

ESTUDOS CARIOTÍPICOS DE PEIXES DA FAMÍLIA SCIAENIDAE (TELEOSTEI PERCIFORMES) DA REGIÃO DE CANANÉIA, SP, BRASIL. 1. SOBRE O CARIÓTIPO DE *MICROPOGONIAS FURNIERI* (DESMAREST, 1823)\*

Vicente GOMES\*\*, Anna Emília A. de M. VAZZOLER\*\*\* & PHAN Van Ngan

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

### Synopsis

*The chromosomes of Micropogonias furnieri was studied. The diploid number is 48 acrocentric chromosomes and the haploid number is 24. The diploid DNA content of blood cell nucleus was measured. C- and G-banding techniques were tried.*

Descriptors: Cytology, Genetics, Chromosomes, Karyotypes, Marine fishes, Sciaenidae, *Micropogonias furnieri*, Cananéia - SP.

Descritores: Citologia, Genética, Cromossomos, Cariótipos, Peixes marinhos, Sciaenidae, *Micropogonias furnieri*, Cananéia - SP.

### Introdução

No Atlântico Oeste, a família Sciaenidae compreende 21 gêneros e 56 espécies (Chao, 1978). Nos mares brasileiros, Travassos & Paiva (1957) registraram a ocorrência de 15 gêneros e 34 espécies de peixes dessa família, uma das predominantes na plataforma continental sul brasileira, tanto pela abundância quanto pelo número de espécies.

A espécie de Sciaenidae mais estudada no Brasil é *Micropogonias furnieri* (Vazzoler, 1971; Vazzoler, G., 1975). Vazzoler (1971), estudando *M. furnieri* sob o ponto de vista de estrutura da espécie, analisou variações de caracteres merísticos, proporções corporais e aspectos de crescimento e reprodução, chegando à conclusão de que na costa brasileira compreendida entre 23°S e 33°S, a espécie se divide em duas populações, com possível isolamento reprodutivo. A que ocupa a área entre 23°S e 29°S foi denominada pela autora de população I e a que ocupa a área entre 29°S e 33°S, de população II. Tentando confirmar a hipótese de que as duas populações apresentam isolamento reprodutivo e avaliar a taxa de fluxo gênico entre ambas, realizou-se estudos de marcadores gené-

ticos por métodos eletroforéticos (Vazzoler *et al.*, 1971; Phan *et al.*, 1977; Suzuki, 1980) e imunológicos (Phan & Vazzoler, 1976).

No que se refere à família como um todo, os extensos estudos realizados por Chao (1978) permitiram o estabelecimento de relações filogenéticas entre diversos gêneros e supragêneros, com base na morfologia da bexiga natatória, morfologia externa e padrões de calcificação dos otólitos.

Por outro lado, o estudo cariotípico tem se mostrado útil à sistemática no estabelecimento de relações evolutivas entre espécies e populações, além de outras aplicações como no melhoramento genético. As alterações que os cariótipos sofreram durante a evolução e a relação destas alterações com a especiação têm sido extensamente estudadas (Denton, 1973). A relativa simplicidade metodológica, o baixo custo dos materiais necessários, as possibilidades de aplicação de algumas técnicas, inclusive em trabalhos de campo, e, principalmente, a diversidade de aplicações do estudo cariotípico são alguns dos fatores que incentivam as investigações nesse campo. As recentes técnicas de bandamento cromossômico vieram acrescentar dados de grande importância à citogenética e, no caso de peixes, alguns autores as empregaram com sucesso (Howell & Bloom, 1973; Thorgaard, 1976; Toledo, 1978).

De um modo geral, peixes marinhos têm recebido menor atenção dos citogeneticistas que os de água doce (LeGrande, 1975). No Brasil, estão em andamento estudos citogenéticos sobre peixes de água doce, como os citados na revisão de

(\*) Trabalho realizado com apoio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 74/816 e Proc. 77/0497).

(\*\*) Aluno de Pós-Graduação do IOUSP.

(\*\*\*) Atualmente no INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Galetti Jr (1979), mas não foi encontrado trabalho algum sobre cariotipagem de peixes dos mares brasileiros.

