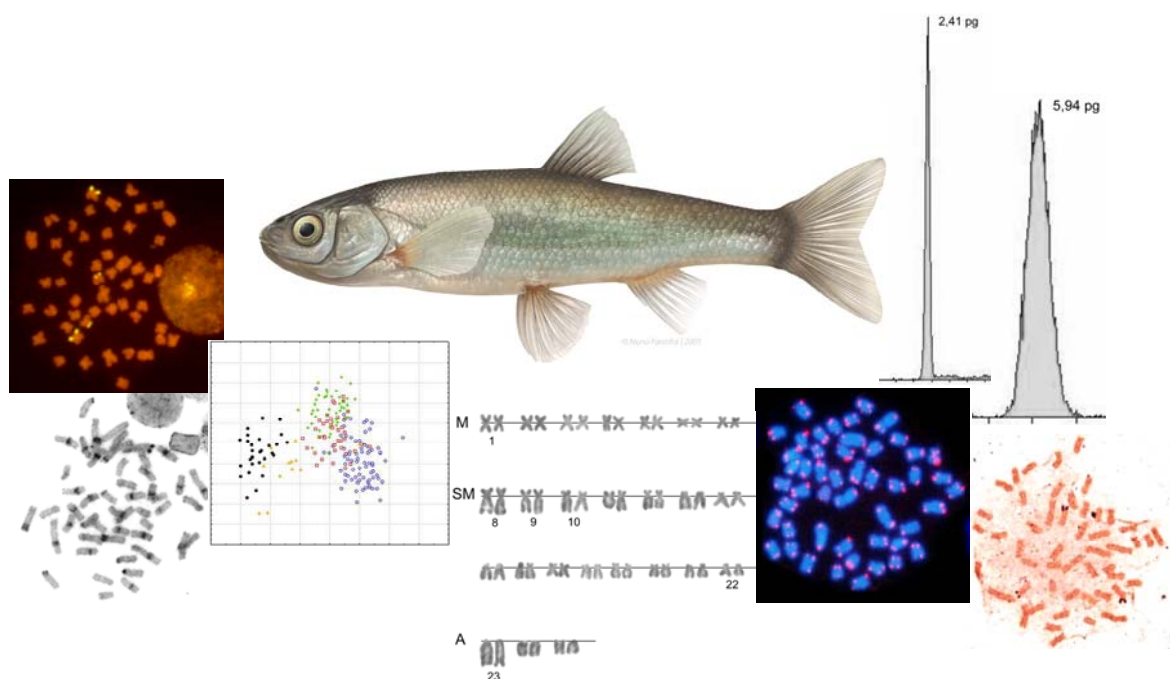


**Pesquisa de Marcadores Citogenéticos e Morfológicos
em Populações do Endemismo Lusitaniano
Chondrostoma lusitanicum e sua Comparação com o
Padrão Descrito para a Espécie-irmã *C. almacai*
(Pisces, Cyprinidae)**



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

2007

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de
Mestre em Ciências do Mar-Recursos Marinhos,
especialidade em Ecologia

Resolução 12/SC/95, D.R. nº 169, II série, de 24 de Julho de 1995

Orientação: Professora Doutora Maria João Collares-Pereira
Universidade de Lisboa

Capa –*Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira, 1980 (nome vulgar: Boga Portuguesa) ilustração científica de Nuno Farinha, 2005; as restantes fotografias correspondem ao respectivo estudo.

À minha Avó

AGRADECIMENTOS

A realização e conclusão deste estudo nunca teria sido possível sem a ajuda e estímulos preciosos de um vasto conjunto de pessoas a quem merecidamente devo expressar os meus mais sinceros agradecimentos. O apoio incessante, quer científico e técnico, quer de natureza humana, foi imprescindível para a sua concretização. Importa dirigir um reconhecimento especial:

À Professora Doutora Maria João Collares-Pereira por ter sido uma orientadora extraordinária com uma enorme capacidade de transmissão de conhecimentos, estimulando o sentido crítico, a ética, e o rigor e qualidade científicos. O seu apoio constante, a dedicada disponibilidade e orientação, a confiança e amizade demonstradas, e o entusiasmo e motivação contagiante com que sempre encarou este trabalho foram fundamentais à sua prossecução.

Ao Professor Henrique Cabral pelo precioso auxílio prestado na resolução de problemas estatísticos.

À Cláudia pelo apoio incondicional e dedicado ao longo deste trabalho; foste uma ajuda preciosa no laboratório sempre que surgia algum problema e falta de tempo!!! Pelas longas conversas, pelos agradáveis almoços, pelos momentos divertidos no biotério, enfim... por toda a amizade.

À D. Branca por todo o carinho e pela ajuda, que nunca faltou, na realização dos trabalhos de laboratório (sem a sua experiência e organização laboratorial não teria sido possível todos estes dados).

Ao Zé por ter sido um excelente amigo com um enorme sentido de humor e pela companhia nos infindáveis fins-de-semana de trabalho!

Ao Daniel e à Filipa Filipe pela ajuda nas saídas de campo, com quem aprendi a fazer pesca eléctrica, e pela simpatia com que me acolheram.

À Andreia e à Marta pela transmissão de conhecimentos das técnicas de citogenética e pela disponibilidade dedicada.

Ao Marco Arruda pela ajuda na saída de campo a Rio Maior e pelo incessante interesse nestes resultados.

Ao grupo de Biologia de Desenvolvimento pelo sentido crítico que sempre tiveram mas, também, pelo bom humor e boa música que continuamente disponibilizaram, em especial à Professora Gabriela pela transmissão de conhecimentos de cultura celular e pela amabilidade com que me acolheu, ao Doutor Gabriel por todos os ensinamentos no âmbito da microscopia óptica e por todo o apoio possível que nunca deixou de me dispensar (à parte do vício constante de assobiar!!) e à Ana Lopes pela ajuda e incentivo, e pela amizade e carinho demonstrados.

Ao Kaloga, meu companheiro e amigo, que sempre me incentivou e apoiou nos momentos mais difíceis, e que sempre partilhou comigo os entusiasmos e alegrias. Por todo o amor e carinho, pela paciência e compreensão, pela sensatez e racionalidade, pela confiança e pela preocupação demonstradas... por tudo!

Aos meus Pais pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo deste trabalho.

À minha querida Avó pelo seu calor humano, compreensão, amizade e incansável apoio moral.

Ao Miguel, meu querido irmão, pelo estímulo e apoio incondicional desde sempre; pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviu, e sensatez com que sempre me ajudou, e à minha cunhada, Cláudia, pelo apoio nos momentos bons e menos bons, e pela sua amizade.

À Joaquina, minha linda sobrinha, pela alegria e felicidade que transmite.

A toda a minha família pelo apoio manifestado, que permitiu reunir as condições que muito me ajudaram a vencer todo este tempo de trabalho.

Aos meus amigos de longa data que foram perguntando pelo trabalho e suportaram as minhas ausências, bem como as minhas presenças!

Às minhas colegas de trabalho pela boa relação pessoal que criámos, em especial à Catarina pelo seu sorriso contagiante, pelo apoio constante e auxílio prestado, ao Fernando pela ajuda prestada no trabalho, pelo bom humor e amizade.

Ao Dr. Hildeberto que sempre se disponibilizou a acertos necessários de horário para que eu pudesse cumprir com todas as minhas obrigações profissionais e académicas e pelas constantes palavras de incentivo.

À Gracinda e ao Júlio pela hospitalidade, ajuda e amabilidade que me dedicaram.

Ao INAG pelo suporte financeiro das campanhas no âmbito do contracto/2004/033/INAG FCUL.

RESUMO

O presente estudo teve como principal objectivo reanalisar a variabilidade citogenética e morfológica observadas para o endemismo piscícola *Chondrostoma lusitanicum* (Família Cyprinidae) antes do seu confinamento geográfico à região a norte da Bacia do Sado, com a recente descrição da espécie-irmã *C. almacai* nas bacias mais meridionais (Arade, Bensafrim e Mira). Dado que decorreu, inicialmente, em paralelo com a primeira caracterização desta última a nível cariológico, visou igualmente proceder a uma comparação directa entre estas duas espécies, pelo que também incluiu uma análise comparativa do conteúdo de DNA nuclear através da técnica de Citometria de Fluxo.

Foram especificamente amostradas duas populações de *C. lusitanicum* da Bacia Hidrográfica do Rio Tejo, localizadas em margens opostas (Rio Maior e Ribeira de Raia) e uma população da Bacia da Samarra, a norte, e utilizados para efeitos comparativos, dados publicados referentes à população da Ribeira da Junqueira (Sines) e à série-tipo da Ribeira de Xarrama (Sado) de forma a abranger a generalidade da área de distribuição da espécie.

O padrão cariológico observado através de várias técnicas de marcação cromossómica (bandeamentos com enzimas de restrição, bandeamento C, bandeamento N com nitrato de prata e cromomicina A₃ e, mais pontualmente, FISH com uma sonda telomérica), apesar de incluir uma amostragem bem mais significativa e ampla das Bacias do Tejo e Samarra e de ter excluído a população de *C. almacai* da Bacia do Mira, foi idêntico ao reportado anteriormente: foi observado um valor diplóide de 50 cromossomas (com apenas uma excepção na Bacia da Samarra de um triplóide), sendo o cariótipo composto por 7 pares de cromossomas metacêntricos, 15 pares de submetacêntricos e 3 pares de acrocêntricos (NF=94). Deste modo, foi confirmada para esta espécie, recorrendo a marcadores adicionais, a fórmula haplóide anteriormente descrita. Porém, no que respeita ao elevado polimorfismo cromossómico reportado para os NORs, o qual podia ser apenas o reflexo da mistura de populações pertencentes a espécies distintas, este estudo permitiu comprovar a existência de dois pares de organizadores nucleolares, ao contrário da maioria das espécies europeias da mesma sub-família, que apresentam apenas um par de NORs.

A análise comparativa do conteúdo de DNA nuclear de *C. lusitanicum* e de *C. almacai*, apesar do estudo citogenético ter revelado uma grande identidade entre estas espécies, revelou diferenças populacionais (entre as populações de *C. lusitanicum* das bacias do litoral oeste e as restantes da sua área de distribuição actual) para além das específicas: *C. lusitanicum* caracterizou-se por exibir um valor médio superior em todas

as populações estudadas (2,72 pg - 3,01 pg) relativamente a *C. almaçai* que possui um genoma comparativamente mais pequeno (média = 2,56 pg). Estas variações poderão estar relacionadas com o facto do processo de divergência das duas espécies se ter iniciado, aparentemente, com a formação da Serra do Caldeirão, bem como com os respectivos padrões actuais de distribuição - *C. lusitanicum* tem uma distribuição mais ampla do que *C. almaçai*, que ocupa uma área geográfica mais meridional e muito mais restrita.

Identicamente, o estudo multivariado das características morfológicas e anatómicas mais relevantes permitiu diagnosticar a existência de variações inter-populacionais em *C. lusitanicum*, confirmando a diferenciação das bacias do litoral oeste (Samarra e Rio Maior), relativamente às restantes, em particular, bem como a distinção específica recentemente proposta.

Face ao elevado declínio populacional destes dois endemismos lusitanianos, actualmente classificados como “Criticamente em Perigo”, os resultados obtidos, na medida em que permitiram comprovar a existência de diferenças populacionais significativas, tornam-se essenciais para a definição de estratégias conservacionistas. Com efeito a sua relativa restrita área de distribuição e as flutuações sazonais do regime hidrológico das bacias que ocupam, tornam estas espécies extremamente vulneráveis às contínuas acções antrópicas sobre os habitats ribeirinhos e, por isso, será urgente implementar medidas conservacionistas adequadas que atendam à estruturação populacional observada.

ABSTRACT

The main goals of the present work were the re-analysis of the cytogenetic and morphological variability of the endemic cyprinid fish *Chondrostoma lusitanicum*, after its geographical confinement due to the description of a new species - *Chondrostoma almaiai* - in the most southern drainages, and the comparison of both sister-species based on available data. The approach included: (1) the study of the most relevant meristic and morphometric characters; (2) the definition of the diploid number and of the chromosome haploid formula using several markers; and (3) the analysis of the genome size variation. Two populations of *C. lusitanicum* from Tejo River Basin (from left and right bank respectively) and the population of Samarra River Basin were specifically sampled and analysed altogether with the available data from Ribeira da Junqueira (Sines) and the species type-series from Sado River Basin.

As regards the cytogenetic approach, analysis of C-banding, NORs silver- (Ag) and cromomycin A₃ - stainings, restriction enzymes banding (RE) and fluorescent in situ hybridisation (FISH) with telomeric probe, were used to describe the karyotype pattern. Both sister-species were characterised by a diploid value of 50 chromosomes (with one single exception found at Samarra population of *C. lusitanicum* - a triploid specimen, $3n=75$) and an haploid chromosome formula of 7M:15SM:3A (NF=94). However, the number of NOR regions per genome and the number of active NOR sites per cell (2-4 NOR bearing chromosomes) evidenced a high intra- and interpopulation variability mainly in *C. lusitanicum*. The nuclear DNA content measurements by the flow cytometry methodology (FCM) showed also some significant differences of genome size both within and between the two species: *C. almaiai* has a smaller genome size (with median value of 2,56 pg) than *C. lusitanicum*, which presents also differences at the population level, ranging from 2,72 pg to 3,01 pg average values. Identically, the morphological study revealed a significant variation between the populations of *C. lusitanicum*, which were clearly assembled in two groups: one including the population from the right bank of Tejo drainage and Samara, and the other including the southernly populations, with distinct patterns as concerns some of the variables.

These results pointing out to a clear differentiation among populations likely linked to specific geographic and climatic constrains including frequent and severe bottlenecks, may be considered relevant for the definition of specific conservation strategies for these Portuguese endemics, since they were recently listed as "Critically Endangered" in the National Red Data Book.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução geral	2
1.2 Família CYPRINIDAE	3
1.2.1 Caracterização Morfológica	4
1.2.2 Distribuição na Península Ibérica	5
1.2.3 A Espécie <i>Chondrostoma lusitanicum</i> (nome vulgar: Boga Portuguesa)	6
a. Descrição Morfológica	7
b. Distribuição Geográfica	7
1.3 Classificação e Sistemática	9
1.3.1 Caracteres Morfológicos	9
1.3.2 Caracteres Cariológicos	10
1.3.2.1 Técnicas Gerais de Análise Citogenética	12
a. Pré-tratamento com Inibidor Mitótico	14
b. Choque Hipotónico	15
c. Fixação	15
d. Montagem e Coloração	16
1.3.2.2 Marcação Cromossómica (bandeamento)	16
a. Marcação dos Organizadores Nucleolares (NORs)	16
b. Marcação de Bandas-C	18
c. Marcação com Enzimas de Restrição (ERs)	18
d. Marcação com Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	21
1.3.2.3 Tamanho do Genoma	21
1.4. Objectivos	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 Enquadramento Geográfico dos Locais de Amostragem	26
2.2 Recolha e Manutenção dos Exemplares	27
2.3 Número de Exemplares Utilizados	28
2.4 Análise Morfológica	28
2.5 Análise Citogenética	32

2.5.1 Obtenção de Material Celular	32
a. Método <i>in vivo</i> por Suspensão Celular de Rim Cefálico	32
b. Método <i>in vitro</i> por Cultura de Fibroblastos	32
2.5.2. Fixação da Suspensão Celular	33
2.5.3. Montagem da Suspensão Celular	34
2.5.4. Marcação Cromossómica Sequencial dos Organizadores Nucleolares (NORs)	34
a. Marcação CMA ₃ -NOR	34
b. Marcação AgNO ₃ -NOR	35
2.5.5 Marcação Cromossómica por Bandeamento-C	35
2.5.6 Marcação Cromossómica com Enzimas de Restrição	35
2.5.7 Marcação por FISH (<i>Fluorescent In Situ Hybridisation</i>)	36
2.5.8. Métodos Analíticos	36
2.5.9 Determinação do Número Diplóide / Obtenção do Cariótipo e NF	37
2.6. Quantificação do DNA Nuclear por Citometria de Fluxo	37
3. RESULTADOS	39
3.1 Análise Morfológica	40
3.1.1 Variáveis Merísticas	40
3.1.2 Variáveis Morfométricas	43
3.2 Análise Citogenética	47
3.3 Quantificação de DNA Nuclear	54
4. DISCUSSÃO	58
4.1 Análise Morfológica	59
4.2 Análise Citogenética	60
4.3 Quantificação do DNA nuclear	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	70
ANEXOS	
Anexo I – Espécies piscícolas nativas Das águas continentais ibéricas	
Anexo II – Soluções	
Anexo III – Parâmetros estatísticos para as variáveis merísticas e índices morfométricas de <i>C. lusitanicum</i>	
Anexo IV – Número de exemplares e de sinais CMA ₃ -/ Ag-NORs positivos de <i>C. lusitanicum</i>	

LISTA FIGURAS

Figura 1: Vista lateral de <i>Chondrostoma lusitanicum</i> .	7
Figura 2: Mapa ilustrativo da distribuição geográfica de <i>Chondrostoma lusitanicum</i> e de <i>Chondrostoma almaçai</i> e locais de amostragem das populações de <i>C. lusitanicum</i> estudadas.	26
Figura 3: Fotografia ilustrativa de um dos locais de amostragem.	27
Figura 4: Esquema representativo das variáveis morfométricas estudadas.	31
Figura 5: Projecção dos indivíduos no espaço definido pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes, com base em oito caracteres merísticos.	42
Figura 6: Projecção dos indivíduos no espaço definido pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes , com base nas características morfométricas.	45
Figura 7: Variação no número de NORs por genoma: placas metafásicas de <i>C. lusitanicum</i> obtidas pelo método <i>in vivo</i> após marcação com CMA ₃ e AgNO ₃ .	49
Figura 8: Marcação cromossómica por bandeamento-C em placas metafásicas de <i>C. lusitanicum</i> obtidas pelo método <i>in vivo</i> .	50
Figura 9: Cariótipos de fêmeas de <i>C. lusitanicum</i> após digestão <i>in situ</i> com a endonuclease <i>AluI</i> , obtidos pelo método <i>in vivo</i> .	52
Figura 10: Cariótipos de espécimes de <i>C. lusitanicum</i> após digestão <i>in situ</i> com a endonuclease <i>HaeIII</i> , obtidos pelo método <i>in vivo</i> .	53
Figura 11: Marcação cromossómica com sondas teloméricas (FISH) em placas metafásicas de <i>C. lusitanicum</i> obtidas pelo método <i>in vivo</i> .	54
Figura 12: Ilustração das leituras referentes à quantificação de DNA nuclear obtidos por citometria de fluxo para as populações estudadas de <i>C. lusitanicum</i> .	55

Figura 13: Conteúdos de DNA nuclear por indivíduo nas populações de <i>C. lusitanicum</i> analisadas.	56
--	----

LISTA TABELAS

Tabela 1: Número de exemplares de <i>C. lusitanicum</i> analisados por população.	28
Tabela 2: Valores próprios, correlações canónicas, percentagens de variância captada pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes e resultados do teste de Wilks'Lambda, com base nas variáveis merísticas.	41
Tabela 3: Número e respectiva percentagem de indivíduos correctamente classificados em cada população com base nas variáveis merísticas.	41
Tabela 4: Coeficientes standardizados das funções canónicas, com base nas variáveis merísticas.	42
Tabela 5: Valores da estatística F para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada.	43
Tabela 6: Distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada, com base nas variáveis merísticas.	43
Tabela 7: Valores próprios, correlações canónicas, percentagens de variância captada pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes e resultados do teste de Wilks'Lambda, com base nas variáveis morfométricas.	44
Tabela 8: Número e respectiva percentagem de indivíduos correctamente classificados em cada população com base nas variáveis morfométricas.	44
Tabela 9: Coeficientes standardizados das funções canónicas, com base nas variáveis morfométricas.	46
Tabela 10: Valores da estatística F para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada.	46

Tabela 11: Distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada, com base nas variáveis morfométricas.	46
Tabela 12: Número de exemplares e de placas metafásicas analisadas por população para determinação do respectivo valor diplóide.	48
Tabela 13: Número de exemplares e total de placas metafásicas analisadas por população para obtenção das percentagens do número de sinais CMA ₃ - e Ag-NORs positivos.	48
Tabela 14: Valores dos conteúdos de DNA nuclear e parâmetros estatísticos descritivos do tamanho do genoma das populações de <i>C. lusitanicum</i> .	56
Tabela 15: Resultado da análise de variância (ANOVA) das médias do conteúdo de DNA nuclear entre as populações de <i>C. lusitanicum</i> .	56
Tabela 16: Teste de Tukey entre as populações de <i>C. lusitanicum</i> .	57
Tabela 17: Comparação das diferenças entre as espécies-irmãs.	61

LISTA ANEXOS

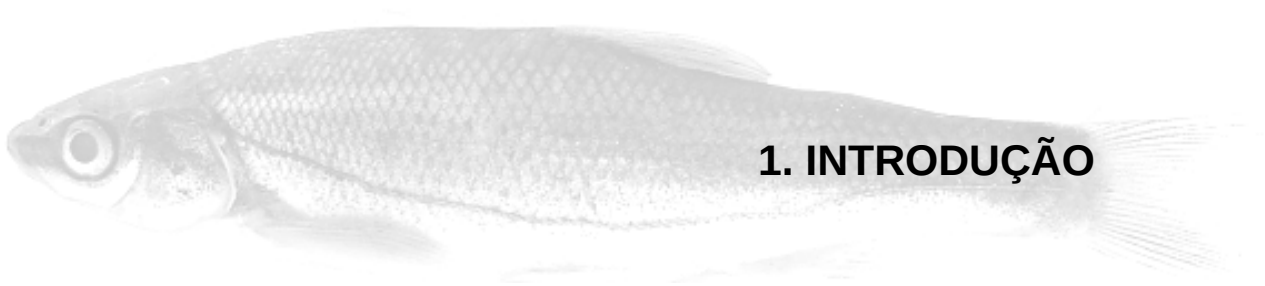
Anexo I.1: Espécies piscícolas nativas nas águas continentais ibéricas e respectivos estatutos de conservação.

