma vez que segundo Freeman *et al.* (2007), a identificação e a posição filogenética de muitas espécies ainda são problemáticas, incluindo a própria determinação do “status” do grupo como família ou subfamília.

Em resumo podemos concluir que:

- 1- A subfamília Serrasalminae pode ser caracterizada como um grupo de peixes que apresentam diversidade cariotípica tanto no número diplóide ($2n=54-62$ cromossomos) como na estrutura ($NF=106-118$) embora à primeira vista pareça tratar-se de um grupo conservado cromossomicamente.
- 2- Os Serrasalmíneos apresentam uma grande variabilidade quanto ao padrão das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), tanto quando detectadas pelo nitrato de prata (4-12) como quando detectadas pela sonda DNAr 18S (6-18).
- 3- Como na maioria dos peixes, os sítios DNAr 5S, detectados pela sonda DNAr 5S, estiveram presentes em um par cromossômico, intersticial, nos braços longos, exceto para a espécie *C. macropomum*. Estes foram coincidentes com heterocromatina em oito espécies, sendo que nas 7 espécies do gênero *Serrasalmus* ocuparam sempre o mesmo par cromossômico (7^o), o qual pode ser considerado um marcador para este gênero.
- 4- As principais mudanças cromossômicas ocorridas na evolução cariotípica dessa subfamília, parece ter sido rearranjos Robertsonianos (fissão e fusão) e não Robertsonianos, principalmente inversões pericêntricas. Translocação e/ou transposição parece ter ocorrido envolvendo os cromossomos nucleolares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1998. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. *In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Edipucrs, Porto Alegre, pp. 583-588.*
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; BERNARDINO, G.; FERRARI, W. & ALCANTARA, R.C.G. 1987. Cytogenetic studies in *Colossoma macropomum*, *Colossoma mitrei* and their interespecific hybrids. *In: Klaus Tiews, K. (ed.) **Selection, Hibridization and Genetic Engineering in Aquaculture**, v. 1, Berlin, pp. 190-195.*
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; BIGONI, A.P.; BERNARDINO, G.; FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S.A. 1996. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical bryconids. **Caryologia** 49(1): 35-43.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SILVA, M.N.P.; CARACIOLO, M.C.M.; MESQUITA, L.S.B.; FARIAS, I.P. & VAL, A.L. 1992. LDH isozymes in Amazon fish - III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminidae (Teleostei: Ostariophysi). **Comp. Biochem. Physiol.** 103B (1): 119-125.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; BIGONI, A.P.; BERNARDINO, G.; FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S.A. 1996. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical bryconids. **Caryologia** 49(1): 35-43.
- AMEMIYA, C.T. & GOLD, J.R. 1986. Chromomycin A stains nucleolus organizer regions of fishes chromosomes. **Copeia** 1: 226-231.
- AMEMIYA, C.T. & GOLD, J.R. 1988. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. **Genetica** 76: 81-90.

- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. & MOREIRA FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) **Brazil. J. Genet.** 7: 103-120.
- BOEGER, W.A. & KRITSKY, D.C. 1988. Neotropical Monogenea. 12. Dactylogyridae from *Serrasalmus nattereri* (Cypryniformes, Serrasalminae) and aspects of their morphological variation and distribution in the Brazilian Amazon. **Proc. Helminth Soc. Wash.** 55: 188-213.
- BORN, G.G. & BERTOLLO, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR bearing X chromosome. **Chrom. Res** 8: 111-118.
- BRITSKI, H.A. 1972. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. *In* **Poluição e Piscicultura**, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, pp. 79-108.
- CARVALHO, R.A. & DIAS, A.L. 2007. Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal locations of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. **Brazil. Arch. Biol. Technol.** 50(1): 141-146.
- CENTOFANTE, L.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2002a. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. **Caryologia** 55(1): 37-45.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. 2002b. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 55: 139-150.
- CESTARI, M.M. 1996. **Estudos citogenéticos e genéticos-bioquímicos em peixes do gênero *Serrasalmus*** (Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP, 232 p.

- CESTARI, M.M. & GALETTI Jr., P.M. 1992a. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia** 1: 108- 112.
- CESTARI, M.M. & GALETTI Jr., P.M. 1992b. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and citotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Brazil. J. Genet.** 15(3): 555-567.
- COSTA, J.B; BEMERGUY, R.L; HASUI, Y; BORGES, M.S. 2001. Tectonics and paleogeography along the Amazon river. **Journal of South American Earth Sciences** 14: 335-347.
- FALCÃO, J.N. & BERTOLLO, L.A.C. 1985. Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **J. Fish Biol.** 27: 603-610.
- FELDBERG, E. & BERTOLLO, L.A.C. 1985. Nucleolar organizer regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38(3-4): 319-324.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O. & SANTOS, A.F. 1987. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genome** 29(1): 1-4.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R. & BERTOLLO, L.A.C. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Brazil J Genet** 15(2): 369-383.

- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R. & BERTOLLO, L.A.C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. *In*: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (eds) **Fish Adaptation**. IBH & Oxford, New Dehli & New York, pp. 287-310.
- FERRO, D.A.M., NÉO, D.M., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62.
- FREEMAN, B.; NICO, L.; OSENTOSKI, M.; JELKS, H.L. & COLLINS, T.M. 2007. Molecular systematics of Serrasalminae deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa** 1484: 1-38.
- FORSBERG, B.R.; HASHIMOTO, Y.; ROSENQVIST, A.; MIRANDA, F.P. 2000. Tectonic fault control of wetland distributions in the Central Amazon revealed by JERS-1 radar imagery. **Quaternary International** 72: 61-66.
- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F. & YOSHIDA, M.C. 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chrom. Res.** 6: 463-471.
- GALETTI Jr., P.M. & MARTINS, C. 2004. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. *In* GUERRA, M. (ed) **FISH. Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, pp. 61-88.
- GALETTI Jr., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA FILHO, O. 1981. Karyotypic similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus* and *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Brazil. J. Genet.** 4(1): 11-15.

- GALETTI Jr., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae (Characiformes) fish on the basis of the nucleolar organizer region. **Caryologia** 37(4): 401-406.
- GALETTI Jr., P.M.; SILVA, E.B. & CERMINARO, R.T. 1985. Multiple NOR system in fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Brazil. J. Genet.** 8(3): 479-484.
- GARCIA-PARRA, W.J. 2000. **Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalminae, Characiformes) da Amazônia Central.** Tese de Doutorado. INPA/FUA. Manaus, AM. 155p.
- GAVIRIA, J.I.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A. & ESTRADA, A. 2005. Karyotype and nucleolar organizer regions of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. **Interciencia** 30(1): 44-47.
- GÉRY, J. 1972. Poissons characoides des Guyanes. I. Généralités. II. Famille Serrasalminae. **Zool. Verhand.** 122: 1-250.
- GOLD, J.R. 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. **Copeia** 1: 133-139.
- GOSLINE, W.A. 1951. Notes on the characid fishes of the subfamily Serrasalminae. **Proc. Calif. Acad. Sci.** 27(2): 17-64.
- GOULDING, M. 1980. **The Fishes and the Forest Exploration in Amazonian Natural History.** University of California Press, Berkeley. 280p.
- GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. & FERREIRA, E.G. 1988. **Rio Negro, Rich Life in Poor Water.** SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands. 200p.
- 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** 122: 239-244.

- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 3: 1014-1015.
- HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVERA, R. & RENNO, J.F. 2006. Evidence of reproductive isolation among closely related sympatric species of *Serrasalmus* (Ostariophysii, Characidae) from the upper Madeira River, Amazon, Bolívia. **J. Fish Biol.** 69: 31-51.
- JÉGU, M. 1992a. Variations du niveau marin et distribution des poissons d'eau douce en Amazonie Orientale. **Collections Colloques et Séminaires**, Editions de l'ORSTOM. p.281-297.
- JÉGU, M. 1992b. *Ossubtus xinguense* un nouveau genre et une nouvelle espèce du rio Xingu, Brésil (Teleostei; Serrasalmidae). **Ichthyol. Explor. Fresh.** 3(3): 235-252.
- JÉGU, M. 2003. Subfamily Serrasalminae (pacus and piranhas). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. & FERRARIS Jr., C.J. (eds) **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil, pp. 182-196.
- JÉGU, M. & SANTOS, G.M. 1988. Le genre *Serrasalmus* (Pisces, Serrasalmidae) dans le bas rio Tocantins (Pará, Brésil), avec la description d'une nouvelle espèce, *S. geryi*, de l'Araguaia et du Tocantins. **Rev. Hydrobiol. Trop.** 21: 239-274.
- JÉGU, M. & SANTOS, G.M. 2001. Mise au point à propos de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 et réhabilitation de *S. maculatus* Kner, 1858 (Characidae: Serrasalminae). **Cybium** 25(2): 119-143.
- JÉGU, M.; LEÃO, E.L.M. & SANTOS, G.M. 1991. *Serrasalmus compressus*, une espèce nouvelle du rio Madeira, Amazonie (Pisces: Serrasalmidae). **Ichthyol Explor Fresh** 2(2): 97-108.