Em relação à família Sciaenidae, a ausência de dados citogenéticos é quase total, tendo sido determinado apenas o conteúdo de DNA para algumas espécies (Hinegardner & Rosen, 1972).

Estes estudos foram iniciados com *M. furnieri*, devido à escassez de dados citogenéticos sobre a família a que pertence e, sobretudo, por ter sido estudada no Brasil sob diferentes aspectos. Os dados citogenéticos virão acrescentar novos subsídios aos dados existentes.

Neste trabalho, realizou-se preparações de cromossomos metafásicos mitóticos e meióticos e ensaios de bandamento C e G, para estabelecer as características cromossômicas de *M. furnieri*.

### Material e métodos

Foram utilizados 27 indivíduos de *M. furnieri*, dos quais 16 eram fêmeas e 11 machos. Os peixes foram coletados no litoral sul do Estado de São Paulo, na região estuarino-lagunar de Cananéia (25°01'S).

Os peixes foram injetados intraperitonealmente com solução aquosa de colchicina a 0,5%, na proporção de 0,2 ml por 100 g de peso do animal, e mantidos em tanques com água do mar corrente por 6 horas, sendo então sacrificados.

Os cromossomos metafásicos mitóticos foram obtidos do rim pelo método de *air-drying*, modificado do de LeGrande & Fitzsimous (1976). O procedimento foi basicamente o seguinte: os tecidos foram picados em tubo de ensaio e hipotonizados em 10 ml de citrato de sódio a 0,45% por 25 min; durante a hipotonização, a suspensão foi aspirada e expirada suavemente com pipeta Pasteur. Passado esse período, a suspensão foi transferida para outro tubo de ensaio, descartando-se os pedaços remanescentes de tecido e, então, centrifugada a 1500 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, o precipitado celular obtido, suspenso em 10 ml de fixador Carnoy, recém-preparado com metanol e ácido acético na proporção 3:1, deixando-se fixar por 30 min. Essa suspensão foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 10 ml de Carnoy. Repetiu-se essa lavagem do material por três vezes. Após a última lavagem, deixou-se restar no tubo de ensaio

0,5 ml do sobrenadante, no qual o precipitado foi ressuscitado. Dessa suspensão final, foram pingadas algumas gotas sobre lâmina previamente resfriada, ateando-se fogo sobre ela ou deixando-a secar sob calor moderado.

Os cromossomos metafásicos meióticos foram obtidos de testículos, pelo método de Oyhenart-Perera *et al.* (1975) modificado. Os testículos foram fragmentados em cerca de 2 mm e hipotonizados em solução de citrato de sódio 0,9% por 20 min, mantendo-se o volume aproximadamente na proporção 20:1 fluido:tecido. Foram, então, fixados em Carnoy por 30 min e transferidos para 0,5 ml de ácido acético 60%, em tubo de aglutinação. Após cerca de 3 min, a suspensão foi aspirada com capilar de microematócrito acoplado a um tudo de borracha e transferida para lâmina, a 60°C. A gota foi reaspirada rapidamente, repetindo-se a operação duas a três vezes por lâmina, em lugares distintos.

As preparações mitóticas e meióticas foram coradas em Giemsa diluído na proporção 1:10 em tampão fosfato, pH 7,0, por 30 min, lavadas em água destilada e montadas em Permount.

Para os ensaios de bandamento C, aplicou-se a técnica de Sumner (1972). As lâminas foram tratadas em solução aquosa de Ba(OH)<sub>2</sub> a 5%, por 1 min e 30 seg, a 50°C. A seguir, foram lavadas em água deionizada, incubadas em 2SSC, pH 7,0, a 60°C, por 1 hora, novamente lavadas e coradas em Giemsa 2% em tampão fosfato, pH 6,8, por 1 hora e 30 min. As lâminas foram lavadas e montadas em Permount, após secagem.

Para os ensaios de bandamento G, aplicou-se o método de Seabright (1972), modificado por Stocco (com. pessoal\*). As lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina (1:250) a 0,02%, em tampão fosfato, pH 6,8, a 4°C, por 3 min e 30 seg. Foram, então, lavadas em água destilada, coradas em Giemsa 3%, em tampão fosfato, pH 6,8, por 12 a 13 min, novamente lavadas e montadas em Permount, depois de secas.