Anexo II: Soluções.

Anexo III: Parâmetros estatísticos para as variáveis merísticas e índices morfométricas de *C. Lusitanicum*.

Anexo IV.1: Número de exemplares, total de placas metafásicas analisadas, e número de sinais CMA₃- e Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum* na população da Samarra.

Anexo IV.2: Número de exemplares, total de placas metafásicas analisadas, e número de sinais CMA₃- e Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum* na população do Tejo 1 e da população do Tejo 2.



1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

O património aquícola português atinge cerca de 150 mil hectares de massas de água superficiais povoadas por mais de 40 espécies piscícolas, as quais constituem um valioso recurso natural a nível económico, cultural e social, devendo a sua gestão e conservação, pautar-se pelos princípios da sustentabilidade e da manutenção da biodiversidade.

Nas últimas décadas, a abundância e diversidade de espécies piscícolas têm sido fortemente alteradas, em resultado das transformações introduzidas no domínio hídrico (construção de barragens e artificialização de linhas de água), pelas alterações das bacias hidrográficas (desflorestação, urbanização e agricultura), pela poluição, pela introdução de espécies exóticas e incumprimento da legislação aplicável, resultando numa diminuição e fragmentação progressivas de muitas populações (e.g. Almaça, 1995).

A fragmentação tem como consequência directa a redução da população efectiva, da qual resulta uma perda de diversidade genética devido à deriva genética e à consanguinidade. O primeiro destes factores causa uma erosão aleatória na diversidade genética, enquanto que o segundo provoca uma perda direccionada, que pode afectar a plasticidade adaptativa das populações a alterações do meio, aumentando assim os riscos de extinção. A perpetuação das espécies a curto prazo através de respostas às mudanças ambientais, só é praticável com uma variabilidade genética que permita um processo contínuo de adaptação e evite eventuais problemas associados à falta de variabilidade (Meffe, 1990). Segundo Meffe (1986), a variabilidade genética total de uma espécie apresenta-se, em geral, hierarquicamente estruturada, isto é, uma certa proporção dessa variabilidade pode ser atribuída à variabilidade entre os indivíduos de uma população, outra à variabilidade entre populações de uma determinada região (e.g. bacias hidrográficas) e, também, à variabilidade entre populações de diferentes regiões. Esta divergência genética entre populações resulta de um balanço entre mecanismos como a deriva genética, mutações e selecção e, por outro lado, da migração e fluxo de genes.

Tradicionalmente, a quantificação da diversidade genética entre populações era baseada em estudos utilizando exclusivamente caracteres morfológicos quantitativos. No entanto, estes caracteres quando usados apenas como medida directa da variabilidade genética, apresentam uma série de limitações (Allendorf et al. 1987). Actualmente, existem estudos que incorporam simultaneamente dados moleculares e morfológicos permitindo, assim, definições e interpretações mais adequadas acerca da diversidade

biológica, quando comparados com os que consideram apenas uma das abordagens (Weir, 1990).

As frequências e variantes alélicas são usadas como marcadores populacionais extremamente importantes na gestão das populações piscícolas (Pella e Miller, 1987). A variação cromossômica intra-específica também pode ser usada como marcador genético na diferenciação das populações. Apesar de mais moroso, este tipo de análise pode evidenciar diferenças não aparentes entre as populações, com a utilização de outros métodos (Thorgaard, 1987). Também existem vários tipos de polimorfismos cromossômicos que podem ser usados como marcadores genéticos. Thorgaard (1983) encontrou diferenças a nível do número de cromossomas e do número fundamental entre populações de *Salmo gairdneri*, devidas a translocações robertsonianas. Segundo este autor, esses rearranjos apresentam-se como variações hereditárias estáveis entre populações. Com o aperfeiçoamento de técnicas de marcação cromossômica, foi possível a detecção de outro tipo de variação inter-populacional, como a encontrada a nível dos organizadores nucleolares (Gold, 1984) e a nível da heterocromatina (Phillips e Zajicek, 1982). Nos peixes, devido ao reduzido número de indivíduos geralmente estudados nas análises citogenéticas, o polimorfismo cromossômico tem sido provavelmente subestimado, falhando assim na detecção de variação intra- e inter-populacional (Amores et al. 1990).

Assim, para conhecer e caracterizar devidamente a variabilidade intra- e inter-populacional das espécies e eventuais processos de diferenciação, torna-se importante proceder à integração dos resultados do estudo de diferentes tipos de marcadores (morfológicos e genéticos / citogenéticos) em material que seja representativo das suas áreas de distribuição.

1.2 Família CYPRINIDAE

Os peixes constituem um grupo polifilético com cerca de 25.000 espécies descritas e um grande potencial adaptativo (Nelson, 1994). Representam o grupo de vertebrados que aparentemente maior êxito teve em termos de diversificação, devido à grande variabilidade de habitats colonizados, incluindo o meio dulciaquícola, e ao tipo de estratégia destas populações: indivíduos que aliam a uma mobilidade restrita e à ocupação de nichos ecológicos bem definidos, uma elevada taxa de reprodução (Almaça, 1996).

A família Cyprinidae é a que apresenta uma maior taxa de especiação, sendo, também, a mais abundante: 210 géneros e cerca de 2.010 espécies descritas, das quais

1.270 são nativas da Eurásia, assumindo uma posição dominante em todas as regiões biogeográficas, com excepção da Neotropical e da Australiana (Nelson, 1994). Segundo o mesmo autor, a localização sistemática da família Cyprinidae no conjunto dos peixes ósseos é a seguinte:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Infraclasse: TELEOSTEI

Divisão: EUTELEOSTEI

Superordem: OSTARYOPHYSI

Ordem: CYPRINIFORMES

Subordem: CYPRINOIDEI

Família: CYPRINIDAE

É de salientar que, na Península Ibérica, a família CYPRINIDAE está representada maioritariamente por duas sub-famílias: LEUCISCINAE, que inclui os géneros *Anaecypris*, *Squalius* e *Chondrostoma*, e CYPRININAE, com representantes dos géneros *Barbus*, *Cyprinus* e *Carassius*, embora estes dois últimos não sejam autóctones. A distinção entre estas duas linhas evolutivas assenta fundamentalmente na presença ou ausência de barbilhos.

No entanto, embora tenha sido muito recentemente publicado um estudo que sugere a separação dos *Chondrostoma* ibéricos em 5 novos géneros (Robalo et al. 2007), optou-se por manter a nomenclatura anterior, uma vez que este trabalho estava na fase final de redacção.

1.2.1 Caracterização Morfológica

A família CYPRINIDAE caracteriza-se por possuir um corpo oblongo, uma região cefálica sem escamas, boca protáctil e destituída de dentes, lábios finos com ou sem barbilhos e sem papilas, dentes faríngeos dispostos num número variável de fiadas (1-3), escamas ciclóides e bem aderentes ao corpo, barbatanas peitorais de posição inferior no corpo, barbatanas pélvicas de posição abdominal, barbatana dorsal por vezes com raios espinhosos; os machos sexualmente maduros exibem frequentemente tubérculos nupciais conspícuos no corpo e na cabeça.

A característica mais relevante dos ciprinídeos, compartilhada com as outras quatro famílias próximas (GYRINOCHEILIDAE, CATOSTOMIDAE, HOMALOPTERIDAE e

COBITIDAE) é a presença do “aparelho de Weber”, uma estrutura originada pelas quatro vértebras anteriores, cujas porções apendiculares formam uma série de quatro ossículos que fazem comunicar, em ambos os lados do corpo, a bexiga gasosa com o ouvido interno.

Os ciprinídeos, à excepção de algumas, raras, espécies tolerantes à salinidade, são dulciaquícolas obrigatórios, sendo a sua distribuição condicionada pelas massas continentais e dependente da evolução das bacias hidrográficas, como por exemplo, da captura de traçados fluviais, de cheias periódicas, de regressões marinhas e, ainda, da acção desenvolvida pelo Homem através de repovoamentos e/ou do estabelecimento de contactos entre bacias distintas (Almaça, 1976).

1.2.2 Distribuição na Península Ibérica

No que se refere à família mais primitiva de CYPRINOIDEI, existem opiniões distintas quanto ao seu local de origem e vias de dispersão. No entanto, o sudeste asiático parece ter sido o centro de radiação dos ciprinídeos, apresentando a fauna europeia claras afinidades com a leste-asiática e com a siberiana. Assim, terão surgido na Sibéria os géneros euro-siberianos, vindo apenas a atingir a Europa no Oligocénico como consequência do desaparecimento do Mar de Obi (Banarescu, 1973). Deste modo, a fauna ciprinícola europeia terá tido essencialmente uma origem este-asiática e não oeste-asiática como inicialmente se pensou, tendo sido colonizada, tal como o sul da Europa, maioritariamente a partir da Europa Setentrional e Central.

A maior parte da fauna euro-siberiana actual pertence à sub-família LEUCISCINAE, a qual terá surgido na Península Ibérica no final do Oligocénico, entre a regressão marinha (responsável pelo desaparecimento do braço de mar que atravessava a Península, isolando-a do resto da Europa) e a conclusão do processo de levantamento da cadeia montanhosa dos Pirinéus. Assim, em consequência do isolamento das bacias hidrográficas e por formação de barreiras geográficas, deu-se o estabelecimento de um pequeno grupo colonizador que terá sofrido um processo de especiação alopátrica (Almaça, 1976). Cunha et al. (2004) consideraram haver um padrão geográfico intra-específico por bacia, sugerindo que o tempo de isolamento das bacias hidrográficas ibéricas foi decisivo para a ocorrência de diferenciação genética entre as diferentes populações. A divergência da linha mais basal dos LEUCISCINAE poderá ter ocorrido há 9,7-17 milhões de anos atrás, o que está em concordância com o proposto por Gilles et al. (1998) para os LEUCISCINAE da Europa Central.

Em relação à sub-família CYPRININAE (*Barbus*) e ao género *Anaecypris*, foi também proposta uma outra teoria que considera que o seu aparecimento na Península Ibérica poderá ter ocorrido através do Noroeste de África por intermédio de contactos mais recentes (Messiano - 6,5 a 5,5 milhões de anos) que poderão ter viabilizado o intercâmbio faunístico e florístico entre as duas regiões (Almaça, 1996).

A fauna nativa actual de peixes de água doce da PI é relativamente pobre, quando comparada com a da Europa Central, ou mesmo com as de outras regiões do Sul da Europa (Banarescu, 1973). Inclui apenas duas famílias de peixes verdadeiramente continentais que pertencem à Divisão Primária: CYPRINIDAE e COBITIDAE. Das restantes, uma pertence à Divisão Secundária (CYPRINODONTIDAE) e dez à Divisão Periférica (PETROMYZONTIDAE, ACIPENSERIDAE, ANGUILLIDAE, CLUPEIDAE, SALMONIDAE, SYNGNATHIDAE, GASTEROSTEIDAE, BLENNIIDAE, GOBIIDAE, COTTIDAE) e, algumas espécies, pertencem a famílias marinhas que frequentam ocasionalmente o meio dulciaquícola (MUGILIDAE, ATHERINIDAE, MORONIDAE e PLEURONECTIDAE). De todas estas famílias, a mais importante pela sua diversidade é sem dúvida a família CYPRINIDAE (representam 65% da ictiofauna continental ibérica – 32 espécies – ver Anexo I.1), devido ao elevado número de endemismos, que aumentam de norte para sul e do litoral para o interior, evidenciando a sua expressão máxima na Bacia do Guadiana (Filipe et al. 2004).

Embora os ciprinídeos representem uma fracção significativa das espécies piscícolas nativas existentes em Portugal (21 táxones num total de 35), alguns táxones ainda não têm um estatuto de conservação bem definido apesar da grande maioria das espécies dos géneros *Anaecypris*, *Barbus*, *Chondrostoma* e *Squalius* ter sido listada como ameaçada no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral et al. 2005).

1.2.3 A Espécie *Chondrostoma lusitanicum* (nome vulgar: Boga Portuguesa)

A espécie *C. lusitanicum* foi descrita por Collares-Pereira (1980), com base em amostras das bacias centrais e meridionais de Portugal (Figura 1), e caracteriza-se por ser uma boga de boca arqueada. No entanto, Collares-Pereira (1983a) detectou a existência de alguma variabilidade fenotípica a nível populacional nas bacia hidrográficas mais meridionais (Mira e Arade), posteriormente confirmada por estudos genéticos. Com efeito, Alves et al. (1994) encontraram uma diferenciação genética nas populações dessas bacias relativamente às do Tejo e Sado, dada a presença de dois alelos distintos e de dois *loci* monomórficos que, na população do Tejo, se apresentavam polimórficos. Igualmente, Rodrigues (1993) confirmou a existência de diferenças morfológicas dos

espécimes do Mira em relação aos espécimes da Samarra, assim como a existência de uma diferenciação aloenzimática entre estas duas populações, e Coelho et al. (1997) consideraram a presença de um grupo parafilético, sugerindo que a diferenciação das populações do Arade e Mira poderia atingir o nível específico. Recentemente foi então proposto um reajustamento da descrição anterior de *C. lusitanicum*, com a descrição de uma nova espécie por Coelho et al. (2005) – *Chondrostoma almaiai* (caixa 1).

a. Descrição Morfológica

A Boga Portuguesa é um ciprinídeo de pequenas dimensões com um comprimento máximo de 15 cm que se caracteriza fenotipicamente por apresentar: corpo lateralmente achatado, com um perfil anterior levemente convexo; linha lateral completa e bem distinta (pigmentada); cabeça relativamente pequena; boca ínfera sendo o maxilar superior mais desenvolvido do que o inferior e ligeiramente arqueado, sem barbilhos e sem estojo córneo bem aparente, dentes faríngeos unisseriados de pedúnculo estreito e superfície lisa; branquispinhas pequenas e numerosas; barbatanas dorsal e anal de tamanho idêntico, com a barbatana dorsal inserida ao nível, ou ligeiramente atrás, da base das barbatanas pélvicas, lobos da barbatana caudal ligeiramente arredondados; numerosas escamas de tamanho médio (Collares-Pereira, 1983a; Coelho et al. 2005).



Figura 1: Vista lateral de *C. lusitanicum* (holotipo, 82,5 mm L_s , MB 05-604); retirado de Coelho et al. (2005).

b. Distribuição Geográfica

C. lusitanicum encontra-se exclusivamente nas bacias ocidentais do sudoeste da Península Ibérica. A área de distribuição deste endemismo integra as pequenas bacias situadas no litoral Oeste (Samarra, Lizandro, Colares e Ossos), a Bacia Hidrográfica do Rio Tejo, ainda que apenas os afluentes do seu curso inferior, e a Bacia Hidrográfica do Rio Sado (Coelho et al. 2005). Dada a sua confinção geográfica e a situação actual

destes sistemas hidrográficos em termos ambientais, a espécie foi classificada no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal como “Criticamente em Perigo” (Cabral et al. 2005).

De acordo com a regionalização ictiogeográfica da Península Ibérica proposta por Almaça (1978), a Boga Portuguesa é um endemismo que habita os Sectores Central e Meridional. Por outro lado, a Boga-do-Sudoeste (*C. almakai*) habita as bacias mais meridionais – Bacias Hidrográficas do Mira, Arade e Bensafrim, apesar da população de Bensafrim ter sido caracterizada apenas com base em marcadores moleculares (Coelho et al. 2005).

Caixa 1: *Chondrostoma almakai* sp. nov. Coelho, Mesquita & Collares-Pereira 2005 (nome vulgar: Boga-do-Sudoeste)

Peixe de pequenas dimensões, com 15 cm de comprimento máximo, corpo lateralmente achatado e abdómen circular. Cabeça relativamente pequena e olhos largos. Boca ínfera e ligeiramente arqueada, desprovida de estojo córneo e com seis dentes faríngeos do lado esquerdo e cinco do lado direito dispostos numa só fiada. Branquias pequenas e numerosas ao longo do primeiro arco branquial. Barbatanas dorsal e anal de tamanho idêntico, ambas com sete raios, raramente oito, e com o bordo distal ligeiramente convexo. Barbatana dorsal inserida adiante da transversal à região terminal das barbatanas pélvicas ou apenas ligeiramente atrás. Lobos da barbatana caudal arredondados. Escamas numerosas e de tamanho médio, com linha lateral completa e pigmentada.

De acordo com Coelho et al. (2005), este endemismo apresenta, comparado com *C. lusitanicum*, um maior número de escamas na linha lateral (cerca de 2 escamas a mais) e nas fiadas inferiores (cerca de 1 escama a mais), um menor número de dentes faríngeos do lado direito, uma cabeça mais estreita e comprida e um diâmetro ocular maior. Geneticamente, esta nova espécie apresenta um *locus* aloenzimático PGDH com 2 alelos exclusivos.



Vista lateral de *C. almakai* sp. nov. (holotipo, 79,9 mm L_s, MB 05-1870/21); retirado de Coelho et al. (2005).

1.3 Classificação e Sistemática

A Sistemática é universalmente aceite como o estudo da diversidade dos organismos a todos os níveis visando interpretar o processo evolutivo. Em termos mais modernos, pode definir-se como o estudo científico das formas de organismos, da sua diversidade e de toda e qualquer relação entre eles, onde o termo “relação” não se restringe apenas a estudos de filogenia, mas também, a todas as associações biológicas possíveis entre os organismos (Simpson, 1962). Para tal, este estudo requer um processo de classificação, ou seja, a ordenação de espécies em grupos ou categorias com base nas associações estruturais, funcionais ou em ambas.

A Taxonomia (derivado do grego *táxis* = ordenação + *nomos* = lei) define-se como o estudo teórico e prático da classificação (Kapoor, 1998). Porém, o objectivo do taxonomista não é apenas classificar mas estudar também factores de evolução, formas de especiação, a estrutura das populações naturais e a sua distribuição geográfica. De acordo com Mayr (1969) os caracteres taxonómicos, atributos que traduzem características populacionais que diferem de táxone para táxone, podem agrupar-se em caracteres morfológicos (os quais incluem os elementos embriológicos e cariológicos), fisiológicos, ecológicos, etológicos e geográficos, e têm sido igualmente utilizados na descrição de várias espécies ciprinícolas ibéricas (e.g. Collares-Pereira, 1980a; Coelho et al. 1998, 2005; Doadrio e Carmona, 2003; Robalo et al. 2005) e no seu estudo comparativo.

Os caracteres taxonómicos utilizados neste estudo foram essencialmente de tipo morfológico, recorrendo maioritariamente à morfologia externa e apenas à interna para dois caracteres anatómicos (branquispinhas e dentes faríngeos) e, ainda, os elementos cariológicos e o tamanho do genoma por quantificação do DNA nuclear.

1.3.1 Caracteres Morfológicos

A observação de caracteres morfológicos tem tido diversas aplicações no estudo de peixes, nomeadamente dos ciprinídeos ibéricos (e.g. Collares-Pereira, 1983a; Coelho, 1987; Doadrio e Carmona, 2003; Doadrio e Madeira, 2004; Coelho et al. 2005; Robalo et al. 2005), nos quais se incluem também a identificação e análise de híbridos (Collares-Pereira e Coelho, 1989; Gante et al. 2004), o estudo de associações entre características morfológicas e ecológicas (e.g. Cavalcanti et al. 1999; Maltagliati et al. 2003) assim como estudos de sistemática e filogenia (e.g. Coelho, 1987).

O estudo da morfologia de peixes, à semelhança de outros grupos animais e vegetais, tem sido a primeira fonte de informação para estudos de taxonomia e evolução. Apesar da disponibilidade de dados fisiológicos, comportamentais e ecológicos, os ictiologistas continuam a depender fortemente da morfologia como caracter taxonómico (Strauss e Bond, 1990), dado que existem inúmeras formas de peixes com características anatómicas específicas que ajudam na identificação e classificação das diferentes espécies, embora também se recorra actualmente a marcadores moleculares, tais como isoenzimas, microsátélites e RFLPs (e.g. Coelho et al. 1995; Alves et al. 2001).

Segundo Barlow (1961), a variação morfológica encontrada a nível intra-específico nas populações pode surgir, devido a uma variação “geográfica” entre populações por divergência genética na resposta fenotípica aos diversos factores ambientais, ou devido a uma variação intra-populacional que tanto pode ser afectada pela variação no tamanho do corpo e dimorfismo sexual como por efeitos funcionais relacionados com a idade, nutrição, sazonalidade, etc.

A morfologia tem como base, não só variáveis morfométricas (de variação contínua - ângulos, distâncias, coordenadas), como também características merísticas (de variação descontínua), as quais se podem definir como segmentos do corpo ou outros caracteres que durante o processo de evolução corresponderam à segmentação do corpo, como, por exemplo, o número de escamas e de raios das barbatanas (Collares-Pereira, 1983a). Estas características podem, no entanto, ser influenciadas por factores ambientais, especialmente pela temperatura, e poderão estar dependentes do tamanho do corpo, tanto a nível inter- como intra-específico (Strauss, 1985).

1.3.2 Caracteres Cariológicos

A citogenética é uma área de conhecimento que se desenvolveu fundamentalmente na década de 50 com a descoberta das propriedades da colchicina, com a aplicação do tratamento hipotónico e com o desenvolvimento de técnicas de coloração e bandeamento propostas por Caspersson em 1971, as quais permitiram uma melhor visualização e caracterização dos cromossomas (Fechheimer, 1989).