- JÉGU, M.; BELMONT, E. J. & ZUANON, J. 1992. Sur la présence de *Mylesinus paraschomburgkii*. **Cybium** 16(1): 13-19.
- JESUS, C.M.; MOREIRA FILHO, O. 2003. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, Italia, 56: 281-287.
- KAVALCO, K.F. & MOREIRA-FILHO, O. 2003. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia** 56(4): 453-461.
- KRITSKY, D.C.; THATCHER, V.E. & KAYTON, R.J. 1979. Neotropical Monogenoidea. 2. The Anacanthorinae PRICE, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* MIZELLE & PRICE, 1965, from Amazon fishes. **Acta Amazonica** 9: 355-361.
- LEÃO, E.L.M.; LEITE, R.G.; CHAVES, P.T.C.; FERRAZ, E. 1991. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Raramírez, 1965 (Pisces, Serrasalmidae) do baixo rio Negro. **Ver. Brasil. Biol.** 51(3): 545-553.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- LONG, E.O. & David I.D. 1980. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Biochem.** 49: 727-764.
- LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R. & ANDRONICO, F. 1993. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome** 36: 762-773.
- MACGREGOR, H.C. 1993. **An Introduction to Animal Cytogenetics**. Chapman & Hall. 238p.

- MACHADO-ALLISON, A. 1983. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte II. Discussion sobre la condicion monofiletica de la subfamilia. **Acta Biol. Venez.** 11(4): 145-195.
- MACHADO-ALLISON, A. 1985. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae. Parte III: sobre el estatus genérico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei Characidae, Serrasalminae). **Acta Biol. Venez.** 12(1): 19-42.
- MACHADO-ALLISON, A. & FINK, W.L. 1995. **Sinopsis de las Especies de la Subfamilia Serrasalminae Presentes en la Cuenca del Orinoco. Serie Peces de Venezuela.** Faculdade de Ciências, Instituto de Zoologia Tropical, Museu de Biologia. 87p.
- MACHADO-ALLISON, A. & FINK, W.L. 1996. **Los Peces Caribes de Venezuela: Diagnosis, Claves, Aspectos Ecologicos y Evolutivos.** Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Colección monografía. 52p.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109: 161-168.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genética** 123: 211-216.

- MARKOVA, B.A.; MIRONOVA, R.S.; GRANTCHAROVA, M.L.; GLORGIEV, O.G. & SEMIONOV, E.P. 1997. Complex alteration of the ribosomal gene spacers in mutant of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma** 106: 361-368.
- MARTÍNEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, S. & PENDÁS, A.M. 1996. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenet. Cell Genet.** 73: 149-152.
- MARTINS, C. & GALETTI, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chrom. Res.** 7: 363-367.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr, P.M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) Chromosomes. **Chrom. Res.** 8: 353-355.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr, P.M. 2001a. Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome** 44: 903-910.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr., P.M. 2001b. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica** 111: 439-446.
- MARTINS, C. & WASKO, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In WILLIAMS, C.R. (ed.). **Focus Genome Research**, Nova Science Publishers, New York, pp. 335-363.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P. & WRIGHT J.M. 2000. Nucleotide sequences of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas** 133: 39-46.
- MARTINS, C.; FERREIRA, I.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. & GALETTI Jr., P.M. 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** 127: 133-141.

- MARTINS-SANTOS, I.C.; JULIO Jr., H.F. & SANTOS, S.J. 1994. Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná River. **Caryologia** 59: 175-181.
- MILLER, D.A.; DEVI, V.G.; TANTRAVAHU, R. & MILLER, O.J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. **Exp. Cell Res.** 101: 235-243.
- MIZELLE, J.D. & PRICE, C.E. 1965. Studies on monogenetic trematodes. XXVIII. Gills parasites of the piranha with the proposal of *Anacanthorus* gen. **J. Parasitol.** 51: 30-36.
- MÓRAN, P.; MARTINEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. & PENDÁS, A.M. 1996. Sex lineage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenet. Cell Genet.** 75: 145-150.
- MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. & GALETTI Jr. P.M. 1985. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) **Caryologia** 38(1): 47-55.
- MÜLLER, A.J. & CARVALHO, A.S. 2005. Uso de produtos CERBS para o zoneamento geoambiental de Presidente Figueiredo, no Amazonas. **XII Simpósio de Sensoriamento Remoto**, Goiás, Brasil, pp. 1-9.
- MURAKAMI, M. & FUTJITANI, H. 1998. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). **Genes Genet. Syst.** 73: 9-20.
- NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2000. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopreura* Kner, 1958 (Characiformes, Serrasalmidae) na região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica** 30(1): 149-154.