Os valores de conteúdo diplóide de DNA de eritrócitos foram obtidos pelo método de citofotometria de varredura (Soma *et al.*, 1975).

As medidas cromossômicas foram realizadas na própria fotografia em 20 metá-

(\*) Stocco, R. de C. - Instituto Butantã, SP, 1980.

fases mitóticas, sendo 10 de machos e 10 de fêmeas, no seguinte modo: o maior par de cromossomos foi medido ao microscópio com ocular micrométrica (Wild 15 X SK), sendo realizada uma correlação entre essa medida e a do mesmo par de cromossomos em uma ampliação fotográfica. As medidas dos demais pares foram tomadas na própria fotografia, tendo como escala a correlação estabelecida (Denton, 1973).

Estabeleceu-se os valores haplóide e diplóide e os cromossomos foram pareados e dispostos em ordem decrescente de tamanho, com base nas medidas e ajuste visual.

A nomenclatura dos cromossomos seguiu a proposta por Levan *et al.* (1964).

**Resultados**

A Tabela 1 mostra a variação encontrada nas contagens do número de cromossomos em metáfases mitóticas de machos e fêmeas de *M. furnieri* e do número de cromossomos em metáfases meióticas de machos de *M. furnieri*. O número diplóide, para ambos os sexos, foi igual a 48 cromossomos, representando 78,5% das contagens para machos e 79,9% das contagens para fêmeas. O número haplóide foi igual a 24 cromossomos ou bivalentes, representando 88,9% das contagens.

Na Figura 1 estão os cariótipos para machos e fêmeas, montados em ordem decrescente de tamanho. Os 48 cromossomos são do tipo t, ou seja, acrocêntricos. O tamanho dos cromossomos decresce gradualmente. O comprimento total dos cromossomos metafásicos em contração média, variou de 3,38 µm a 1,49 µm, do maior para o menor par. Por comprimento total, considerou-se a média das duas cromátides. No maior par de homólogos, existe uma constricção secundária na região

proximal ao centrômero. O comprimento total do lote haplóide, ou seja, a soma dos valores médios de cada par, foi de 59,27 µm.

O conteúdo diplóide de DNA dos eritrócitos foi de 1,24 ± 0,01 picogramas por célula.

Na Figura 2a, está o cariótipo *M. furnieri*, mostrando bandas C, podendo-se perceber a presença de heterocromatina nas regiões centroméricas dos cromossomos, variando em intensidade em cada par. Alguns pares apresentam heterocromatina intercalares e telomérica, evidenciadas nas melhores metáfases. Na Figura 2b,



Fig. 1. Cariótipos de fêmeas e macho de *Micropogonias furnieri*. Os cromossomos foram montados em ordem decrescente de tamanho. As flechas indicam a constricção secundária na região proximal ao centrômero, do primeiro par.

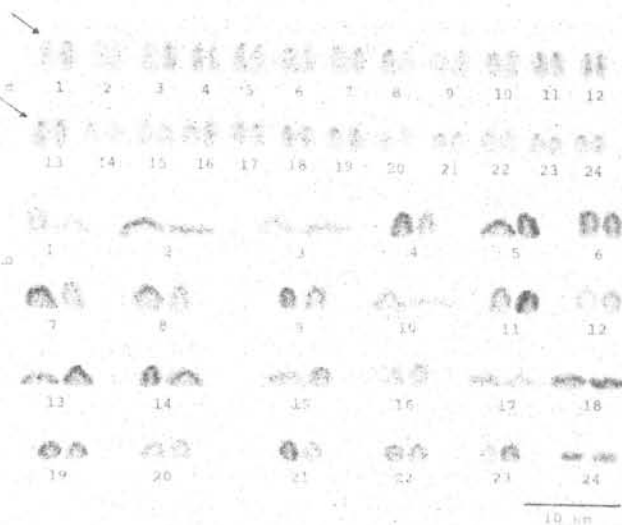


Fig. 2. Cariótipos de *M. furnieri* mostrando bandas C (em A) e bandas G (em B). Setas indicam bandas C intercalares e teloméricas identificadas nas melhores metáfases.