Os estudos citogenéticos em peixes têm vindo a desenvolver-se nos últimos anos embora sejam apenas conhecidas as características básicas, i.e., valor diplóide (2n) e número fundamental (NF), em aproximadamente 2800 espécies das cerca de 25.000 espécies estimadas, representando cerca de 15% do total (Kinkhardt et al. 1995). Relativamente a outros grupos de peixes, os ciprinídeos têm evidenciado um razoável desenvolvimento em termos de análise citogenética provavelmente devido ao grande

número de espécies desta família, à facilidade de captura e à importância económica de muitas espécies (em particular na Ásia). No entanto, apenas se encontram descritos os cariótipos de cerca de 1/5 das espécies conhecidas (≈ 500), na grande maioria dos casos limitando-se igualmente à definição do número e da morfologia cromossómica (Ráb e Collares-Pereira, 1995). Este facto deve-se, essencialmente, a um elevado número de cromossomas de reduzidas dimensões, que variam entre 42 em *Acheilobatus gracilis* e 446 em *Diptychus dipogon*.

Os recentes desenvolvimentos e melhoramentos ao nível das técnicas de marcação cromossómica, nomeadamente nos anfíbios e mamíferos, não são ainda na sua maioria directamente aplicáveis aos peixes, como veremos adiante. Efectivamente, baseiam-se em fenómenos de desnaturação e subsequente coloração do DNA, e possibilitam a obtenção de bandeamentos mais eficazes viabilizando uma melhor caracterização individual dos cromossomas, permitindo, assim, uma cariotipagem mais rigorosa.

Numa análise citogenética é fundamental estabelecer o cariótipo, na medida em que a citogenética se define como o estudo dos cromossomas quer ao nível do seu comportamento durante as divisões mitóticas e meióticas, quer da sua origem e relações com os mecanismos citológicos de hereditariedade. Deste modo, a constituição cromossómica de uma espécie é definida através da caracterização do número, tamanho e forma dos seus cromossomas (caixa 2), isto é, da definição do respectivo fenótipo cariológico (Clark e Wall, 1996). Assim, o conhecimento deste carácter taxonómico (usualmente analisado em células metafásicas) torna-se útil no estudo e na interpretação das diferentes relações filogenéticas entre as espécies. Como tal, a citotaxonomia – o estudo das relações existentes entre os diferentes organismos através da análise do cariótipo - revela uma grande importância que se deve: i) por um lado a possíveis divergências ao nível do número básico, do tamanho, do tipo de constricções presentes, do padrão de marcação heterocromática e eucromática dos cromossomas; e, por outro, ii) à evolução do cariótipo, a qual se encontra associada a uma progressiva redução do número básico e a um aumento da assimetria, devido a alterações cromossómicas estruturais (translocações, inversões, fusões).

Segundo Gold (1979), os níveis de assimetria do cariótipo são elementos taxonómicos importantes nos peixes. Assim, consideram-se dois tipos básicos de cariótipos: os simétricos que são constituídos por cromossomas de dimensões e forma semelhantes (geralmente possuem um centrómero mediano) e os assimétricos que, pelo contrário, são constituídos por cromossomas de várias dimensões e diferentes formas, dadas as distintas posições ocupadas pelo centrómero. Porém, Sola et al. (1981) defendem a necessidade de integrar estas análises cariológicas com elementos

referentes ao DNA, uma vez que, os rearranjos cromossómicos ultraestruturais não são, em regra, facilmente detectáveis.

A maioria dos estudos de marcação cromossómica em peixes tem-se restringido à identificação de bandas heterocromáticas, bandas-C, e à localização dos organizadores nucleolares – NORs (e.g. Ráb et al. 1990; Amemiya e Gold, 1990; Klinkhardt, 1991; Martínez et al. 1991; Powers e Gold, 1992; Felberg et al. 1993; Rodrigues e Collares-Pereira, 1996; Morescalchi et al. 1996; Artoni et al. 1999; Rossi et al. 2000; Gromicho e Collares-Pereira, 2004). A dificuldade de obtenção de uma marcação eucromática mais específica deve-se possivelmente ao facto de, nos peixes, haver um paralelismo entre o “banding” cromossómico e a compartimentação do genoma. Nos vertebrados homeotérmicos, o genoma é constituído por longos segmentos de DNA de composição essencialmente homogénea (isocoros) caracterizados por diferentes níveis de guanina-citosina (GC), com compartimentos ricos e pobres em GC e, nos heterotérmicos, a sua composição é muito mais homogénea nunca chegando a atingir níveis tão elevados de GC (Bernardi et al. 1988; Bernardi, 1993).

Recentemente, tem-se recorrido a uma técnica de marcação cromossómica por aplicação de enzimas de restrição (ER) que produzem um determinado padrão de bandas variável de espécie para espécie (Clark e Wall, 1996). Estes novos métodos de marcação cromossómica adaptados dos mamíferos, por permitirem uma grande resolução, têm sido também desenvolvidos e progressivamente aplicados aos peixes.

No que respeita aos ciprinídeos, os cariótipos são geralmente assimétricos (Gold, 1979), e as dimensões dos cromossomas são reduzidas variando, por exemplo em *Carassius auratus*, entre 0,8-2,0 μ (na espécie humana variam entre 1,5-8,0 μ) (Baron, 1974). Em relação ao número de cromossomas, de acordo com dados publicados, os cariótipos podem variar, como foi anteriormente referido, entre $2n=42$ e $2n=446$, sendo $2n=50$ o valor diplóide mais frequente.

1.3.2.1 Técnicas Gerais de Análise Citogenética

A diversidade de técnicas usadas para obtenção de imagens metafásicas nos peixes torna-se evidente pelos inúmeros trabalhos publicados (e.g. Ivanov, 1972; Denton, 1973; Baron, 1974; Blaxwall, 1975; Gold, 1979). Dos variados métodos conhecidos, tais como cortes de gónadas, esfregaços de diferentes tecidos (epitélio das escamas, brânquias, barbatanas, gónadas e embriões), suspensão celular directa e cultura de células, os mais utilizados actualmente são os dois últimos procedimentos - a suspensão celular *in vivo* e a cultura de células *in vitro*.

Caixa 2: Cromossomas: morfologia e número

Os cromossomas são os veículos da informação genética contendo todo o DNA de uma célula, com excepção de uma porção (cerca de 1%) existente nas mitocôndrias das células animais e nos cloroplastos das células vegetais. São, também, a forma visível dessa informação, pois durante uma das fases do ciclo celular, quando a célula se encontra em mitose, podem ser observados ao microscópio óptico uma vez que estão num estado de máxima compactação – metafase. Os cromossomas são constituídos por eucromatina e heterocromatina, sendo a primeira geneticamente activa e a segunda formada por sequências repetitivas, geneticamente inactiva e de replicação tardia, mas com um papel preponderante na especiação animal (Clark e Wall, 1996).

Cada cromossoma é composto por dois cromatídeos unidos pelo centrómero, também designado por constrição primária, sendo constituído por sequências repetitivas de DNA e proteínas específicas. Este desempenha um papel fundamental na divisão celular, uma vez que nele se encontra posicionado o cinétocoro, e é um ponto de referência citológico básico, dividindo o cromossoma em dois braços, designados por “p” de *petit* para o braço curto e “q” para o longo. As regiões terminais dos cromossomas denominam-se telómeros e têm uma função importante na manutenção da sua integridade ao longo dos sucessivos ciclos celulares.

O sistema de classificação usualmente adoptado é o de Levan et al. (1964), o qual assenta no quociente entre o comprimento do maior braço cromossómico (L) e o do menor (C), *i.e.*, no valor da relação L/C. As designações clássicas dos cromossomas como metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico/telocêntrico devem-se à posição do centrómero, caso ocupe uma posição mediana, submediana, subterminal e terminal, respectivamente. Quando o centrómero é estritamente mediano apresenta um $r = 1$, quando terminal um $r = \infty$. No entanto, tal sistema não foi exactamente seguido pela maior parte dos citogeneticistas de peixes dado que surgem algumas dificuldades na localização exacta dos centrómeros devido às dimensões dos cromossomas. Com efeito, no conjunto dos vertebrados e com excepção dos microcromossomas das aves e de alguns répteis, os peixes possuem os menores cromossomas. Na maioria das espécies piscícolas o valor diplóide situa-se entre os 40 e os 60 cromossomas, tendo o cariótipo médio $2n=48$ com cerca de 1/5 do DNA dos mamíferos (Baron, 1974).

Posição Centrómero	$r = L/C$	Designação Cromossomas	
Mediana	1,0	M	Metacêntrico
Região Mediana	1,0 - 1,7		
Região Submediana	1,7 - 3,0	SM	Submetacêntrico
Região Subterminal	3,0 - 7,0	ST	Subtelocêntrico
Região Terminal	7,0 - ∞	A	Acrocêntrico
Terminal	∞	T	Telocêntrico

Nomenclatura cromossómica proposta por Levan et al. (1964).

Apesar do método de suspensão celular *in vivo* ser rápido e pouco dispendioso, tem a desvantagem de provocar a morte dos peixes e de produzir índices mitóticos irregulares por depender das condições ambientais e do estado fisiológico dos espécimes (Alvarez et al. 1991). De entre os tecidos cujas células mantêm maiores potencialidades mitóticas, o mais utilizado é o rim (região cefálica) por ser um órgão hematopoiético na maioria das espécies piscícolas (Gold et al. 1990).

O método *in vitro* é particularmente usado em exemplares de pequenas dimensões e em espécies piscícolas de interesse económico dado não inviabilizar a sua comercialização, pois tem a vantagem de não provocar a morte dos espécimes (no caso presente, tal não foi possível devido à análise morfológica), uma vez que recorre apenas a uma porção do seu organismo – por exemplo, fragmentos de barbatanas. Também é mais vantajoso por possibilitar a obtenção de imagens cromossómicas de maior qualidade. Contudo, é um método dispendioso, moroso, que exige uma logística adequada para evitar contaminações por fungos e/ou bactérias. A cultura de fibroblastos foi inicialmente descrita por Amemiya et al. (1984) tendo sido adaptada a estudos relacionados com ciprinídeos ibéricos e de outras regiões geográficas (e.g. Gold et al. 1990; Rodrigues e Collares-Pereira, 1996; Gromicho e Collares-Pereira, 2004).

Independentemente do tecido utilizado e do recurso ou não a um processo de divisão *in vitro*, as diferentes técnicas desenvolvidas apoiam-se nos mesmos princípios (Denton, 1973):

a. Pré-tratamento com Inibidor Mitótico

Consiste em recorrer a substâncias químicas (por exemplo a colchicina, alcalóide extraído das raízes de *Colchicum autumnale*) capazes de boquerarem a formação do fuso acromático e, portanto, o processo de migração polar dos cromossomas durante o ciclo celular. Essas substâncias também alteram a viscosidade do citoplasma e provocam uma hidratação diferencial dos segmentos cromossómicos, permitindo uma clarificação das zonas com constrições (Sharma e Sharma, 1980).

O período de actuação do inibidor mitótico varia de 1 a 6 horas, sendo fundamental a concentração e a quantidade administrada: a concentração pode variar entre 0,01-0,1% e, por conseguinte, a dose ser maior ou menor (no primeiro caso geralmente 0,1 ml por 100 gramas de peso corporal). No método de suspensão celular *in vivo*, a administração do inibidor pode processar-se de duas maneiras: quer por via directa através de injeção intramuscular dorsal ou intraperitoneal, quer por via indirecta, dissolvendo o inibidor na água do aquário no caso dos exemplares serem de reduzidas dimensões, tendo o cuidado de aumentar o tempo de actuação (3-8h). Na cultura de tecidos *in vitro*, o método

processa-se da mesma maneira: terminado o período de crescimento celular, é adicionado à cultura uma certa dose de inibidor numa concentração mais reduzida, que varia consoante a quantidade de meio e o tipo de células incubadas.

É de salientar, que a dose e a concentração do agente inibidor administrada devem ser adequadas, uma vez que: i) quando a dose e a concentração são inferiores não surge qualquer efeito, pelo contrário provoca a contracção excessiva dos cromossomas, prejudicando a análise da sua morfologia e pode, eventualmente, induzir a formação de poliploidias; ii) quando o tempo não é suficiente, não se produzem as alterações necessárias ao nível do fuso acromático e acaba por ser metabolizado.

b. Choque Hipotónico

Tratamento que recorre ao uso de uma solução hipotónica, que tem como função provocar a entumescência das células através de um fenómeno osmótico, permitindo no final uma boa dispersão dos cromossomas. As soluções usadas devem possuir uma baixa pressão osmótica e podem ser várias: o citrato de sódio, o cloreto de sódio hipotónico, o cloreto de potássio, o glicerofosfato de potássio e a água bi/tridestilada.

Em relação ao tempo de incubação, este varia entre poucos minutos e cerca de uma hora, mas depende de alguns factores tais como a temperatura e a natureza da cultura celular. De preferência deve realizar-se entre os 23°-37°C a fim de acelerar um pouco o processo, com um volume mínimo dez vezes superior à quantidade de material celular existente.

c. Fixação

Este tratamento tem por objectivo fixar a estrutura celular sem provocar qualquer alteração ao nível dos cromossomas. Embora existam igualmente inúmeros fixadores, o mais usual é uma solução fresca de ácido acético glacial e metanol na proporção de 1:3. Após 30 minutos da adição desta solução ao material celular, forma-se um composto – o acetato de metil – que deixa de actuar como fixador e melhora visivelmente a definição dos cromossomas.

O tempo de tratamento com fixador pode variar entre 10 minutos e 24 horas, desde que após a primeira fixação das três recomendadas, o material celular permaneça a baixas temperaturas. A quantidade de solução utilizada deve sempre exceder, no mínimo, dez vezes o volume do material celular.

d. Montagem e Coloração

A montagem do material celular sobre a lâmina pode ser implementada pelo recurso a choques térmicos, submetendo a lâmina a um arrefecimento/aquecimento brusco. Após um período de secagem, pode realizar-se de imediato um estudo da morfologia dos cromossomas ou, caso se pretenda um estudo de marcação cromossómica – “banding” – submeter a lâmina a um período de envelhecimento celular (Dutrillaux, 1975).

A coloração tem por objectivo aumentar o contraste permitindo a observação microscópica. Pode ser efectuada recorrendo a diversos compostos (safranina, carmim acético, orceína acética, hematoxilina, Giemsa, Feulgen) dos quais o mais usado actualmente é o Giemsa. Normalmente utilizado a 4% com uma solução fosfato tamponada de pH=6,8, tem um tempo de actuação de 5 a 15 minutos e permite simultaneamente a fixação do material e uma boa definição das regiões centroméricas dos cromossomas.

1.3.2.2 Marcação Cromossómica (bandeamento)

As primeiras técnicas induziam uma coloração uniforme permitindo, apenas, a identificação dos cromossomas com base no tamanho e na forma sendo, ainda impossível, a distinção dos braços “p” e “q” em metacêntricos. À excepção de algumas espécies, em geral o bandeamento cromossómico tem de ser induzido e, normalmente, é aplicado quando os cromossomas se encontram em metafase ($2n$, $4C$) ou, mais modernamente em alguns grupos (em especial mamíferos), numa fase anterior, de menor compactação (pro-metáfase ou mesmo profase).

a. Marcação dos Organizadores Nucleolares (NORs)

Os NORs são regiões onde o nucléolo se encontra no período interfásico e são constituídos por múltiplas cópias de sequências de DNA responsáveis pelo RNA ribossómico. Estas unidades possuem uma zona de transcrição com regiões codificantes, altamente conservativas, para os genes 5S, 18S e 28S do rDNA (pois é nos nucléolos que se formam os ribossomas). De um modo geral, os NORs encontram-se localizados nas constrições secundárias dos cromossomas.

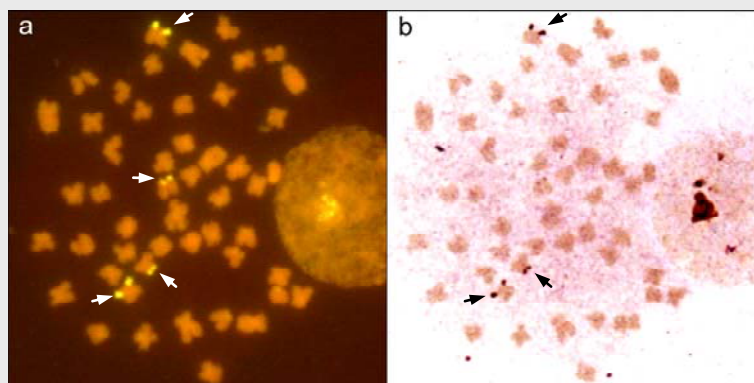
As técnicas mais usadas na detecção dos NORs nos cromossomas dos peixes, são as que recorrem ao nitrato de prata ($AgNO_3$) e à cromomicina A_3 (CMA_3) (caixa 3). A correlação entre os NORs Ag e CMA_3 tem sido analisada em várias espécies de peixes (e.g. Jankun et al. 2001, Rábová et al. 2003; Gromicho e Collares-Pereira, 2004). Os

NORs podem ser usados como excelentes marcadores populacionais, evidenciando em diversos grupos de peixes um elevado polimorfismo, não só a nível inter- como intra-específico (Ozouf-Costaz e Foresti, 1992). Estas variações podem afectar: o número de NORs por genoma; a sua localização cromossómica; o seu tamanho relativo a nível individual e o número de NORs activos. As duas primeiras categorias variam de um modo inter-específico, enquanto as duas últimas variam de um modo intra-específico (intra-e/ou inter-populacional).

Caixa 3: CMA₃ / AgNO₃ - NORs

A marcação por AgNO₃ parece estar relacionada com a actividade dos genes ribossómicos, uma vez que a prata se liga a um tipo de proteína básica (que não uma histona) que está associada à cromatina dos NORs. Embora seja uma técnica relativamente simples, tem surgido uma grande controvérsia acerca do seu significado biológico (Jiménez et al. 1988). Segundo este autor, apenas os NORs que estiveram activos na interfase do ciclo celular anterior, vão apresentar uma marcação positiva. No entanto, Medina et al. (1986) sugerem que a presença da prata indica cromatina potencialmente activa, caracterizada por uma estrutura despiralizada e extensa, independentemente do seu estado de actividade.

A CMA₃ é um fluorocromo específico para as regiões do DNA ricas em sequências GC. Amemiya e Gold (1986) demonstraram que, nos peixes, este tipo de marcação evidencia os NORs e que, ao contrário da prata, marca positivamente os NORs, independentemente do seu estado de actividade anterior. Porém, Gromicho et al. (2005) verificaram que, em alguns casos, surgiam outros locais activos com a aplicação de sondas ribossómicas 28S, para além dos CMA₃/Ag-NORs activos.



Cromossomas metafásicos de peixe (*C. lusitanicum* do Tejo 1 – v. Fig. 2) com marcação dos Organizadores Nucleolares-NORs (setas); **(a)** marcação por CMA₃ onde se observam 4 sinais NOR positivos **(b)** marcação por AgNO₃ onde se observam apenas 3 sinais NOR positivos.

b. Marcação de Bandas-C

As bandas-C (caixa 4) permitem a visualização da heterocromatina constitutiva e, em geral, estão relacionadas com sequências de DNA altamente repetitivo, como o DNA satélite. Este marcador permite caracterizar cada espécie através do número de bandas, localização e pela quantidade de heterocromatina. Mediante este marcador é possível diferenciar espécies, determinar relações evolutivas e inclusive detectar variabilidade populacional (Panzera et al. 1992, 1995, 1997). No entanto, muitas vezes não há evidências directas deste facto, tendo-se encontrado várias situações em que este tipo de DNA não surge nas bandas-C e, por outro lado, que nem sempre as bandas-C são exclusivamente deste tipo (Sumner, 1990). O padrão desta marcação pode variar consideravelmente nas diferentes espécies. Nos humanos, as bandas-C evidenciam os centrómeros de todos os cromossomas e a heterocromatina não centromérica dos cromossomas 1, 3, 9, 16 e a região telomérica do braço longo do Y. Nos peixes, de um modo geral, as bandas-C são essencialmente centroméricas e teloméricas (Ozouf-Costaz e Foresti, 1992), tendo-se revelado como bons marcadores cromossómicos na identificação de diferentes populações (e.g. Phillips e Zajicek, 1982).

Existem várias técnicas que permitem a sua observação: tratamento por soluções alcalinas como o hidróxido de bário ou de sódio, pela ureia, por choque térmico e por aumento do pH. No entanto, o tratamento por hidróxido de bário, também conhecido por BSG (Sumner, 1972), é o mais generalizado e tem sido utilizado pela maior parte dos autores nos estudos de peixes (e.g. Artoni et al. 1999; Sola e Gornung, 2001; Ueda et al. 2001; Ocalewicz et al. 2004).

c. Marcação com Enzimas de Restrição (ERs)

As ERs (caixa 5), também designadas por endonucleases de restrição, são usualmente aplicadas para a obtenção *in vitro* de ácidos nucleicos purificados. No entanto, Lima-de-Faria et al. (1980) demonstraram ser possível a digestão *in situ* de cromossomas uma vez que produzem um padrão de marcação específico para cada enzima. Em geral, produzem um padrão de bandas idêntico às bandas G e C mas nem sempre originam o mesmo tipo de bandejamento nas diversas espécies. Por exemplo, *AluI* e *MboI* originam bandas-C, *HaeIII* origina bandas-G nos primatas, e a *TaqI* pode reproduzir bandas-G nos cromossomas humanos. Segundo Lloyd e Thorgaard (1988), os factores responsáveis por este tipo de coloração diferencial dos cromossomas após digestão com endonucleases são, diferenças na sequência de bases ao longo dos

cromossomas e na estrutura da cromatina, que tornam algumas áreas do DNA mais susceptivas à digestão enzimática.