- NAKAYAMA, C.M.; JÉGU, M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* group (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia** 2001(3): 866-869.
- NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2002. A comparative cytogenetic study of five piranhas species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica** 114: 231-236.
- NELSON, E.M. 1961. The swimbladder in the Serrasalminae with notes on additional morphological features. **Fieldiana (Zoology)** 39 (56): 603-624.
- NIRCHIO, M.; FENOCCHIO, A.S.; SWARÇA, A.C.; PÉREZ, J.E.; GRANADO, A.; ESTRADA, A. & RON, E. 2003. Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) and *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Caryologia** 56(4): 405-411.
- NOGUEIRA, A.C.R. & SARGES, R.R. 2001. Characterization and genesis of waterfalls of the Presidente Figueiredo region, northeast State of Amazonas, Brazil. **An. Acad. Bras. Cien.** 73(2): 287-301.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. 1988. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia** 41:227-236.
- ORTÍ, G.; PETRY, P.; PORTO, J.I.R.; JÉGU, M. & MEYER, A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **J. Mol. Evol.** 42: 169-182.
- PAULS, E. 1985. **Considerações sobre a evolução cromossômica e sistema de cromossomos supranumerários em espécies do gênero *Prochilodus***

- (Pisces, Prochilodontidae).** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP. 156p.
- 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.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P. & GARCÍA-VÁZQUEZ, E. 1993. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet. Cell Genet.** 63: 123-130.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; FREIRE, J.P. & GARCÍA-VÁZQUEZ, E. 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S r DNA. **Cytogenet. Cell Genet.** 67: 31-36.
- PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L. & GARCIA-VÁZQUEZ, E. 1995. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Mol Ecol.** 4: 275-276.
- PHILLIPS, R. & IHSEN, P.E. 1985. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet. Cell Genet.** 39: 14-18.
- PINKEL, D.; STRAUME, T. & GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 2934-2938.
- PORTO, J.I.R. 1999. **Análises cariotípicas e seqüenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da bacia amazônica.** Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas. 120pp.

- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M. & JÉGU, M. 1989. Análise cariotípica na família Serrasalminidae (Ostariophysi, Characiformes): Aspectos evolutivos. **Ciê. Cult.** (supl.) 41: 714.
- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M.; MAIA, R.O. & JÉGU, M. 1991. Cytotaxonomic analysis in the Serrasalminidae (Ostariophysi, Characiformes). **Seventh International Ichthyology Congress**: 66.
- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M. & FALCÃO, J.N. 1992. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Rev. Hydrobiol. Trop.** 25(4): 287-299.
- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; FALCÃO, J.N. & NAKAYAMA, C.M. 1993. Cytogenetic studies in Hemiodidae (Ostariophysi, Characiformes) fishes from the Central Amazon. **Cytologia** 58: 397-402.
- RIVERA-LEÓN, R. & GERBI, S.A. 1997. The localization of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplete early pre rRNAs. **Chromosoma** 105: 506-514.
- SANTOS, A.C. 2006. **Caracterização cromossômica de espécies de acarás da subfamília Cichlasomatinae (Perciformes: Cichlidae) da Amazônia Central.** Dissertação de mestrado. INPA/ UFAM. Manaus, AM. 72pp.
- SAJDAK, S.L.; REED, K.M. & PHILIPS, R.B. 1998. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **J. Biol. Evol.** 46: 680-688.
- SCHMID, M.; VITELLI, I. & BATISTONE, R. 1987. Chromosome banding in Amphibia. IV Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma** 95: 271-284.

- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.** 75: 304-306.
- SUZUKI, H.; MORIWAKI, K. & SAKURAI, S. 1994. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. **Mol. Biol. Evol.** 11: 704-710.
- SUZUKI, H.; SAKURAI, S. & MATSUDA, Y. 1996. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet. Cell Genet.** 72: 1-4.
- THATCHER, V.E. 1991. Amazon fish parasites. **Amazoniana** 11(3/4): 263-572.
- TEIXEIRA, A.S.; NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2006. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766) from lake Catalão. **Genet. Mol. Biol.** 29(3): 498-502.
- VENERE, P.C. & GALETTI, P.M. 1989. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Brazil. J. Genet.** 12(1): 17-25.
- VICENTE, V.E.; JESUS, C.M. & MOREIRA-FILHO, O. 2001. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 54: 365-369.
- VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I. & BARSACCHI-PILONE, G. 1982. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. **Chromosoma** 84: 475-491.
- WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M. & GALETTI, P.M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome** 44: 893-902.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* **PCR Protocols:**

a Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc, New York, pp. 315-322.