Tabela 1. Contagem dos números de cromossomos em metáfases diplóides (2n) obtidas de rim de machos e fêmeas e dos números de cromossomos em metáfases haplóides (n) de testículos de *M. furnieri*

SEXO	NÚMERO DE PEIXES	NÚMERO DE CROMOSSOMOS											TOTAL DE CÉLULAS	
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
(2n)	M	9		1	2	1	4	3	1	5	2	2	2	65
	F	16						12	13	13	2	1	164	
(n)	M	2	1	1	16								18	

M = machos  
F = fêmeas

está o cariótipo de *M. furnieri*, mostrando bandas G em alguns cromossomos. Nesse caso, além da marcação incipiente dos braços cromossômicos, a região centromérica também apresenta-se marcada.

Não foram constatadas diferenças cromossômicas entre os sexos.

### Discussão

Para a preparação dos cromossomos metafásicos mitóticos, foi necessário realizar uma grande série de testes. Empregou-se, tentativamente, diversas técnicas de preparação dos tecidos, sendo que somente pela de *air-drying* conseguiu-se obter cromossomos espalhados em um só plano focal. O método empregado resultou de um estudo empírico detalhado para estabelecer as condições ótimas de concentração e quantidade da solução de colchicina, tempo de incubação da droga antes do sacrifício do animal, de concentração da solução e tempo de hipotonização, tempo de fixação no Carnoy, velocidade e tempo de centrifugação, e de outros detalhes da técnica adaptada da de LeGrande & Fitzsimous (1976), para a espécie com a qual se trabalhou neste estudo.

*M. furnieri* possui 48 cromossomos tipo t e conteúdo diplóide de DNA de  $1,24 \pm 0,01$  picogramas. Apesar da grande variabilidade encontrada nos cromossomos de peixes, análises comparativas dos cariótipos e conteúdo de DNA de vertebrados levaram diversos autores a concordarem que o complemento diplóide do "vertebrado ancestral" seria de  $2n = 48$  cromossomos tipo t, com conteúdo de DNA em torno de 20% de 7,0 picogramas, que é o valor encontrado nos mamíferos placentários. Os peixes Perciformes, de um modo geral, teriam mantido o número diplóide original, aumentando ligeiramente o conteúdo de DNA, o que coloca *M. furnieri* dentro do padrão encontrado para grande parte dos Perciformes. Hinegardner & Rosen (1972) apresentaram medidas de conteúdo haplóide de DNA para 275 espécies de teleosteos, incluindo 5 espécies de Sciaenidae, cujos valores variaram de 0,76 a 0,98 picogramas. Taylor (1967) dividiu os teleosteos em dois grupos, quanto ao conteúdo haplóide de DNA: um, mais primitivo, variando de 4,4 a 1,2 picogramas e, outro, mais evoluído, entre 0,8 e 0,45 picogramas. Nesse segundo grupo estaria incluída *M. furnieri*, cujo valor encaixa-se no en-

contrado por Hinegardner & Rosen (1972) para outras espécies da família.

O exame das metafases testiculares revelou que o número haplóide é igual a 24, o que está de acordo com o número diplóide igual a 48.

No caso de espécies com cromossomos pequenos e semelhantes, a aplicação de técnicas de bandamento poderiam revelar diferenças não observáveis pela cariotipagem convencional, auxiliando, também, na identificação dos homólogos. Aplicou-se aos cromossomos de *M. furnieri* a técnica de bandamento de Seabright (1972) em vários ensaios, utilizando-se diversas concentrações da solução de tripsina e tempos de permanência das lâminas na mesma, bem como tempos de coloração no Giemsa. Apesar da obtenção de marcação incipiente dos cromossomos pelo procedimento descrito de bandamento G, um padrão de bandas não foi observado. Foram poucos os autores que obtiveram padrão nítido de bandas G em peixes, mas, pelos dados existentes, corroborados pelos aqui apresentados, seria necessário um aprimoramento dessa técnica para peixes (Bertollo, 1978). Pela aplicação da técnica de bandamento G, pode-se ressaltar a posição da constricção secundária do 1º par de homólogos, além da possível presença de heterocromatina G positiva na região pericentromérica. Sites *et al.* (1979), estudando três gêneros de tartarugas Kinosternidae, encontraram heterocromatina G positiva na região centromérica de alguns pares de homólogos.