Embora o uso de endonucleases se torne dispendioso, é particularmente aplicado a espécies que não apresentam bons bandeamentos, como é o caso dos anfíbios, plantas e peixes (Clark e Wall, 1996).

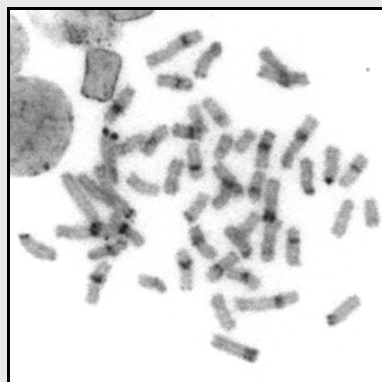
Desde a recente descoberta de que o bandeamento por endonucleases é compatível com a aplicação do FISH, que esta técnica se tornou ainda mais vantajosa (Chaves et al. 2002). E quando aplicada em conjunto com diferentes enzimas poderá ser útil na detecção da heterocromatina não evidenciada pelas técnicas de bandeamento standard (Leitão et al. 2004).

As endonucleases *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* e *DdeI*, têm sido aplicadas com algum sucesso na identificação de padrões de marcação cromossómica em peixes e outras espécies aquáticas (e.g. Lloyd e Thorgaard, 1988; Lozano et al. 1991; Sánchez et al. 1991; Cau et al. 1992; Jankun, 2004; Leitão et al. 2004).

Caixa 4: Bandas-C

Este tipo de bandas é geralmente induzido pelo tratamento com ácido clorídrico (HCl) seguido de um tratamento com hidróxido de bário e incubação numa solução salina aquecida, sendo por último coradas com Giemsa ou com DAPI.

A acção do HCl des-purina os cromossomas sem quebrar as ligações fosfato-açúcar da molécula de DNA, parando a reacção antes da degradação total do DNA. O tratamento alcalino que se segue desnatura o DNA e a incubação a quente numa solução salina quebra aquelas ligações e os fragmentos de DNA passam para a solução. Após coloração, são evidenciadas as regiões de DNA e proteínas que se mantiveram intactas e que formam a heterocromatina constitutiva.



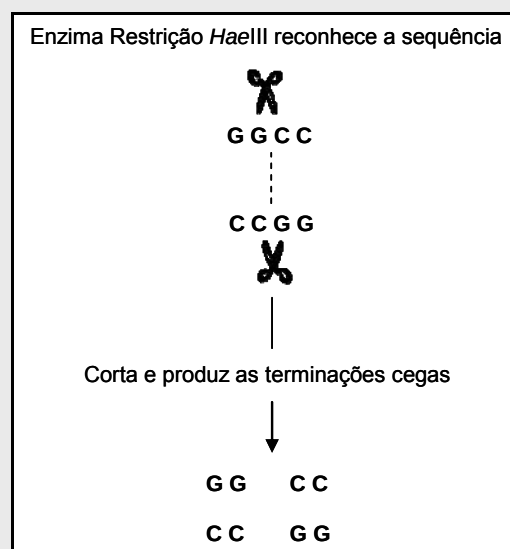
Cromossomas metafásicos de peixe (*C. lusitanicum* do Tejo 1 – v. Fig. 2) com bandeamento-C que permite a observação dos locais de heterocromatina constitutiva (zonas mais escuras).

Caixa 5: Enzimas de Restrição

AS ERs são cadeias de proteínas específicas de origem bacteriana que têm como função reconhecer e cortar sequências específicas de DNA, normalmente 4-7 pb, catalisando a destruição de uma ligação fosfodiéster entre dois nucleótidos consecutivos ligados a determinadas bases. Os nucleótidos entre os quais a enzima corta, isto é, entre os quais promove a hidrólise, encontram-se no interior dessas mesmas sequências específicas de reconhecimento.

Hoje em dia conhecem-se centenas de enzimas de restrição isoladas de numerosas bactérias. A sua nomenclatura é determinada pela sua origem, ou seja, está relacionada com o organismo de onde esta foi isolada e associada à especificidade da sequência de DNA em cadeia dupla que reconhece bem, como aos locais em que dentro dessa sequência, procede à sua separação: as primeiras três letras surgem do nome da bactéria (p.ex. *Eco* de *Escherichia coli*) e, a quarta letra, da cadeia proteica (p.ex. *EcoR*). No caso de surgir mais do que uma enzima na mesma cadeia, recorre-se à numeração romana, por exemplo, à primeira ER proveniente da *E. coli* RY13 dá-se o nome de *EcoRI* e à terceira ER de *Haemophilus aegyptius* a denominação *HaeIII*.

As diversas ERs diferem entre si em termos da sua especificidade no que respeita à natureza e extensão da sequência de nucleóticos que reconhece, e à forma como cortam o DNA alvo. Deste modo, podem reconhecer sequências específicas de quatro, seis ou oito pares de nucleótidos presentes no DNA em cadeia dupla, e cortar no interior dessas sequências. Assim um corte num fragmento de DNA por uma ER gera dois fragmentos, podendo as extremidades resultantes desse corte ser de dois tipos: coesivas ou cegas.



Actuação da endonuclease de restrição *HaeIII* na molécula de DNA.

d. Marcação com Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH)

Inicialmente utilizada para localizar apenas regiões de DNA ribossômico e DNA satélite, desenvolveu-se através de técnicas de DNA recombinante permitindo a detecção e localização de sequências únicas de DNA, com poucas centenas de pares de bases. Embora de início as sondas fossem marcadas com nucleótidos radioativos e detectadas por auto-radiografia, esta técnica passou a utilizar a fluorescência.

Nos últimos anos a técnica de FISH (caixa 6) tem-se revelado uma prática de grande impacto no mapeamento de genes, mas também se tornou imprescindível na análise de rearranjos cromossômicos (Verma e Babu, 1995), visíveis com um limite de resolução de cerca de 1 Mb (Hawkins, 1997).

A sequência repetitiva (TTAGGG)_n, encontrada nos telômeros dos cromossomas, é uma característica observada em todos os vertebrados (Meyne et al. 1989). Os telômeros são estruturas especializadas localizadas nas regiões terminais dos cromossomas, que preservam a integridade e a estabilidade do genoma (Blackburn, 2001). As sondas teloméricas podem ser úteis para testar hipóteses de evolução cromossômica em diversos casos, mais precisamente, naqueles onde se verificam rearranjos entre cromossomas (Phillips e Reed, 1996). As fusões cromossômicas que sofrem perda de sequências teloméricas são consideradas estáveis (Slijepcevic, 1998) e nem todos os rearranjos produzem sinais teloméricos intersticiais por FISH (e.g. Caputo et al. 1998; Rossi et al. 2005).

Algumas espécies de peixes que têm sido estudadas com sondas teloméricas incluem o grupo dos Cypriniformes (Meyne et al. 1989; Sola e Gornung, 2001; Gromicho et al. 2006) e dos Salmoniformes (Reed e Phillips, 1995).

1.3.2.3 Tamanho do Genoma

Os ciprinídeos constituem um grupo polifilético (Nelson, 1994) com uma significativa plasticidade ecológica por se encontrarem em sistemas aquáticos dulciaquícolas muito diferenciados que, segundo vários autores, poderá estar relacionado com a plasticidade do próprio genoma. Deste modo, no que se refere ao número de cromossomas, é um grupo muito complexo com diversos níveis de ploidia: espécies consideradas diplóides (cerca de 50 cromossomas) tetraplóides (cerca de 100 cromossomas), hexaplóides (cerca de 150 cromossomas) e ainda triplóides que derivaram de hexaplóides (cerca de 450 cromossomas) (Collares-Pereira, 1994; Kinkhardt et al. 1995), mas com um valor modal bem definido de $2n=50$ (Ráb e Collares-Pereira, 1995). No que se refere ao

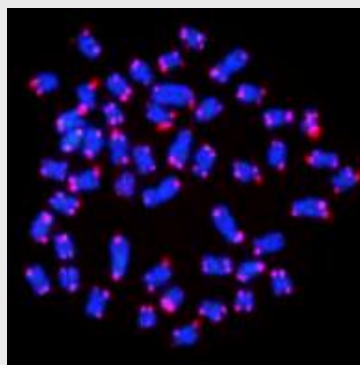
tamanho do genoma, a variabilidade descrita pode ir desde 1,8 a 19,3 picogramas (revisto em Collares-Pereira e Moreira da Costa, 1999).

Caixa 6: Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH)

A FISH é um método citogenético-molecular onde são usadas sondas de DNA, com sequências de bases complementares, ao cromossoma ou à região cromossômica que se pretende estudar. Estas sondas são marcadas com fluorocromos para permitir a sua identificação quando analisadas ao microscópio. O princípio básico é o emparelhamento específico entre as duas sequências.

Em relação à citogenética clássica, tem a vantagem de poder avaliar as células tanto durante a interfase, quanto durante a metafase, sendo um maior número de células avaliadas, o que aumenta a probabilidade de detecção de um clone anormal. A desvantagem é que como são usadas sondas específicas para um determinado cromossoma, apenas a anomalia pesquisada poderá ser detectada, e eventuais alterações noutros cromossomas não serão identificadas.

Existem vários tipos de sondas disponíveis dependendo do objectivo da análise. Algumas são para uso diagnóstico, outras apenas para pesquisa científica: a) sondas específicas para determinadas regiões cromossômicas (sondas centroméricas e teloméricas) e que permitem a avaliação do número de cromossomas e da sua morfologia; b) sondas de pintura cromossômica que coram todo o material originado de um determinado cromossoma do qual a sonda foi feita e só podem ser usadas em células metafásicas; c) sondas de cópias simples de genes ou segmentos que servem para identificar deleções, duplicações, rearranjos estruturais, etc.



Cromossomas metafásicos de peixe (*C. lusitanicum* do Tejo 2 – v. Fig. 2) com marcação por FISH telomérica (All Human Telomere Probe).

A teoria clássica proposta por Ohno et al. (1967) assume a “diploidia” como uma situação plesiomórfica nesta família, e baseia-se na existência de táxones com conteúdo de DNA de 2 e 4 pg. Porém, como havia sido previsto por Collares-Pereira e Coelho (1989), na sequência de estudos citogenéticos (Collares-Pereira, 1983b; 1985a; 1985b) e enzimáticos (Coelho, 1987) efectuados em endemismos ibéricos dos grupos “diplóide” ($2n=50$) e “poliplóide” ($2n=100$), e de análises do tamanho do genoma em ciprinídeos do grupo diplóide (Collares-Pereira e Moreira da Costa, 1999), verificou-se que a congruência proposta inicialmente não se verifica obrigatoriamente. Segundo esses autores, o ancestral da família teria já um genoma duplicado, sendo necessário re-avaliar a condição plesiomórfica assumida na versão mais ortodoxa (v. também Collares-Pereira, 1994).

A aplicação da citometria de fluxo (caixa 7) ao estudo do conteúdo de DNA nuclear é, sem dúvida, uma alternativa aos métodos clássicos de contagem de cromossomas ao microscópio (i.e. citogenéticos). Comparativamente, é uma técnica mais simples e rápida, não necessita de células em divisão, permite detectar a existência de mixoploidias e não é destrutiva visto exigir apenas algumas gotas de sangue dos indivíduos em estudo.

1.4 Objectivos

Dada a recente descoberta de um táxone distinto – *C. almaiai* – no sul de Portugal e o facto destas populações terem sido consideradas como pertencentes à espécie *C. lusitanicum*, para a qual havia sido descrito um elevado e atípico polimorfismo cromossómico (v. Rodrigues e Collares-Pereira, 1996; Collares-Pereira e Ráb, 1999), o presente estudo teve como objectivo principal a redefinição do cariótipo de *C. lusitanicum*, considerando o seu recente confinamento geográfico. Foi efectuado em novas amostragens de várias populações, de modo a pesquisar a variabilidade intra- e interpopulacional, com base em material obtido *in vivo* por suspensão celular directa do rim cefálico e *in vitro* por cultura de fibroblastos, recorrendo aos marcadores cromossómicos anteriormente utilizados e, ainda, a novos marcadores.

De modo a permitir uma abordagem mais abrangente, teve, ainda, como objectivos específicos:

- 1) o estudo da variabilidade interpopulacional da espécie no que respeita ao conteúdo de DNA nuclear através da técnica de Citometria de Fluxo;
- 2) o estudo morfológico comparativo das mesmas populações, usando como referência a respectiva série-tipo; e
- 3) a comparação dos padrões citogenético e morfológico obtidos, bem como dos dados referentes ao tamanho do genoma com a informação disponibilizada por um estudo

paralelo desenvolvido por Carvalho (2006) que visou definir especificamente o cariótipo de *C. almaiai*, dadas as relações filogenéticas existentes entre as duas espécies.

Caixa 7: Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas suspensas numa solução aquosa. A medição em fluxo permite análises de alta velocidade (ex. $10^2 - 10^3$ partículas por segundo) e garante que as células analisadas são seleccionadas aleatoriamente de toda a população celular (Doležel, 1997).

Desenvolvida nos finais dos anos 50, para contagem e análise de células sanguíneas, a citometria de fluxo expandiu-se a outros estudos e tipos de células graças à inovação tecnológica e ao aparecimento de novos marcadores fluorescentes. Na realidade, esta técnica tem diversas aplicações como a detecção e contagem de microorganismos (e.g. Silva et al. 2004), análise de ploidias (e.g. Birstein et al. 1993; Collares-Pereira e Moreira da Costa, 1999), determinação do sexo em aves (e.g. Nakamura et al. 1990) e hibridação em peixes (e.g. Goddard e Dawley, 1990).

Uma das maiores vantagens da citometria de fluxo reside no facto de permitir a quantificação de DNA em qualquer fase do ciclo celular, uma vez que cada célula é avaliada separadamente e o DNA total é o mesmo, independentemente do grau de contracção cromossomal. Permite, ainda, analisar milhares de células em poucos segundos detectando a existência de ploidias distintas (mosaicos) caso surjam na população celular amostrada (Kent e Wachtel, 1988) e uma boa padronização na preparação das amostras. Contudo, a precisão desta técnica não depende só da preparação e manutenção da amostra, como, também, da calibração do aparelho utilizado (citómetro de fluxo). O seu controlo pode ser efectuado recorrendo a padrões de calibração do aparelho como fluorosferas marcadas, núcleos corados de glóbulos vermelhos de galinha (CRBC) ou leucócitos humanos permitindo, assim, ajustar o equipamento de forma a obter um sinal de amplitude máximo e coeficientes de variação mínimos (Doležel, 1991).

Nesta técnica, a determinação do conteúdo de DNA nuclear é obtida por comparação com um referencial o qual pode ser preparado separadamente da amostra em estudo, sendo verificado antes e depois de cada leitura da amostra (padrão externo), ou preparado em conjunto com a amostra (padrão interno). É usual recorrer-se aos CRBCs e aos leucócitos humanos como referenciais de estudo de outras amostras, uma vez que é conhecido o tamanho dos respectivos genomas: 7,0 pg para *Homo sapiens* e 2,5 pg para *Gallus domesticus* (Tiersch et al. 1989).



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Enquadramento Geográfico dos Locais de Amostragem

O presente estudo foi efectuado com exemplares de populações distintas de *C. lusitanicum* capturados nos seguintes sistemas aquáticos (Figura 2):

- ✕ **Ribeira da Samarra:** saída de campo a 20 de Outubro de 2004, a 26 de Junho e 9 de Dezembro de 2005
Long: 9° 26' 01" Lat: 38° 53' 37"
- ✕ **Ribeira de Rio Maior (Tejo 2):** saída de campo a 9 de Maio de 2005
Long: 8° 57' 23" Lat: 39° 20' 27"
- ✕ **Ribeira de Raia (Tejo 1):** saída de campo a 12 de Janeiro de 2005
Long: 8° 11' 14" Lat: 38° 56' 25"

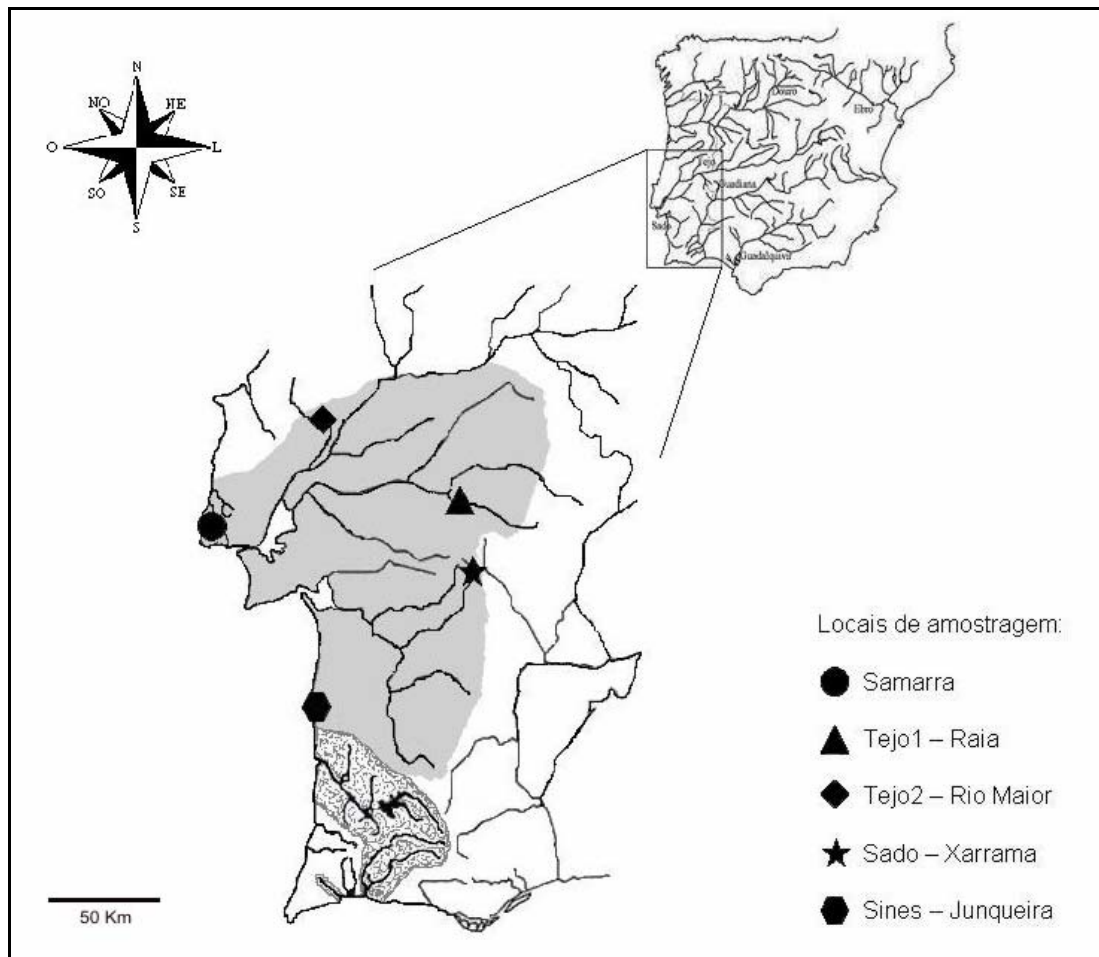


Figura 2: Mapa ilustrativo da distribuição geográfica de *Chondrostoma lusitanicum* (□) (Ribeira da Samarra, Bacia Hidrográfica do Tejo, Bacia Hidrográfica do Sado e Sines), e de *Chondrostoma almakai* (▤) (Bacias de Mira, Arade e Bensafim) e locais de amostragem das populações de *C. lusitanicum* estudadas.

Foram ainda utilizados dados de amostragens de trabalhos anteriores nomeadamente referentes à população da Ribeira da Junqueira (Sines) e à série-tipo da Ribeira de Xarrama (Bacia Hidrográfica do Sado) (Carvalho, 2006 e Collares-Pereira, 1983, respectivamente).

2.2 Recolha e Manutenção dos Exemplares

Os exemplares foram capturados em zonas de reduzida profundidade e corrente, não só devido às limitações da técnica de captura mas, também, porque a espécie estudada apresenta uma preferência por estes locais, sendo menos abundante nos cursos de água principais (Magalhães et al. 2003; Coelho et al. 2005).

Para a captura dos exemplares foi utilizado um aparelho fixo de pesca eléctrica (equipamento Hans Grassl) com a aplicação de voltagens entre os 300 e os 500 volts (2-4 amperes) (Figura 3), devido ao bom rendimento de captura e à baixa selectividade que apresenta, permitindo a libertação dos exemplares das outras espécies no sector aquático. Quando necessário, foram também utilizados aparelhos de pesca artesanal como redes de cerco e camaroeiros. Posteriormente, os peixes foram transportados em contentores térmicos para o laboratório e, aqueles que eventualmente morreram durante o percurso, foram colocados e conservados em álcool etílico a 96%. No laboratório, os animais foram mantidos em aquários preparados para o efeito, arejados com bombas difusoras e sob condições de luz natural, até à sua manipulação.



Figura 3: Fotografia ilustrativa de um dos locais de amostragem (Ribeira do Tejo 2) e exemplo da pesca eléctrica.

2.3 Número de Exemplares Utilizados

Do total de indivíduos de *C. lusitanicum* (226) capturados nas Ribeiras da Samarra, Rio Maior e Raia e usados para a análise morfológica, apenas alguns foram manipulados para as restantes análises, não só devido às más condições em que se encontravam como, também, à dificuldade na obtenção de resposta nos procedimentos utilizados. Os restantes dados referentes a 42 indivíduos, como mencionado anteriormente, foram cedidos de trabalhos efectuados na Ribeira da Junqueira (30) e na Ribeira de Xarrama (12). De referir que uma parte significativa dos indivíduos foi utilizada em diferentes abordagens. Na Tabela 1 é apresentado o número de exemplares de cada ribeira usados nas sucessivas fases deste estudo.