Para os ensaios de bandamento C, empregou-se a técnica de Sumner (1972), eliminando-se a passagem pela solução de HCl 0,2N, que, no caso de *M. furnieri*, parecia enfraquecer a coloração dos cromossomos, diminuindo a nitidez das bandas. As regiões marcadas, pela técnica descrita, são quase que exclusivamente as pericentroméricas. Nas melhores metafases, pôde-se perceber a presença de bandas intercalares e teloméricas em alguns pares. Os dados existentes na literatura parecem indicar que esse tipo de banda pode ser conseguido em peixes, com relativa facilidade, ao contrário do que ocorre com bandas G (Toledo, 1978). O estudo aprofundado das técnicas de bandamento em peixes é de grande importância para o desenvolvimento da citogenética desses animais.

A continuação dos estudos cariotípicos da família Sciaenidae seria de grande interesse, para verificar, de maneira ampla, o comportamento dos cariótipos nesse grupo. Requer-se, também, a ampliação desses estudos a outras famílias de peixes marinhos do Brasil, onde a absoluta falta de dados citogenéticos constitui uma lacuna a ser preenchida.

### Conclusões

Por este trabalho, chegou-se às seguintes conclusões:

1. O cariótipo de *M. furnieri* apresenta número diplóide igual a 48 cromossomos acrocêntricos, os quais decrescem gradualmente de tamanho de 3,38  $\mu\text{m}$  a 1,49  $\mu\text{m}$ , em média;
2. O primeiro par de homólogos possui uma constricção secundária, localizada na região proximal ao centrômero;
3. O conteúdo diplóide de DNA, por célula, foi de  $1,24 \pm 0,01$  picogramas;
4. Não foi possível estabelecer um padrão nítido de bandas G para *M. furnieri*, mas a aplicação da técnica tornou possível a identificação de alguns pares adjacentes e facilitou a visualização da constricção secundária;
5. Bandas C localizam-se, principalmente, nas regiões pericentroméricas dos cromossomos. Bandas intercalares e teloméricas puderam ser visualizadas em alguns pares, nas melhores metafases, e
6. Não foram constatadas diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas.

### Resumo

Estudou-se o cariótipo de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), peixe teleosteo da família Sciaenidae, coletado, na região estuarino-lagunar de Cananãia, SP, Brasil. Foram realizadas preparações de cromossomos mitóticos e meióticos e ensaios de bandamento C e G. O número diplóide encontrado para a espécie foi de  $2n = 48$  cromossomos tipo t (acrocêntricos), cujos tamanhos variaram entre 3,38  $\mu\text{m}$  e 1,49  $\mu\text{m}$ . O 1º par de homólogos apresenta uma constricção secundária na região proximal ao centrômero. O número haplóide encontrado foi de  $n = 24$ . O conteúdo diplóide de DNA

foi de  $1,24 \pm 0,01$  picogramas/célula. Não se obteve padrão de bandas G, mas a aplicação da técnica facilitou a identificação de pares adjacentes e a visualização da constricção secundária. Bandas C localizam-se, principalmente, na região pericentromérica.

### Agradecimentos

Expressamos nossos agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo concedida a Vicente Gomes (Proc. 77/0497). À Lic. Rita de Cássia Stocco, do Instituto Butantã, pelo auxílio nas técnicas de bandamento. Ao Dr Mithitaka Soma, do Instituto Butantã, pelas medidas de conteúdo de DNA. À MSc. Hana Suzuki, pelo auxílio durante o trabalho.