População	Morfologia	Citogenética					Citometria Fluxo
		2n	CMA ₃ /AgNOR	Bandas-C	ER	FISH	
Samarra	94	36	36	2	12	2	81
Tejo 1	40	21	19	2	9	3	30
Tejo 2	50	20	20	2	8	2	25
Junqueira	30	9	9	—	—	—	17
Xarrama	12	—	—	—	—	—	—
Total	226	86	84	6	29	7	152

Tabela 1: Número de exemplares de *C. lusitanicum* analisados por população nas sucessivas fases do trabalho: morfologia, valor diplóide (2n), marcação com cromomicina A₃ e prata (CMA₃/AgNOR), marcação com Bandas-C, digestão *in situ* através de enzimas de restrição (ER), Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH) e citometria de fluxo.

2.4 Análise Morfológica

De acordo com Collares-Pereira (1983a) foram estudados todos os peixes que se encontravam em perfeitas condições morfológicas, isto é, com as barbatanas pélvica, dorsal e anal completas e sem as escamas da linha lateral danificadas. Deste modo, os peixes foram correctamente identificados e fixados numa solução aquosa de formaldeído comercial a 4% durante 4-5 dias. Findo este período procedeu-se à sua lavagem em água corrente até à eliminação total do odor a formol e subsequente conservação em etanol a 96%.

Posteriormente, os espécimes foram fotografados do lado esquerdo com a ajuda de uma câmara digital e um referencial (régua). Procedeu-se, então, ao estudo dos caracteres morfológicos quantitativos, expressos por variáveis descontínuas ou merísticas, e por variáveis contínuas ou morfométricas.

As cinco **variáveis merísticas** adaptadas de Collares-Pereira (1983a) foram estudadas com o auxílio de uma lupa binocular (Wild M₃ Heerbrugg) sendo a descrição de cada uma delas apresentada em seguida:

- ✕ **Escamas da linha lateral (LL)** – número de escamas no flanco do peixe que apresentam poros sensoriais e que se estendem desde a zona superior do bordo do opérculo até à região central da barbatana caudal. Não foram consideradas as escamas duplicadas em qualquer zona da linha lateral;
- ✕ **Fiadas transversais superiores e inferiores (Fsup e Finf)** – número de escamas na fiada transversal entre a linha lateral e o início da barbatana dorsal, e entre aquela linha e a inserção da barbatana pélvica, respectivamente. A contagem foi feita transversalmente, do lado esquerdo e na zona de transição entre o flanco esquerdo e o direito a escama foi contada apenas como ½;
- ✕ **Raios da barbatana dorsal e anal (RD e RA)** – número de peças esqueléticas ramificadas que suportam as referidas barbatanas. Dado o facto de existirem dois tipos de peças, raios simples e ramificados, foram apenas registados estes últimos, uma vez que os restantes não apresentam variação;
- ✕ **Branquispinhas (Branq)** – são estruturas esqueléticas de filtração presentes nos arcos branquiais, constituindo duas fiadas opostas nos filamentos branquiais. Tanto o número como a forma destas estruturas existentes na fiada externa do primeiro par de arcos branquiais são particularmente importantes do ponto de vista taxonómico em vários géneros de ciprinídeos, dada a sua forte determinação genética (Collares-Pereira, 1983; Coelho, 1987). Estes autores referem que não existe, em geral, uma assimetria significativa no número destas estruturas, como tal, apenas foi estudado o arco esquerdo. Para se proceder à contagem das branquispinhas foi necessário levantar, cuidadosamente, o opérculo, cortar as ligações com um bisturi e extrair o 1º arco branquial que, no final, foi recolocado na mesma posição;
- ✕ **Dentes faríngeos (Desq e Ddir)** – localizam-se nos ossos faríngeos que são exclusivos dos *Cyprinidae*, *Catostomidae* e *Cobitidae* e resultam da ossificação do último (5º) par de arcos branquiais. Ao contrário das branquispinhas, existe frequentemente assimetria entre os dois arcos, pelo que foram ambos estudados. Dada a forte musculatura que acciona os ossos faríngeos, recorreu-se à sua

ruptura com o auxílio de um bisturi, procedeu-se à sua extracção, realizou-se a contagem dos dentes e recolocaram-se nos espécimes na posição original. É frequente a apresentação da fórmula faríngea, que se traduz do seguinte modo: número de dentes faríngeos do osso esquerdo / número de dentes faríngeos do osso direito e, caso apareçam dentes dispostos em mais do que uma fiada, procede-se à sua indicação intercalando um sinal +.

No estudo das **variáveis morfométricas** (Figura. 4) recorreu-se às fotografias dos espécimes sendo todas as medições (em milímetros) sido efectuadas em suporte digital com o auxílio de um sistema software de análise de imagem UTHSCSA Image Tool®. Este método apresenta inúmeras vantagens, de entre as quais se destacam a rapidez e facilidade na obtenção das diversas medidas; a grande precisão das mesmas (até ao centésimo de mm); a possibilidade de reunir as imagens e repetir medições das mesmas; e a obtenção imediata das medidas numa base de dados, sem necessidade do observador as registar manualmente, reduzindo a probabilidade de erros. As variáveis analisadas foram:

- ✖ **Comprimento total (CT)** – distância compreendida entre o ponto mais anterior do focinho e a extremidade do lobo inferior da barbatana caudal quando normalmente espalmados;
- ✖ **Comprimento standard (CS)** – distância compreendida entre o ponto mais anterior do focinho e a base dos raios centrais da barbatana caudal;
- ✖ **Comprimento da cabeça (CC)** – distância compreendida entre o ponto mais anterior do focinho e o mais posterior do osso opercular (excluindo a membrana branquiostega);
- ✖ **Comprimento das barbatanas pélvicas (CP)** – distância compreendida entre a base e a extremidade do último raio simples da barbatana pélvica;
- ✖ **Distância pré-dorsal (DPD)** – distância compreendida entre o ponto mais anterior do focinho e o primeiro raio da barbatana dorsal, medida segundo o plano longitudinal do corpo;
- ✖ **Distância pré-anal (DPA)** – distância compreendida entre o ponto mais anterior do focinho e o primeiro raio da barbatana anal, medida segundo o plano longitudinal do corpo;
- ✖ **Distância pré-orbitária (DPO)** – distância compreendida entre os pontos mais anteriores do focinho e da órbita;
- ✖ **Diâmetro ocular (DO)** – diâmetro da órbita medido segundo o eixo longitudinal do corpo;

- × **Altura pré-dorsal (APD)** – distância entre a região dorsal e ventral, medida no plano sagital, ao nível do primeiro raio simples da barbatana dorsal;
- × **Altura pré-anal (APA)** – distância entre a região dorsal e ventral, medida no plano sagital, ao nível do primeiro raio simples da barbatana anal;
- × **Altura mínima (AM)** – distância mínima existente entre a região dorsal e ventral, ou seja, entre os pontos mais reentrantes do pedúnculo caudal;
- × **Altura da cabeça (AC)** – distância medida no plano sagital entre os pontos cefálicos dorsal e ventral mais afastados.

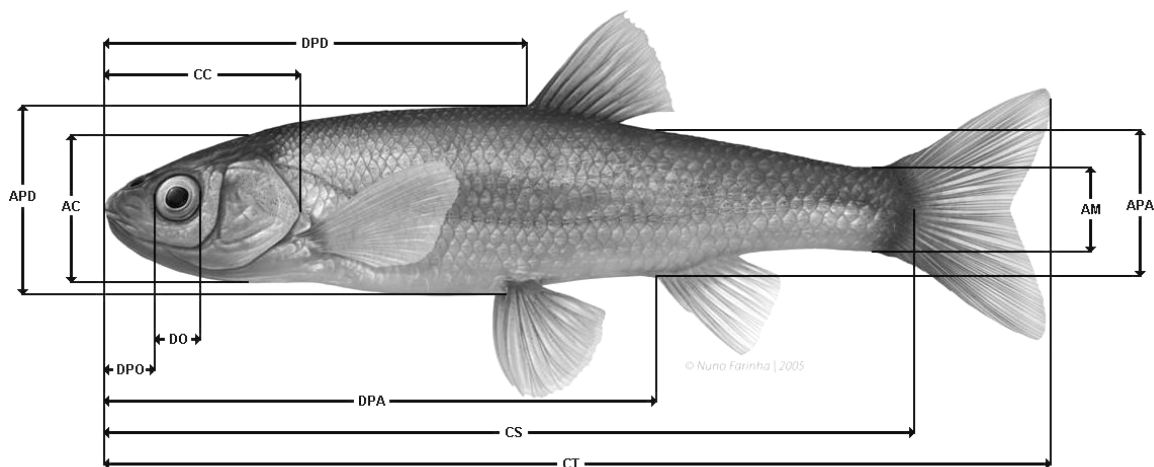


Figura 4: Esquema representativo das variáveis morfométricas estudadas (ilustração científica de Nuno Farinha, 2005).

Terminada a fase de registo de dados, o tratamento estatístico das variáveis merísticas e morfométricas foi efectuado através de uma análise discriminante com o programa Statistica® (versão 7) para Windows. Esta análise é utilizada quando se pretende determinar que caracteres (no caso, as variáveis merísticas e morfométricas) discriminam melhor os indivíduos de dois (ou mais) grupos escolhidos *à priori* (Schaefer, 1991). Para tal, esta função maximiza as diferenças entre grupos no que diz respeito à estrutura da covariância intra-grupo (Humphries et al. 1981). Este tipo de análise compara a matriz de variância/covariância total e a matriz de variância/covariância intra-grupo através de um teste F multivariado, de modo a determinar se existem diferenças significativas entre os grupos, em relação a todas as variáveis estudadas.

De forma a eliminar o efeito do tamanho dos indivíduos e realçar a variabilidade associada à forma, procedeu-se à normalização das variáveis morfométricas através da

logaritmização. Efectuaram-se, igualmente, comparações com a série-tipo de *C. lusitanicum* da Ribeira de Xarrama e com dados obtidos para a população da mesma espécie da Ribeira da Junqueira (Sines).

2.5 Análise Citogenética

Neste tipo de análise foi essencial utilizar todos os exemplares que permaneceram vivos. Para a obtenção de placas metafásicas recorremos a dois tipos de metodologias: *in vivo* através de suspensões celulares directas de rim cefálico e *in vitro* por intermédio de cultura de fibroblastos.

2.5.1 Obtenção de Material Celular

a. Método *in vivo* por Suspensão Celular de Rim Cefálico

O inibidor mitótico utilizado, colchicina a 0,01%, foi injectado intramuscularmente na base da barbatana dorsal numa proporção de aproximadamente 0,1ml de solução por cada grama de peso do peixe, tendo um tempo de actuação de cerca de 1h 30m. Depois de anestesiar os peixes numa solução de MS-222 (tricaine methanesulfonate) a 0.02% até à paragem dos movimentos respiratórios, o que geralmente ocorria passados 2-5 minutos, dependendo do tamanho do peixe, e após a sua morte, procedeu-se à obtenção da suspensão celular segundo Collares-Pereira (1992a). O peixe foi dissecado ventralmente de forma a extrair os rins, nomeadamente a sua região cefálica. O material foi colocado sobre uma grelha, raspado e reduzido a uma suspensão celular à qual se adicionou uma solução hipotónica (0,075M de KCl) previamente aquecida a 37°C. Transferiu-se todo o material para um tubo de centrífuga e colocou-se, durante 30 minutos, num banho-maria à mesma temperatura (este tempo poderá variar de acordo com o material).

b. Método *in vitro* por Cultura de Fibroblastos

O método, descrito em Rábová et al. (in press) consiste em usar estruturas de peixe regeneráveis como fragmentos de barbatanas, que são rapidamente passados por álcool a 70% e cortados com uma tesoura esterilizada e transferidos para uma solução de PBS (v. Anexo II) e antibiótico/antimicótico (Sigma) numa proporção de 3:1 durante cerca de 1-2 horas. Este passo, adaptado de Fontana et al. (1995), veio substituir a passagem por

uma solução de hipoclorito de sódio e de etanol proposta anteriormente por Amemiya et al. (1984), permitindo uma esterilização eficaz e um crescimento mais rápido das culturas. Seguidamente, e já numa câmara de fluxo laminar (Woerden Type DLF Bss4) e em condições de assépsia, as barbatanas foram lavadas três vezes em meio simples (Leibovitz's L-15 com L-glutamina, Sigma – v. anexo II) e cortadas em pequenos pedaços (explantes) com o auxílio de bisturi e pinça estéreis. Esses explantes foram cuidadosamente transferidos com “loops” para o interior de frascos de cultura de 25cm², cujo fundo tem um elevado poder de aderência. Seguidamente foram adicionadas algumas gotas de meio completo (v. anexo II) nas arestas da caixa para evitar a dissecação dos explantes, e transferidos para uma estufa a 28-30°C por 2-4 semanas durante as quais o meio de cultura foi regularmente renovado após a monitorização do processo de crescimento das células (fibroblastos) com o auxílio de um microscópio de inversão (Olympus CK2 NLWCD 0,30). Quando a confluência foi da ordem dos 70-80%, procedeu-se a uma sub-cultura, ou seja, à transferência dos fibroblastos para frascos maiores (80 cm²). Para tal, o meio foi removido e o frasco lavado com PBS por três vezes consecutivas. Adicionou-se uma solução diluída de PBS com tripsina-EDTA (5 gotas tripsina-EDTA (Sigma) + 1-2ml PBS), deixou-se actuar durante cerca de 2 minutos, Adicionaram-se 10 ml de meio de cultura simples apenas enriquecido com 20% de FBS (Soro Bovino Fetal - Gibco) para suspender a acção da tripsina (enzima), e centrifugou-se durante 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi rejeitado, adicionou-se 10 ml de meio completo, ressuspendeu-se a solução que foi colocada no novo frasco de cultura na estufa. Quando o crescimento celular atingiu novamente 70-80% da superfície do frasco, procedeu-se à colheita dos fibroblastos para a análise citogenética.

Antes de proceder à recolha dos fibroblastos, adicionaram-se 3-4 gotas de colchicina a 0,1% (Sigma) por um período de 4h:30m. Findo este tempo, recorreu-se exactamente ao mesmo processo usado na transferência de fibroblastos até à centrifugação, inclusive. Após este passo, rejeitou-se o sobrenadante, adicionou-se a solução hipotónica previamente aquecida a 37°C e colocou-se a suspensão celular num banho-maria à mesma temperatura durante cerca de 15-20 minutos.

2.5.2. Fixação da Suspensão Celular

Em ambos os métodos, procedeu-se a uma pré-fixação, retirando o tubo de centrifuga do banho-maria e adicionando 4-6 gotas de fixador (metanol + ácido acético glacial na proporção de 3:1) preparado na altura e mantido em gelo. Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi de novo centrifugado durante 10 minutos a 1200rpm. Finalmente, procedeu-

se à fixação juntando lentamente 6-8ml de fixador ao *pellet* ressuspendido e, após 10 minutos em gelo (tempo mínimo), foi de novo centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes para melhorar a qualidade do processo de fixação da suspensão celular.

2.5.3. Montagem da Suspensão Celular

A montagem das suspensões celulares provenientes de ambos os métodos foi efectuada após a última fixação – rejeitou-se o sobrenadante; ressuspendeu-se o material celular em cerca de 1ml de fixador (este volume pode variar dependendo da quantidade de células obtidas/*pellet*) e procedeu-se ao espalhamento (1-2 gotas de suspensão) em lâminas previamente lavadas e armazenadas em água destilada a 4°C. Deixou-se secar à temperatura ambiente e procedeu-se à coloração da lâmina-teste com uma solução de Giemsa (Merck) a 4% em tampão fosfato (v. Anexo II) durante 5 minutos, findo o qual se passou a lâmina por água destilada. Após um período idêntico de secagem, observou-se ao microscópio óptico e nos casos com bons índices mitóticos, foram montadas mais lâminas do exemplar, as quais foram guardadas a -20°C, para posterior utilização nas técnicas de marcação cromossómica.

2.5.4. Marcação Cromossómica Sequencial dos Organizadores Nucleolares (NORs)

Na detecção dos NORs, as técnicas mais usadas em peixes são as que recorrem à cromomicina A₃ (CMA₃) e ao nitrato de prata (AgNO₃).

a. Marcação CMA₃-NOR

A técnica utilizada, com algumas modificações, foi a descrita por Foresti et al. (1992). As lâminas seleccionadas foram colocadas em tampão McIlvaine/MgCl₂ (v. anexo II) durante 10 minutos, após o que foram retiradas e escurridas, tendo-se então adicionado 150µl de CMA₃ (v. Anexo II), e colocado uma lamela. Procedeu-se à sua incubação em câmara húmida durante 15-20 minutos, lavaram-se em tampão McIlvaine, e foram coradas numa solução de “methylgreen” + Hepes/NaCl (v. Anexo II) por igual período. Seguidamente, procedeu-se de novo à sua lavagem numa solução Hepes/NaCl e secagem. Posteriormente, as lâminas foram montadas com glicerol suplementado com propilgalato e seladas com verniz, para serem observadas ao microscópio de

fluorescência. Todo este processo foi realizado à temperatura ambiente e em condições de pouca luminosidade, a fim de manter a fluorescência da CMA₃.

Uma vez que a marcação dos NORs é sequencial, antes da marcação com nitrato de prata foi necessário proceder à remoção da coloração com CMA₃. Para isso, o verniz e a lamela foram retirados com um bisturi, as lâminas lavadas por três vezes em água destilada durante 10 minutos, colocadas em etanol a 70% por 3 minutos, passadas por água destilada e deixadas secar ao ar.

b. Marcação AgNO₃-NOR

O método seguido foi o de Howell e Black (1980) com algumas modificações. As lâminas, envelhecidas à temperatura ambiente por 2-3 dias ou a 37°C durante a noite, foram colocadas numa placa térmica a 70°C. Quatro gotas de solução de prata (0,5g AgNO₃ + 1ml H₂O_d) e duas gotas de solução de gelatina (0,2g gelatina + 10ml H₂O_d + 0,1ml ácido fórmico) foram colocadas sobre as lâminas que foram seguidamente cobertas por lamelas. Quando começou a aparecer uma coloração castanho-dourado escuro, passaram-se as lâminas por água destilada para remover as lamelas e colocaram-se numa solução de tiosulfato de sódio a 5% durante 5 minutos para remoção dos resíduos de prata em excesso. Por fim, procedeu-se à sua coloração com uma solução de Giemsa 5% durante 5 minutos para obtenção de um melhor contraste.

2.5.5 Marcação Cromossômica por Bandeamento-C

A heterocromatina constitutiva foi detectada de acordo com o método de Sumner (1972), com as seguintes modificações: as lâminas foram envelhecidas durante 2 dias à temperatura ambiente e colocadas em HCl (0,1N) por 6 minutos e em hidróxido de bário entre 30 segundos e 1 minuto; foram rapidamente lavadas em HCl, incubadas em 2XSSC (v. Anexo II) a 60°C durante 30-60 minutos e depois coradas com DAP I(v. Anexo II). Em todos os passos anteriores as lâminas foram lavadas com água destilada.

2.5.6 Marcação Cromossômica com Enzimas de Restrição

O método utilizado foi o descrito por Jankun et al. (2004), para diferentes enzimas de restrição (endonucleases). As enzimas foram diluídas em 45µl de água pura e 5µl de tampão específico para as endonucleases, variando a sua concentração (*AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *HaeIII*) de 0,3–0,5U/µl dependendo da actividade de cada enzima. Adicionou-se

uma gota à suspensão celular anteriormente espalhada na lâmina, colocou-se uma lamela e incubou-se em câmara húmida numa estufa a 65°C durante 16h (este tempo de incubação foi alterado, na sequência de várias tentativas de optimização, de acordo com Leitão et al. 2004). Lavaram-se as lâminas em tampão fosfato para remover as lamelas e o excesso de enzima, e procedeu-se à sua coloração com uma solução de Giemsa 5% durante 5 minutos.

2.5.7 Marcação por FISH (*Fluorescent In Situ Hybridisation*)

Para cada amostra populacional, escolheu-se um dos melhores casos em termos de índice mitótico e seguiu-se o procedimento usualmente descrito para as sondas teloméricas, tendo-se recorrido à sonda “All Human Telomere Probe” (Qbiogene). Para cada lâmina, retirou-se 10µl de sonda, desnaturou-se a 95°C por 5 minutos e conservou-se no gelo durante 30 segundos. A sonda foi pré-hibridada a 37°C por um período de 15–30 minutos e colocada de novo em gelo até ser utilizada. Procedeu-se à desnaturação das lâminas numa solução de 70% de formamida + 2XSSC (pH=7) a 72°C durante 2 minutos, após o que foram desidratadas em 70%, 80% e 100% etanol por 2 minutos cada e secas à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se 10µl de sonda/lâmina, cobriram-se com uma lamela (22x22mm) e incubaram-se “overnight” a 37°C em câmara húmida.

Findo este período, as lamelas foram removidas, efectuou-se uma lavagem em 2XSSC (pH=7) a 72°C durante 5 minutos, colocaram-se as lâminas em 1XPBD (v. Anexo II) à temperatura ambiente por igual período de tempo, removeu-se o excesso da solução com papel de filtro sem deixar secar, e aplicaram-se 20µl DAPI/Antifade (v. Anexo II). Por último as lâminas foram cobertas com lamelas (24x50mm).

2.5.8. Métodos Analíticos

A observação das lâminas foi efectuada com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX60 e o registo das imagens das melhores placas metafásicas por intermédio de uma câmara Olympus DP50 acoplada ao microscópio. Durante a análise da marcação com CMA₃ e da marcação por FISH usou-se a fluorescência e para as restantes marcações apenas a observação em campo claro.

2.5.9 Determinação do Número Diplóide / Obtenção do Cariótipo e NF

A determinação do número diplóide, a caracterização do cariótipo, a determinação da fórmula cariotípica e respectivo número fundamental foram efectuadas segundo o descrito por Collares-Pereira (1983a), mas recorrendo a um software de análise de imagem UTHSCSA Image Tool Version 3.0 e CorelDraw Suite 12. Deste modo, utilizaram-se as imagens obtidas com marcação sequencial para a definição do número diplóide da espécie, e as imagens obtidas com ER/Bandas-C para caracterização e determinação da fórmula cariotípica.

2.6. Quantificação do DNA Nuclear por Citometria de Fluxo

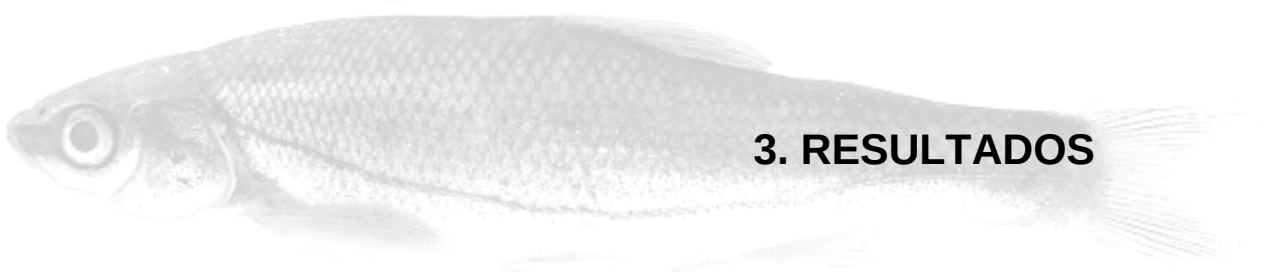
A análise por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA, encontrando-se a amostra a analisar na forma de uma suspensão de partículas individuais. O método usado foi o descrito por Dawley e Goddard (1988). Para cada peixe e com anestesia, colheram-se algumas gotas de sangue por punção da veia caudal, que foram ressuspensas numa solução de criopreservação (v. Anexo II) e posteriormente mantidas a -80°C até à sua utilização (nesta fase, as amostras podem permanecer por longos períodos, sem alteração do DNA). Preparado do mesmo modo, foi usado sangue de galinha para obtenção do padrão de referência. As amostras de eritrócitos foram coradas com uma solução tampão contendo iodeto de propídio durante 20 minutos, protegidas da luz e à temperatura ambiente (30µl de amostra + 300µl de solução tampão).

As leituras das amostras foram efectuadas num Citómetro de Fluxo Epics Profile II (Coulter) após a sua standardização com uma solução padrão de fluorosferas (Flow-Check™ Fluorospheres/Flow-Check™ ref:6605359), para obtenção de um coeficiente de variação inferior a 1% (Vindeløv et al. 1983). Para cada uma das amostras foram realizadas duas leituras de modo a assegurar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e, em cada leitura, foram lidas populações celulares de 10.000 células/indivíduo. Apenas foram aceites as leituras com valores de coeficientes de variação entre 4 e 6% (Dressler e Seamer, 1994). Posteriormente, os dados obtidos foram convertidos e analisados recorrendo aos programas Pro2FCS e WinMDI.

A quantificação do DNA nuclear das espécies estudadas foi obtida usando a fórmula $DNA(pg) = 2,5 * DI$, na qual o valor padronizado de 2,5 picogramas representa o conteúdo

de DNA por eritrócito de galinha e, o índice $DI = (A / B)$, o rácio dos valores médios de fluorescência do peixe (A) e da galinha (B).

Para o tratamento estatístico recorreu-se ao programa Statistica® (versão 7) para Windows, no qual foram calculados os seguintes parâmetros descritivos: a média, o desvio padrão, o máximo e o mínimo para cada uma das amostras. A homogeneidade das médias foi testada com uma análise de variância simples (ANOVA) para um nível de significância de $p < 0,05$. Contudo, o resultado da ANOVA não nos permite concluir qual ou quais as populações que se caracterizam por indivíduos com médias significativamente diferentes, pelo que deverá proceder-se a comparações das médias de cada par de bacias. Esta comparação é feita em termos do valor absoluto das diferenças entre as médias: se a diferença entre duas médias é pequena, então as médias não diferem; se a diferença é grande, então as duas médias são estatisticamente distintas. Contudo, há que fixar um critério que defina o nível de significância das diferenças. Este critério é estabelecido pelo teste de Tukey com base em expressões que relacionam a média das somas dos quadrados (calculada na tabela ANOVA e com base em funções de distribuição de probabilidades).



3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Análise Morfológica

Embora a Ribeira de Rio Maior (Tejo 2) pertença à Bacia Hidrográfica do Tejo, foi analisada separadamente da amostra da Ribeira do Raia (Tejo 1), uma vez que se localiza na margem oposta aquela e para nordeste.

3.1.1 Variáveis Merísticas

No Anexo III encontram-se os dados descritivos relativos aos caracteres merísticos e aos índices morfométricos das várias populações de *C. lusitanicum* estudadas.

As características merísticas apresentaram a seguinte variabilidade nas populações:

- × **Samarra:** LL – (37)44-51(52); FSup – (9,5)10,5-11,5(12,5); FlInf – (4,5)5,5-6,5; RD – (6)7-8; RA – 7-8; Branq – (23)25-31(32); Desq/Ddir – 5-6/(4)5
- × **Tejo 1 (Raia):** LL – 42-49(50); FSup – (9,5)10,5-11,5(12,5); FlInf – (3,5)4,5-5,5(6,5); RD – 7(8); RA – 7-8; Branq – (17)24-29; Desq/Ddir – (5)6/(4)5-6
- × **Tejo 2 (Rio Maior):** LL – 40-46(48); FSup – 9,5-10,5(11,5); FlInf – 4,5-5,5(6,5); RD – 7(8); RA – 7; Branq – (22)23-30(31); Desq/Ddir – (5)6/5-6
- × **Junqueira (Sines):** LL – 42-49(51); FSup – 9,5-10,5; FlInf – 3,5-4,5; RD – 7(8); RA – 7(8); Branq (28)31-39(42); Desq/Ddir – 6/(5)6
- × **Xarrama (Sado) – série-tipo:** LL – (43)45-48(50); FSup – (9,5)10-10,5; FlInf – (3,5)4-4,5; RD – 7; RA – 7-8; Braq – 31-36(41); Desq/Ddir – 6/5-6

Analisando os resultados da análise discriminante efectuada ao conjunto dos indivíduos das diferentes bacias analisadas, com base nas variáveis merísticas, verifica-se que as duas primeiras funções canónicas explicaram cerca de 94% da variância dos dados (v. Tabela 2). Registaram-se diferenças significativas entre as coordenadas de cada população, como demonstrado pelos baixos valores do teste de Lambda de Wilks (v. Tabela 2).

A percentagem de indivíduos correctamente classificados foi de 83%, encontrando-se os resultados para cada população sumariados na Tabela 3.

	Valor próprio	Correlação canónica	Variância captada (%)	Wilks' Lambda
FD1	5,38	0,92	79,2	0,054
FD2	0,99	0,71	14,6	0,345

Tabela 2: Valores próprios, correlações canónicas, percentagens de variância captada pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes (FD) e resultados do teste de Wilks'Lambda, para as variáveis merísticas.

População	Correctos (%)	Samarra p=,37441	Tejo 1 p=,18957	Tejo 2 p=,23223	Xarrama p=,06161	Junqueira p=,14218
Samarra	86,08	68	5	6	0	0
Tejo 1	70,00	6	28	6	0	0
Tejo 2	87,76	0	5	43	1	0
Xarrama	61,54	1	0	0	8	4
Junqueira	96,67	0	0	0	1	29
Total	83,40	75	38	55	10	33

Tabela 3: Número e respectiva percentagem de indivíduos correctamente classificados em cada população com base nas variáveis merísticas.

A projecção dos indivíduos de cada população no espaço, definido pelas duas primeiras funções discriminantes (FD1 e FD2) com base nas características merísticas, mostram que existe uma grande separação entre as populações da Junqueira e de Xarrama e as populações da Samarra, Tejo 1 e Tejo 2 (v. Figura 5). Os caracteres mais significativos (v. Tabela 4) para a FD1 foram o número de escamas da fiada inferior e as branquispinhas, ou seja, verificaram-se diferenças significativas entre as populações da Samarra, Tejo 1 e Tejo 2, que apresentaram um maior número de escamas na fiada inferior, relativamente às populações da Junqueira e de Xarrama, e diferenças significativas entre as populações da Junqueira e de Xarrama, as quais exibiram um maior número de branquispinhas em relação às outras. Os caracteres mais significativos para a FD2 foram o número de escamas da linha lateral e o número de raios da barbatana anal: surgiram diferenças significativas na população do Tejo 2 que apresentou um menor número de escamas da linha lateral e de raios da barbatana anal em relação às outras populações.

Os valores da estatística de F ($32,735=27,701$ com $p<0,0000$, para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população revelaram a existência de diferenças significativas entre eles (v. Tabela 5). Os valores obtidos para as distâncias de Mahalanobis (v. Tabela 6) permitem verificar que a população do Tejo 1 surge mais próximo das populações do Tejo 2 e da Samarra, existindo igualmente uma ligeira maior afinidade com a população da Xarrama do que com a população da Junqueira. De salientar ainda que existem grandes distâncias que separam as populações da Samarra, Tejo 1 e Tejo 2 da população da Junqueira, observando-se o maior distanciamento entre esta última e a Samarra mas uma maior proximidade com a população de Xarrama (v. Figura 5).

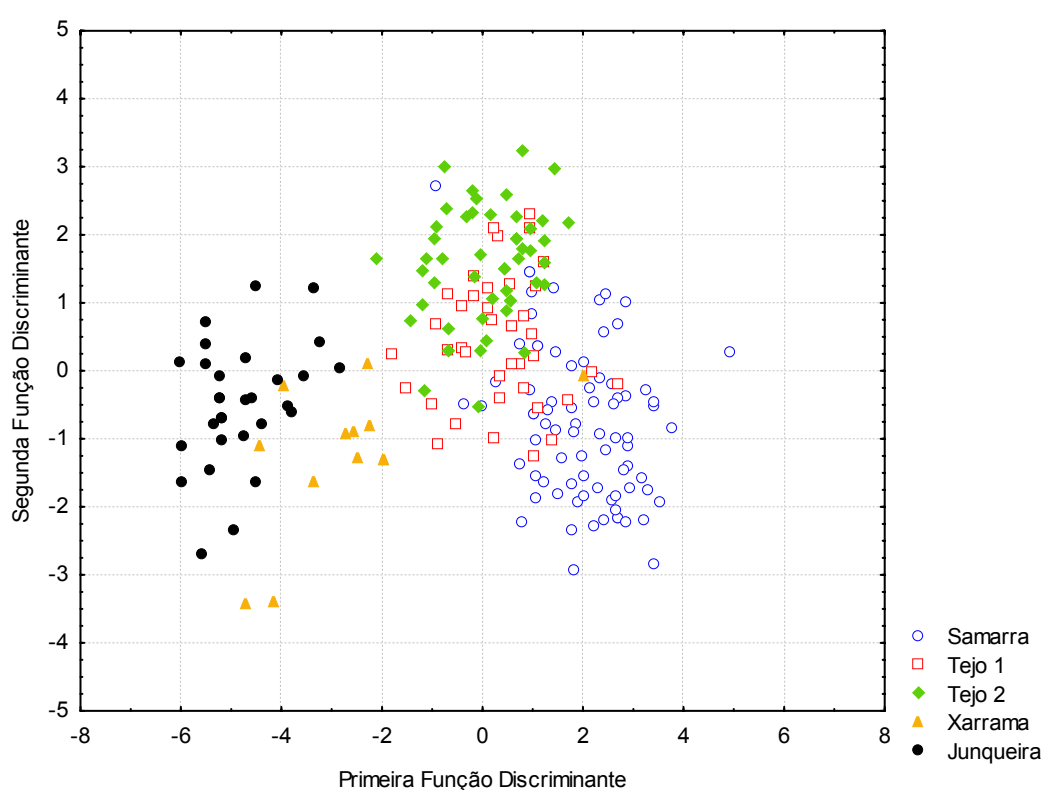


Figura 5: Projecção dos indivíduos no espaço definido pelas funções canónicas discriminantes 1 e 2, com base em oito caracteres merísticos, na qual é notório a separação da população da Junqueira e da Samarra.

	LL	FSup	FInf	RD	RA	Branq	Desq	Ddir
FD1	0,0996	0,4355	0,6096	0,0157	0,2266	-0,5115	-0,1176	-0,3579
FD2	-0,7530	-0,2763	0,1036	0,0317	-0,5603	-0,4370	0,0697	0,1731

Tabela 4: Coeficientes standardizados das funções canónicas que fazem a discriminação entre as bacias estudadas, com base nas variáveis merísticas.

População	Samarra	Tejo 1	Tejo 2	Xarrama	Junqueira
Samarra		19,09713	34,44521	32,08047	122,3345
Tejo 1	19,0971		10,24777	18,13405	59,1362
Tejo 2	34,4452	10,24777		20,73423	63,7939
Xarrama	32,0805	18,13405	20,73423		8,2726
Junqueira	122,3345	59,13620	63,79387	8,27257	

Tabela 5: Valores da estatística F (gl = 8,199) para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada. Todos os valores apresentam níveis de significância inferiores a 0,05.

População	Samarra	Tejo 1	Tejo 2	Xarrama	Junqueira
Samarra	-	5,96	9,43	23,80	46,59
Tejo 1	5,96	-	3,85	15,31	28,57
Tejo 2	9,43	3,85	-	16,71	28,39
Xarrama	23,80	15,31	16,71	-	7,55
Junqueira	46,59	28,57	28,39	7,55	-

Tabela 6: Distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada, com base nas variáveis merísticas.

3.1.2 Variáveis Morfométricas

Analisando os resultados da análise discriminante efectuada ao conjunto dos indivíduos das diferentes bacias para as variáveis morfométricas, verifica-se que as duas primeiras funções canónicas explicam cerca de 85% da variância dos dados (Tabela 7). Registram-se, mais uma vez, diferenças significativas entre as coordenadas dos centróides de cada população, como demonstrado pelos baixos valores do teste de Lambda de Wilks (v. Tabela 7). A percentagem de indivíduos correctamente classificados foi de cerca de 77%, estando os resultados para cada população sumariados na tabela 8.

	Valor próprio	Correlação canónica	Variância captada (%)	Wilks' Lambda
FD1	1,69	0,79	61,0	0,15
FD2	0,66	0,63	23,8	0,41

Tabela 7: Valores próprios, correlações canónicas, percentagens de variância captada pelas duas primeiras funções canónicas discriminantes (FD) e resultados do teste de Wilks'Lambda, para as variáveis morfométricas.

População	Correctos (%)	Samarra p=,37441	Tejo 1 p=,18957	Tejo 2 p=,23223	Xarrama p=,06161	Junqueira p=,14218
Samarra	96,20	76	0	2	0	1
Tejo 1	52,50	6	21	5	2	6
Tejo 2	65,31	11	1	32	3	2
Xarrama	84,62	0	1	0	11	1
Junqueira	73,33	0	6	2	0	22
Total	76,78	93	29	41	16	32

Tabela 8: Número e respectiva percentagem de indivíduos correctamente classificados em cada população com base nas variáveis morfométricas.

A projecção dos indivíduos de cada população no espaço definido pelas duas primeiras funções discriminantes (FD1 e FD2) com base nas características morfométricas, mostram que continua a existir uma separação entre a população da Junqueira e as populações da Samarra e do Tejo 2 (v. Figura 6). Os caracteres mais significativos (v. Tabela 9) para a FD1 surgiram a nível da razão comprimento e altura da cabeça e da distância pré-ocular, ou seja, existem diferenças significativas entre as populações da Samarra e do Tejo 2 por apresentarem uma maior altura da cabeça, relativamente às populações da Junqueira, Tejo 1 e à série-tipo; as populações do Tejo 2 e de Xarrama são significativamente diferentes das outras por apresentarem maiores

distâncias pré-oculares. Os caracteres mais significativos para a FD2 surgiram a nível da razão entre o comprimento standard e as alturas pré-anal e pré-dorsal, isto é, existem diferenças significativas entre a série-tipo e o Tejo 2 com as populações da Samarra, Tejo 1 e Junqueira, dado que estas últimas apresentaram menores razões para as respectivas variáveis.

Os valores da estatística de F ($60,751$)= $7,745$ com $p<0,0000$, para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população revelaram a existência de diferenças significativas entre eles (v. Tabela 10). Os valores obtidos para as distâncias de Mahalanobis (v. Tabela 11) permitiram verificar que a população do Tejo 1 e da Junqueira são muito próximas, existindo igualmente uma maior proximidade da população do Tejo 1 com a população de Xarrama e do Tejo 2 do que com a população da Samarra. As maiores distâncias observam-se entre a população da Samarra e as populações de Xarrama e Junqueira (ver Figura 6).

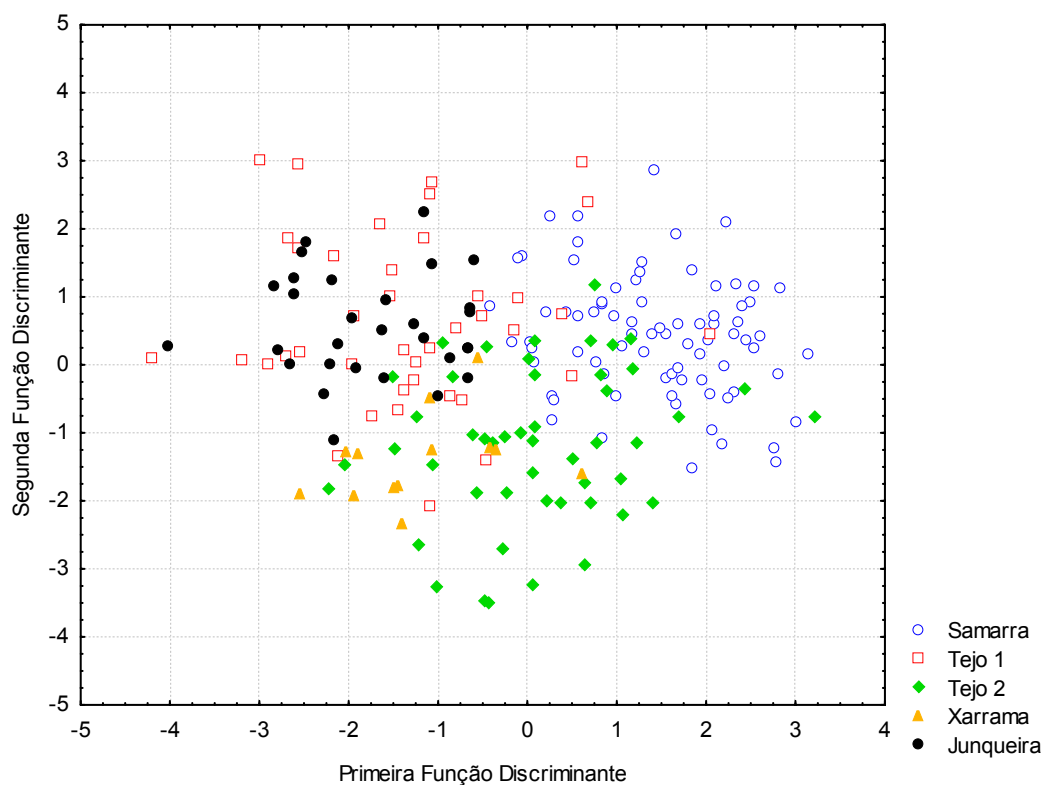


Figura 6: Projecção dos indivíduos no espaço definido pelas funções canónicas discriminantes 1 e 2, com base nas características morfológicas incluídas na análise.

	FD1	FD2
CC/AC	-0,2798	0,1262
CT/CS	0,0349	0,1125
CC/CS	-0,0538	0,1487
AC/CS	0,0276	0,0556
AC/CC	0,4458	-0,1817
AM/CS	0,0652	-0,3863
DPD/CS	-0,0469	0,0614
DPA/CS	-0,3164	0,1634
DPO/CS	-0,4472	-0,2319
DPO/CC	-0,5769	-0,4740
DO/CS	-0,0868	0,1925
DO/CC	-0,0779	0,1776
CP/CS	0,0175	-0,3238
APD/CS	0,3161	-0,4815
APA/CS	0,2210	-0,4633

Tabela 9: Coeficientes standardizados das funções canônicas que fazem a discriminação entre as bacias estudadas, para as variáveis morfométricas.

População	Samarra	Tejo 1	Tejo 1	Xarrama	Junqueira
Samarra		13,80	9,22	8,82	14,65
Tejo 1	13,80		8,16	4,87	2,29
Tejo 2	9,22	8,16		4,21	8,46
Xarrama	8,82	4,87	4,21		4,42
Junqueira	14,65	2,29	8,46	4,42	

Tabela 10: Valores da estatística F (gl = 15,192) para as distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada. Todos os valores apresentam níveis de significância inferiores a 0,05.

População	Samarra	Tejo 1	Tejo 2	Xarrama	Junqueira
Samarra	-	8,36	4,91	12,72	10,85
Tejo 1	8,36	-	5,97	7,99	2,15
Tejo 2	4,91	5,97	-	6,60	7,32
Xarrama	12,72	7,99	6,60	-	7,84
Junqueira	10,85	2,15	7,32	7,84	-

Tabela 11: Distâncias de Mahalanobis entre os centróides de cada população analisada, com base nas variáveis morfométricas.