### Referências bibliográficas

- BERTOLLO, L. A. C. 1978. Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces - Erythrinidae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 164p.
- CHAO, L. N. 1978. A basis for classifying western Atlantic Sciaenidae (Teleostei, Perciformes). NOAA Tech. Rep. NMFS Circ., (415):1-61.
- DENTON, T. E. 1973. Fish chromosome methodology. Illinois, Charles C. Thomas, 166p.
- GALETTI Jr, P. M. 1979. Estudos citogenéticos na família Anostomidae do rio Mogi-Guaçu (SP) (Pisces - Teleostei). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Ciências Biológicas, 153p.
- HINEGARDNER, R. & ROSEN, D. E. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. Am. Nat., 106:621-644.
- HOWELL, W. M. & BLOOM, S. E. 1973. Sex-associated differential fluorescence of mudminnow chromosomes and spermatozoa. Nature, Lond., 245(5):261-263.
- LEGRANDE, W. H. 1975. Karyology of six species of Louisiana flat fishes

- (Pleuronectiformes, Osteichthyes). *Copeia*, (3):516-530.
- LeGrande, W. H. & FITZSIMOUS, J. M. . 1976. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *M. cephalus* (Perciformes: Mugilidae) from Louisiana. *Copeia*, (2):338-391.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- OYHENART-PERERA, M. F.; LUENGO, J. A. & BRUM-ZORRILLA, N. 1975. Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) y *Crenicilha sexatilis* (Linn.) (Teleostei, Cichlidae). *Revta Biol. Uruguay*, 3(1):29-36.
- PHAN V. N. & VAZZOLER, A. E. A. de M. 1976. Serological and biochemical studies on population of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1822) and *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) between Cabo Frio (23°S) and Chuí (33°44'S), Brazil. *Revue Trav. Inst. Pêches marit.*, 40(3/4):681-682.
- 
- & PARDO, W. M. 1977. *Micropogon furnieri*. II. Estudos dos padrões eletroforéticos de proteínas totais de cristalinos da população I (Cabo Frio-Torres). *Ciênc. Cult.*, S Paulo, 29(7, supl.):539.
- SEABRIGHT, M. 1972. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma*, 36:204-210.
- SITES, J. W.; BICKHAM, J. W.; HAIDUK, M. W. & IVERSON, J. B. 1979. Banded karyotypes of six taxa of kinosternid turtles. *Copeia*, (4): 692-698.
- SOMA, M.; BEÇAK, M. L. & BEÇAK, W. 1975. Estudo comparativo do conteúdo de DNA em 12 espécies de lacertílios. *Ciênc. Cult.*, S Paulo, 27(12):1324-1327.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. cell. Res.*, 75:304-306.
- SUZUKI, H. 1980. Estudo eletroforético de proteínas de músculo esquelético de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1822) (Perciformes - Sciaenidae) da costa sudeste-sul do Brasil e sua aplicação nos estudos populacionais da espécie. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 224p.
- TAYLOR, K. M. 1967. The chromosomes of some lower chordates. *Chromosoma*, 21:181.
- THORGAARD, G. H. 1976. Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 17:174-184.
- TOLEDO, L. F. A. 1978. Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 128p.
- TRAVASSOS, H. & PAIVA, M. P. 1957. Lista dos Sciaenidae marinhos brasileiros, contendo chave de identificação e proposta de "nomes vulgares oficiais". *Bolm Inst. oceanogr.*, S Paulo, 8(1/2):139-170.
- VAZZOLER, A. E. A. de M. 1971. Diversificação fisiológica e morfológica de *Micropogon furnieri* (Desmarest, 1822) ao sul de Cabo Frio, Brasil. *Bolm Inst. oceanogr.*, S Paulo, 20(2):1-70.
- 
- ; PHAN V. N. & PARDO, W. M. 1976. *Micropogon furnieri*: estudos eletroforéticos dos padrões de hemoglobinas da população I (Cabo Frio - Torres). *Ciênc. Cult.*, S Paulo, 28(7, supl.):225.
- VAZZOLER, G. 1975. Distribuição da fauna de peixes demersais e ecologia dos Sciaenidae da plataforma continental brasileira, entre as latitudes 29°21'S (Torres) e 33°41'S (Chuí). *Bolm Inst. oceanogr.*, S Paulo, 24:85-169.

(Recebido 09-maio-1983;  
aceito 09-dez-1983)