3.2 Análise Citogenética

A obtenção de placas metafásicas pelo método de cultura *in vitro* foi muito limitada devido essencialmente a questões de carácter logístico. No entanto, os inúmeros ensaios efectuados tornaram possível uma diminuição sensível do tempo de crescimento celular *in vitro*, que passou de cerca de 4-5 semanas para apenas 2-3 semanas: os fragmentos de barbatanas, após serem rapidamente passados por álcool a 70% e cortados com uma tesoura esterilizada, foram colocados numa solução de PBS com antibiótico/antimicótico (Sigma) numa proporção de 3:1 durante cerca de 1-2 horas. Este passo foi adaptado de Fontana et al. (1995), e permitiu substituir a passagem por uma solução de hipoclorito de sódio e de etanol anteriormente utilizadas por Rodrigues e Collares-Pereira (1996), possibilitando uma esterilização eficaz e um crescimento mais rápido das culturas (v. Rábová et al. *in press*).

Dos 128 indivíduos submetidos *in vivo* à acção do agente antimitótico, apenas 86 reagiram positivamente a este pré-tratamento, tendo sido possível submeter às diferentes técnicas de marcação o material referenciado na Tabela 1, dependendo da qualidade das placas metafásicas que é requerida em cada tipo de análise.

No que se refere à definição do **número diplóide** (v. Tabela 12), à excepção de um caso encontrado na Ribeira da Samarra em que 48,1% das metafases obtidas apresentavam 75 cromossomas ($3n=75$, triploide), constatou-se que, das 2.752 metafases observadas, 56,71% apresentavam 50 cromossomas e, as restantes, apenas representaram valores hipomodais, devido a artefactos técnicos. No entanto, em alguns casos (10 metafases) foram observadas contagens superiores àquele valor modal, como por exemplo, poliploidias e algumas células com 51 cromossomas mas, por serem em número muito reduzido em cada caso, foram excluídas.

Em relação à **marcação sequencial dos NORs** com CMA₃/Ag (v. Tabela 13), foram observadas diferenças entre as populações quanto ao número de sinais positivos. Na marcação através do uso de CMA₃, verificou-se que os indivíduos da Ribeira da Samarra e do Tejo 2 possuíam uma percentagem mais elevada de 3 sinais NOR positivos, os indivíduos do Tejo 1 de 2 sinais NOR positivos e a Ribeira da Junqueira de 3 e 4 sinais NOR positivos. Na marcação com a prata, os exemplares da Ribeira da Samarra e do Tejo 2 apresentaram percentagens elevadas para 2 e 3 sinais NOR positivos, os do Tejo 1 e da Junqueira para 2 sinais NOR positivos. Durante a marcação sequencial dos NORs com CMA₃/Ag foram encontrados, essencialmente, dois pares de cromossomas submetacêntricos, que serão referidos como SM₂ (ou par nº 9) e SM₃ (ou par nº 10), sendo o primeiro sensivelmente maior do que o outro par (v. Figura 7).

População	N	Nº cromossomas (2n)				Nº metafases observadas
		47	48	49	50	
Samarra	36	73	178	216	483	950
Tejo 2	20	10	98	125	451	684
Tejo 1	21	46	97	169	431	743
Junqueira	9	37	48	90	190	365
Total	86	166 (6,05%)	421 (15,35%)	600 (21,88%)	1555 (56,71%)	2742

Tabela 12: Número de exemplares e de placas metafásicas analisadas por população para determinação do respectivo valor diplóide.

Este tipo de marcação revelou em todas as populações estudadas, um elevado grau de polimorfismo, tanto no que se refere ao tamanho, como ao número de NORs activos. Este último, também variou de um modo intra- e inter-individual, como se pode ver nos Anexos III.1 e III.2. Geralmente, quando aparecem dois sinais NOR positivos por genoma, localizam-se aparentemente no par 9; quando aparecem três sinais NOR positivos surge, para além do par 9, mais um cromossoma pertencente ao par 10; quando aparecem quatro sinais NOR positivos, surge o outro homólogo do par 10. Observaram-se, ainda, heteromorfismos em relação ao tamanho de um dos NORs entre os homólogos do par 9. Quanto ao espécime triplóide, a maioria (89,1%) das metafases analisadas apresentavam apenas 3 sinais com marcação CMA₃ positiva, aparentemente correspondentes a um cromossoma do par 9 e aos homólogos do par 10; na marcação pela prata cerca de 43% apresentavam 2 NORs activos, geralmente um homólogo activo de cada par, e 54% das placas 3 NORs activos (v. Anexo III.1 e Figura 7).

População	N	Total metafases analisadas	Nº sinais CMA ₃ -NOR positivos (%)				Nº sinais Ag-NOR positivos (%)			
			1	2	3	4	1	2	3	4
Samarra	36	844	4,15	19,91	57,46	18,48	19,19	39,45	35,19	6,16
Tejo 1	19	410	0,73	42,44	28,29	28,54	20,73	45,37	25,61	8,29
Tejo 2	20	556	0,36	17,09	53,06	29,50	16,73	40,11	40,29	2,88
Junqueira	9	214	0,80	7,00	46,80	45,40	15,30	39,70	37,60	7,40

Tabela 13: Número de exemplares e total de placas metafásicas analisadas por população para obtenção das percentagens do número de sinais CMA₃- e Ag-NORs positivos.

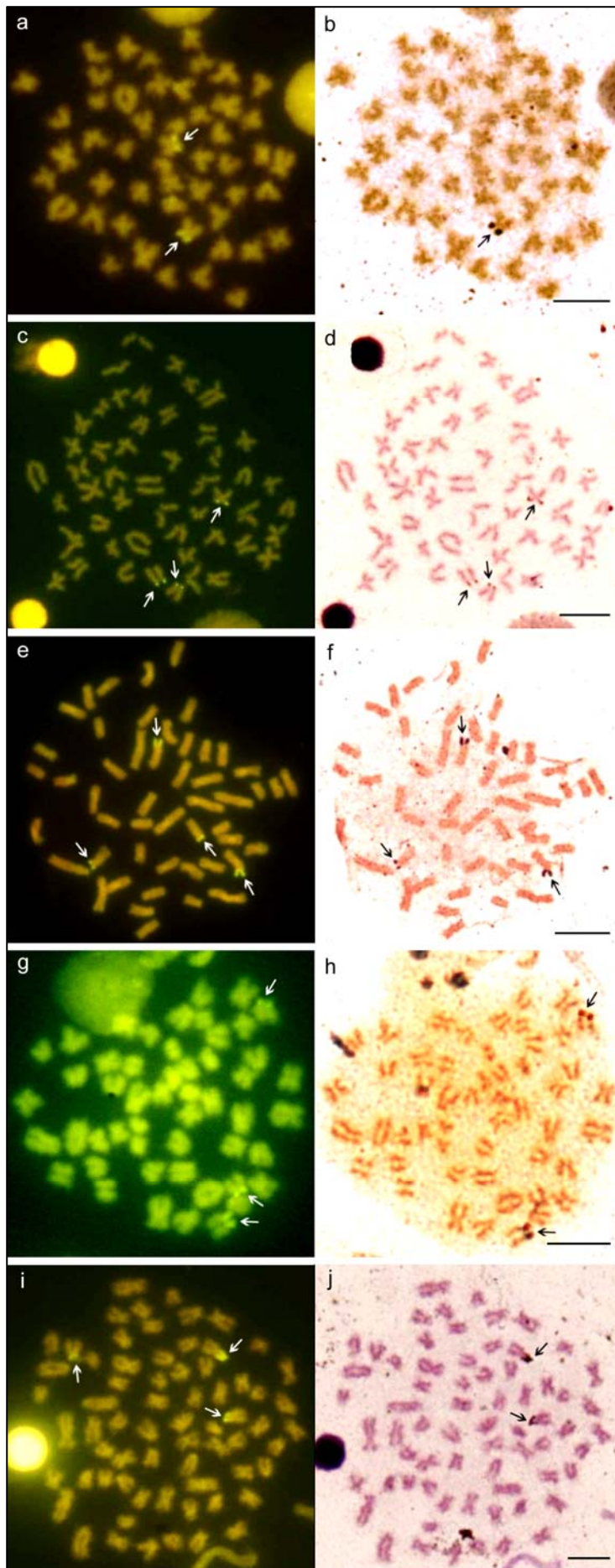


Figura 7: Variação no número de NORs por genoma: placas metafásicas de *C. lusitanicum* obtidas pelo método *in vivo* após marcação com CMA₃ (coluna da direita) e AgNO₃ (coluna da esquerda) (1000X); **(a-b)** Ribeira da Samarra (espécime macho – SR125): 2 sinais CMA₃-NOR e 1 sinal Ag-NOR positivo; **(c-d)** Tejo 2 (espécime fêmea – RMR47): 3 sinais CMA₃/Ag-NOR positivos; **(e-f)** Tejo 1 (espécime fêmea - TR9): 4 sinais CMA₃-NOR e 3 sinais Ag-NOR positivos; **(g-h)** Ribeira da Junqueira (espécime juvenil – CS25): 3 sinais CMA₃-NOR e 2 sinais Ag-NOR positivos; **(i-j)** espécime triploide da Ribeira da Samarra (espécime fêmea-SR120): 3 sinais CMA₃-NOR e 2 sinais Ag-NOR positivos.

As setas indicam os sinais CMA₃/Ag-NORs positivos. Escala correspondente a 5µm.

As **bandas-C** observadas foram essencialmente centroméricas, variando tanto em tamanho como em intensidade no cariótipo. Em todas as populações surgiu um cromossoma submetacêntrico com heterocromatina em todo o braço p, muito provavelmente as regiões NORs que marcaram positivamente. No entanto foram encontradas diferenças entre as populações quanto à localização dos blocos de heterocromatina constitutiva marcadores (maiores), que se apresentaram negativos para os NORs:

- ✱ na população da **Samarra** encontrou-se o maior par de acrocêntricos com heterocromatina terminal – par 23 (v. Figura 8a);
- ✱ na população do **Tejo 2** observou-se apenas um cromossoma submetacêntrico (segundo maior) com um bloco de heterocromatina terminal no braço q (par 9) (v. Figura 8b);
- ✱ na população do **Tejo 1** encontrou-se um par de submetacêntricos (segundo maior) com heterocromatina terminal no braço q (par 9) (v. Figura 8c).

Em geral, em todas as populações, as bandas-C evidenciaram os centrómeros e algumas regiões terminais dos cromossomas. No entanto, surgiram cromossomas onde não foi possível essa observação, talvez pela reduzida quantidade de heterocromatina constitutiva.

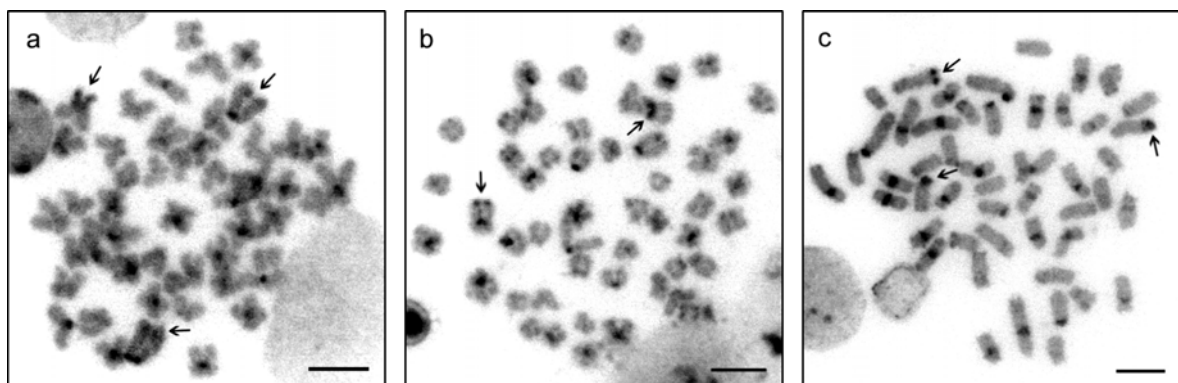


Figura 8: Marcação cromossômica por bandeamento-C em placas metafásicas de *C. lusitanicum* obtidas pelo método *in vivo* (1000X); **(a)** Ribeira da Samarra (fêmea – SR110): um par de acrocêntricos com heterocromatina terminal e um cromossoma submetacêntrico com heterocromatina em todo o braço p; **(b)** Tejo 2 (macho – RMR60): um cromossoma submetacêntrico com um bloco de heterocromatina terminal e um cromossoma submetacêntrico com heterocromatina em todo o braço p; **(c)** Tejo 1 (fêmea – TR9): um par de submetacêntricos com heterocromatina terminal e um cromossoma submetacêntrico com heterocromatina em todo o braço p. As setas indicam os cromossomas marcadores com blocos de heterocromatina constitutiva. Escala correspondente a 5µm.

Em relação à marcação através da **digestão *in situ*** com **ER**, não foi possível encontrar um padrão de marcação consistente para as enzimas *Ddel* e *Hinfl*, possivelmente devido a uma falha técnica na determinação da concentração e tempo de digestão enzimática. No entanto, o mesmo não aconteceu com as enzimas *Alul* e *HaeIII*, as quais evidenciaram um padrão de marcação cromossômica mais conspícuo. Deste modo, foi possível determinar a fórmula cromossômica desta espécie que se caracteriza pela existência de 22 pares de cromossomas com centrômero mediano e submediano, e de apenas 3 pares com centrômero terminal ou subterminal. Consequentemente, o número fundamental é relativamente elevado, $NF=94$, e o cariótipo pode dizer-se assimétrico, dado ser constituído por uma série gradual de homólogos variando pela posição do seu centrômero e pelas suas dimensões relativas, sendo a **fórmula haplóide 7M : 15SM : 3A** (v. Figuras 9 e 10).

Para a **endonuclease de restrição *Alul***, e uma vez que reconhece e corta as sequências de nucleótidos AGCT, foi possível verificar cariótipos com um padrão semelhante ao obtido para as bandas-C, isto é, uma marcação patente dos locais constituídos por heterocromatina constitutiva (DNA altamente repetitivo com sequências GGCC) mas com muito menos intensidade. A **endonuclease de restrição *HaeIII*** demonstrou um padrão ligeiramente mais claro ao nível de alguns centrômeros, pois é uma enzima que reconhece e corta sequências de nucleótidos GGCC.

Ambos os tipos de marcação permitiram a localização da maior parte dos centrômeros, assim como a identificação de alguns pares cromossômicos: o par número 1 que tem centrômero mediano sendo o maior dos metacêntricos; os pares número 8, 9 e 10 que são os três maiores submetacêntricos; o par 22 que é o cromossoma mais pequeno e cujo centrômero é submediano; e o par 23 do grupo dos acrocêntricos.

Não foram detectados cromossomas heteromórficos nas placas provenientes de indivíduos de ambos os sexos, o que sugere a inexistência de um sistema cromossômico de determinação sexual bem diferenciado.

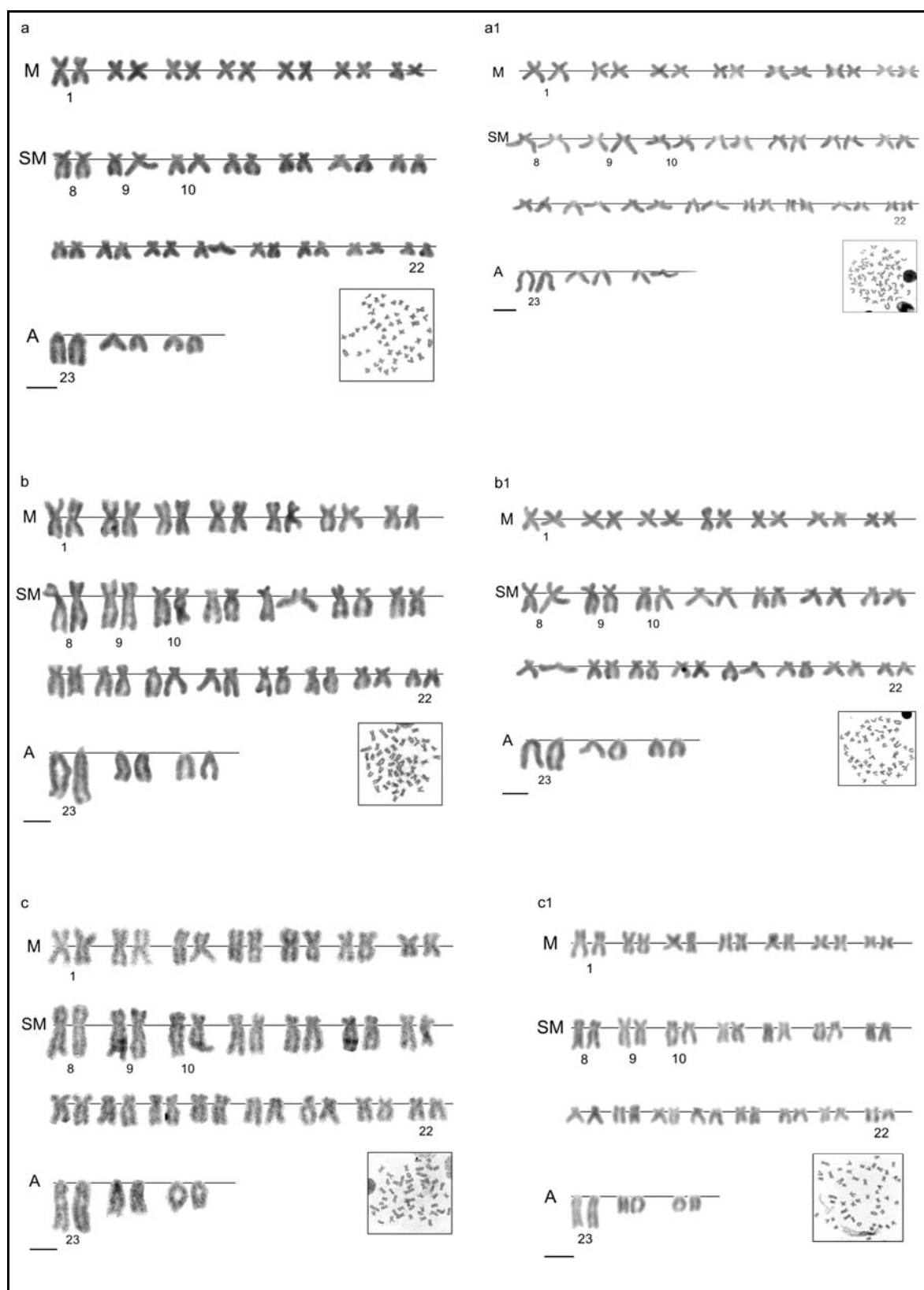


Figura 9: Cariótipos (e respectivas placas metafásicas) de fêmeas de *C. lusitanicum* após digestão *in situ* com a endonuclease *AluI*, obtidos pelo método *in vivo* (1000x); **(a-a1)** Ribeira da Samarra (exemplares SR110 e SR108); **(b-b1)** Tejo 2 (exemplar RMR47); **(c-c1)** Tejo 1 (exemplares TR9 e TR8). Escala correspondente a 5μm.

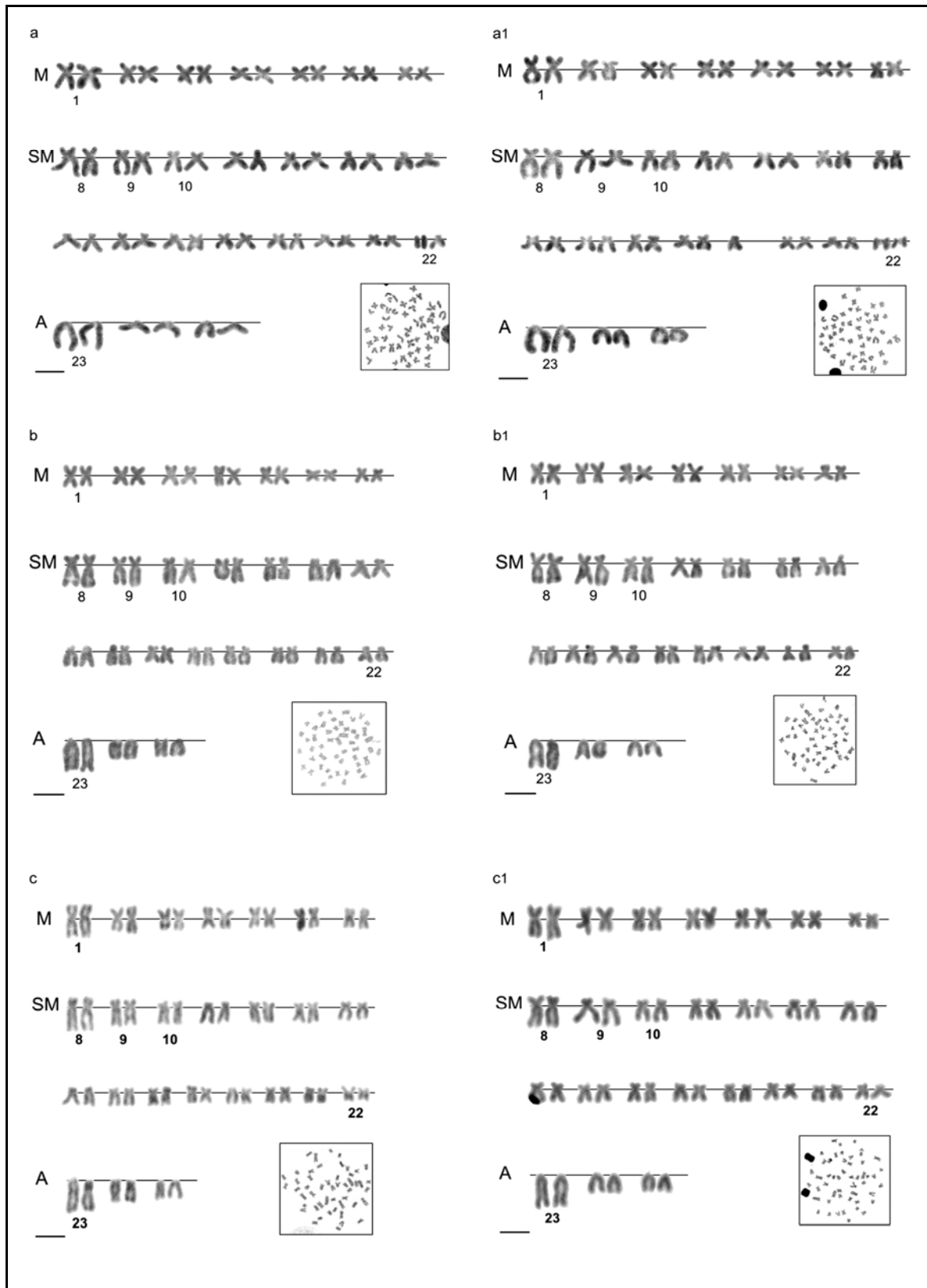


Figura 10: Cariótipos de espécimes de *C. lusitanicum* após digestão *in situ* com a endonuclease *HaeIII*, obtidos pelo método *in vivo* (1000x); **(a-a1)** Ribeira da Samarra (fêmea SR110); o cariótipo a1 foi preparado a partir de uma placa incompleta (com 49 cromossomas); **(b-b1)** Tejo 2 (macho RMR59 e RMR61); **(c-c1)** Tejo 1(fêmea TR8). Escala correspondente a 5µm.

Com um estudo menos aprofundado devido à reduzida quantidade de placas analisadas, a **marcação** com as **sondas teloméricas** (v. Figura 11) não revelou qualquer alteração (intersticial, deleção ou duplicação) significativa entre os cromossomas. Apenas se detectaram alguns sinais com menor intensidade nos respectivos cromossomas.

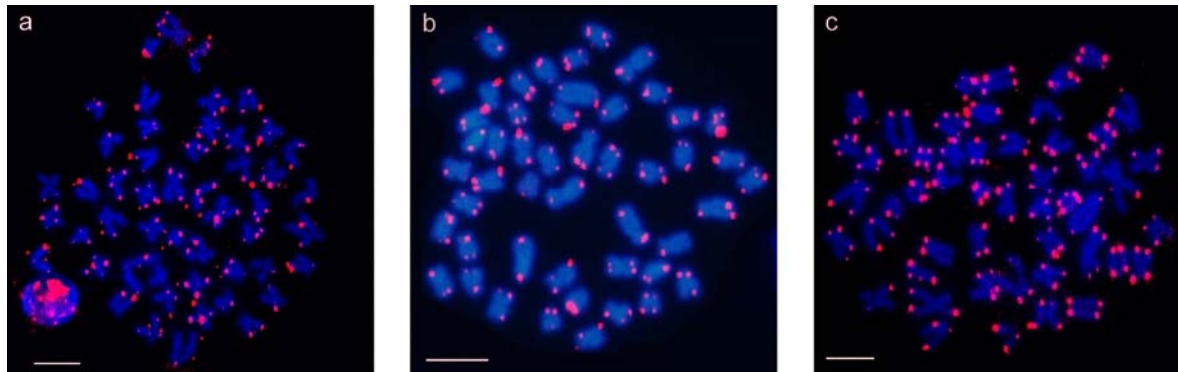


Figura 11: Marcação cromossómica com sondas teloméricas (FISH) em placas metafásicas de *C. lusitanicum* obtidas pelo método *in vivo* (1000X); **(a)** Ribeira da Samarra (fêmea – SR110); **(b)** Tejo 2 (macho – RMR61; **(c)** Tejo 1 (fêmea – TR9). Escala correspondente a 5µm.

3.3 Quantificação de DNA Nuclear

A Figura 12 representa alguns exemplos de leituras referentes à quantificação do DNA nuclear obtidas por citometria de fluxo para as amostras das populações estudadas. Na Figura 13 estão representados os conteúdos de DNA nuclear (pg) por indivíduo, e na Tabela 14 foram resumidos os parâmetros estatísticos descritivos do tamanho do genoma de cada população, com excepção do indivíduo triplóide que apresentou um conteúdo de DNA nuclear mais elevado (5,94pg) em relação a todos os outros. Em geral, o conteúdo de DNA nuclear variou entre 2,01 pg e 3,86 pg na população da Ribeira da Samarra, entre 2,55 pg e 3,23 pg na população do Tejo 1, entre 2,59 pg e 3,33 pg na população do Tejo 2, e entre 2,50 e 3,04 pg na população da Junqueira.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) estão representados na Tabela 15. A variabilidade encontra-se dividida: entre grupos, que representa a variação da média dos grupos em relação à média do total das ribeiras; e dentro de grupos, que representa a variação da média de cada grupo em torno da sua própria média. Para $\alpha = 0,05$ o conteúdo de DNA nuclear mostrou diferenças significativas entre as populações ($F=6,931$; $\text{Sig}=0,000 < \alpha$), o que nos indica que existem diferenças significativas em pelo menos uma das populações. Contudo, o resultado desta análise não nos permite concluir

qual ou quais as ribeiras têm os indivíduos com uma média significativamente diferente de outras.

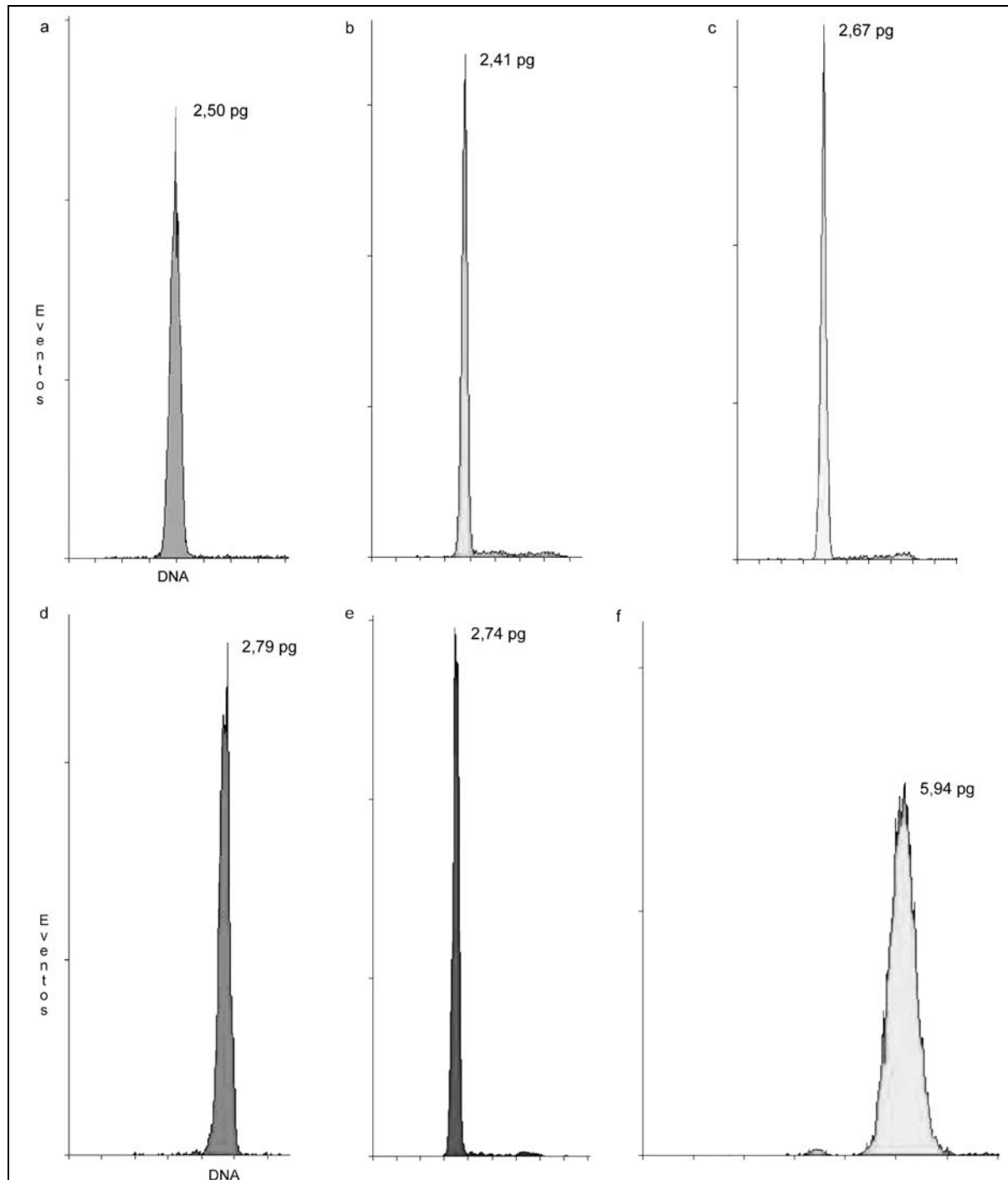


Figura 12: Ilustração das leituras referentes à quantificação de DNA nuclear obtidas por citometria de fluxo para as populações estudadas de *C. lusitanicum*: **(a)** galinha – controlo; **(b)** Ribeira da Samarra; **(c)** Tejo 2 ; **(d)** Tejo 1; **(e)** Ribeira da Junqueira; **(f)** indivíduo triplóide da Ribeira da Samarra.

Ribeira	N	Conteúdo DNA nuclear (pg)		
		Média (DP)	Min - Máx	Erro
Samarra	80	3,00 (0,33)	2,01 - 3,86	0,038
Tejo 1	30	2,95 (0,15)	2,55 - 3,23	0,028
Tejo 2	25	2,81 (0,17)	2,59 - 3,33	0,035
Junqueira	17	2,72 (0,15)	2,50 - 3,04	0,036

Tabela 14: Valores dos conteúdos de DNA nuclear (pg) e parâmetros estatísticos descritivos do tamanho do genoma de cada população de *C. lusitanicum* (média, desvio padrão (DP), Valores mínimo e máximo, erro); com excepção do indivíduo triploide com 5,94 pg de DNA nuclear.

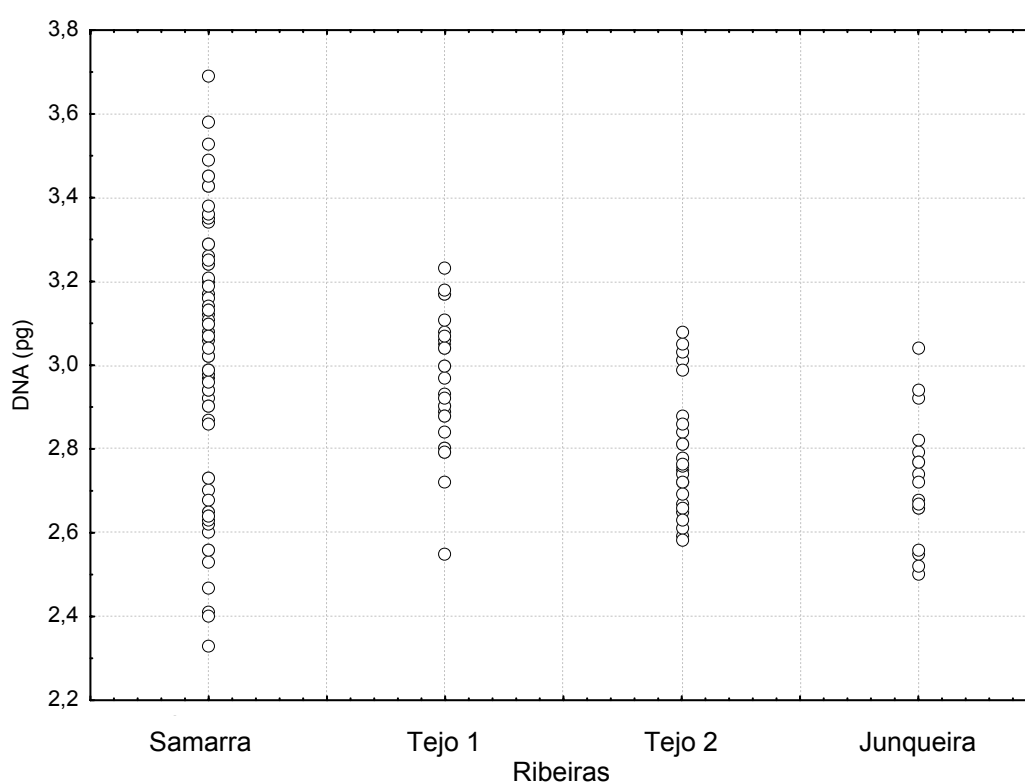


Figura 13: Conteúdos de DNA nuclear (pg) por indivíduo nas populações de *C. lusitanicum* analisadas com excepção do indivíduo triploide com 5.94 pg de DNA nuclear.

	Soma Quadrados	gl	Média Quadrática	F	Sig
Entre Grupos	1,534	3	0,511	6,931	0,000
Dentro de Grupos	10,922	148	0,074		

Tabela 15: Resultado da análise de variância (ANOVA) das médias do conteúdo de DNA nuclear entre as populações de *C. lusitanicum*.

O teste de Tukey (v. Tabela 16) indicou que existem diferenças significativas entre a populações da Samarra e as do Tejo 2 e Junqueira, e entre a do Tejo 1 e a da Junqueira. De facto, as diferenças das médias entre estas populações são significativas ($< \alpha$), o que também é visível nos valores da amplitude, ou seja, para um intervalo de 95% de confiança os valores não passam pelo "0", o que traduz diferenças significativas na análise de variância das médias do conteúdo de DNA nuclear.

População (I)	População (J)	Diferença Médias (I - J)	Erro	Significância	Amplitude	
					Min	Máx
Samarra	Tejo 1	0,051	0,058	0,817	-0,100	0,202
	Tejo 2	0,189*	0,062	0,015	0,027	0,351
	Junqueira	0,283*	0,072	0,001	0,095	0,472
Tejo 1	Samarra	-0,051	0,058	0,817	-0,202	0,100
	Tejo 2	0,138	0,242	-0,053	-0,053	0,329
	Junqueira	0,232*	0,027	0,018	0,018	0,447
Tejo2	Samarra	-0,189*	0,062	0,015	-0,351	-00,027
	Tejo 1	-0,138	0,073	0,242	-0,329	0,053
	Junqueira	0,094	0,085	0,685	-0,127	0,316
Junqueira	Samarra	-0,283*	0,072	0,001	-0,472	-0,954
	Tejo 1	-0,232*	0,027	-0,447	-0,447	-0,018
	Tejo 2	-0,094	0,685	-0,316	-0,316	0,127

Tabela 16: Teste de Tukey entre as populações de *C. lusitanicum*. Os valores assinalados com * correspondem às médias que apresentam diferenças significativas para um nível de 95%.



4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1 Análise Morfológica

A análise efectuada revelou a existência de alguma diferenciação morfológica inter-populacional em *C. lusitanicum*, tanto a nível das características merísticas como morfométricas.

Deste modo, surgiram diferenças significativas em relação a algumas características merísticas, tais como, no número de escamas da fiada transversal inferior e da linha lateral, no número de branquispinhas e no número de raios da barbatana anal. Assim, as populações da Samarra, Tejo 1 e 2 apresentaram um maior número de escamas na fiada transversal inferior e um menor número de branquispinhas em relação às populações da Junqueira e da série-tipo (Xarrama). A população do Tejo 2 apresentou, ainda, um menor número de escamas da linha lateral e de raios da barbatana anal em relação às outras populações.

De salientar, também, a grande proximidade existente entre a Samarra, Tejo 1 e Tejo 2 que formam um pequeno grupo, e entre a Junqueira e Xarrama, que formam outro grupo, os quais apresentam um acentuado distanciamento entre si, verificando-se o maior afastamento entre a Samarra e a Junqueira. Por outro lado, a maior afinidade de populações surge entre o Tejo 1 e o Tejo 2, o que era previsível uma vez que pertencem à mesma bacia.

A população da Junqueira apresentou diferenças significativas relativamente à série-tipo de *C. lusitanicum* no número de escamas da fiada transversal superior e no número de dentes do osso faríngeo direito. Estas pequenas variações poderão dever-se ao facto destas ribeiras estarem sujeitas a flutuações sazonais significativas no que diz respeito ao regime hidrológico. A ocorrência de eventos de cheias no Inverno e de secas extremas no Verão, as quais causam grandes mortalidades nas espécies dulçaquícolas e provocam efeitos de gargalo recorrentes nas populações, poderá explicar a diferenciação morfológica encontrada (Coelho et al. 1995, Mesquita et al. 2001).

Em relação às características morfométricas, as diferenças mais significativas foram obtidas para os índices AC/CC, DPO/CC, APA/CS, APD/CS. Assim, as populações da Samarra e do Tejo 2 apresentaram, em termos comparativos, uma maior altura da cabeça, as populações do Tejo 2 e de Xarrama, uma maior distância pré-ocular, e as populações da Samarra, Tejo 1 e Junqueira, menores alturas pré-anal e pré-dorsal. Estes caracteres acentuam o distanciamento e a separação entre a população da Junqueira e a série-tipo relativamente às populações da Samarra e do Tejo 2 mas, o mesmo não se verifica com a população do Tejo 1 que apresentou a maior proximidade com a

população da Junqueira. A população da Samarra foi a que apresentou o maior distanciamento relativamente à série-tipo, e uma maior afinidade com a população do Tejo 2.

Os resultados obtidos são, aliás, fortemente concordantes com a diferenciação entre as bacias do litoral oeste (Samarra e Tejo 2), e as outras bacias da área de distribuição da espécie, evidenciada pela utilização de marcadores moleculares (análise do citocromo b e microsátélites). Estes estudos revelaram uma elevada diferenciação entre as populações apesar da reduzida diversidade genética intra-populacional (Sousa et al. submetido).

Em relação a *C. almakai*, a análise efectuada por Carvalho (2006) revelou diferenciação morfológica entre esta espécie e *C. lusitanicum*, o que está de acordo não só com os dados de Coelho et al. (2005) como também com o presente estudo (v. Tabela 17). Com efeito as espécies podem distinguir-se entre si com base numa série de características merísticas, nomeadamente pelo número de escamas da linha lateral (em maior quantidade em *C. almakai*), pelo número de escamas da fiada transversal superior e inferior (ligeiramente inferior em *C. lusitanicum*), pelo número de dentes do osso faríngeo direito (*C. almakai* apresentou quase sempre 6 dentes faríngeos enquanto *C. lusitanicum* variou entre 5 e 6 dentes faríngeos), pelo número de branquispinhas (inferior em *C. lusitanicum*), e em algumas características morfométricas, especificamente pela relação entre o comprimento e a altura da cabeça (mais comprida em *C. almakai*), pela relação altura pré-dorsal e o comprimento e, ainda, pelo diâmetro pré-ocular (menor em *C. lusitanicum*).

O padrão de diferenciação morfológico observado entre estas duas espécies-irmãs, poderá estar relacionado com os eventos geológicos que levaram à separação das respectivas bacias hidrográficas (Mesquita et al. 2001), e com a ocorrência de fenómenos de gargalo e de adaptação local decorrentes das variações do regime hidrológico como referido anteriormente.

4.2 Análise Citogenética

As variações morfológicas que surgem ao nível do cariótipo das espécies podem ser encaradas como uma consequência do respectivo processo evolutivo. Observam-se em alguns grupos recorrendo a técnicas de citogenética de maior resolução, as quais permitem a detecção de alguma variabilidade no padrão cromossómico que, noutros grupos, se mantém inalterado (Almeida-Toledo, 1998).

A fórmula cromossómica de *C. lusitanicum*, inicialmente descrita por Collares-Pereira (1983a, b) apenas com base na chamada coloração standard (giemsa) foi redefinida por

Rodrigues e Collares-Pereira (1996), anteriormente ao reconhecimento da nova espécie *C. almacai*, com recurso a alguns marcadores (bandas-C e N). Foram então analisados exemplares das Bacias do Mira, Tejo e Samarra e descrito um valor diplóide de 50 cromossomas e um número fundamental relativamente elevado (NF=94), correspondendo a uma fórmula haplóide de 7M:15SM:3A.

O padrão cariológico observado neste trabalho através de novas técnicas de marcação cromossômica, apesar de incluir uma amostragem bem mais significativa e ampla das Bacias do Tejo e Samarra e de ter excluído a população de *C. almacai* da Bacia do Mira, foi idêntico ao reportado anteriormente: todos os indivíduos das diferentes populações estudadas apresentaram um valor diplóide de 50 cromossomas (com apenas uma excepção observada na Bacia da Samarra), sendo o seu cariótipo composto por 7 pares de cromossomas metacêntricos, 15 pares de cromossomas submetacêntricos e 3 pares de cromossomas acrocêntricos e, conseqüentemente, por um NF=94. Deste modo, foi confirmada para esta espécie recorrendo a marcadores adicionais, a fórmula haplóide anteriormente descrita. Porém, no que respeita ao elevado polimorfismo cromossômico reportado para os NORs por Rodrigues e Collares-Pereira (1996) e posteriormente por Collares-Pereira e Ráb (1999) através da técnica de FISH, o qual podia ser apenas o reflexo da mistura de populações pertencentes a espécies distintas, este estudo permitiu comprovar que, pelo menos nesta espécie diplóide de Leuciscinae, existem NORs múltiplos, ao contrário de estudos efectuados em outras espécies europeias da mesma sub-família, que revelaram apenas um par de NORs (e.g. Ráb et al. 1990; Hellmer et al. 1990; Padilla et al. 1993). Este polimorfismo sugere a ocorrência de rearranjos estruturais por translocações ao nível do DNA ribossômico, de um par ancestral NOR (S2), presente em táxones da sub-família Leuciscinae, para outro par (S1) (Collares-Pereira e Ráb, 1999).

Os NORs têm constituído marcações cromossômicas muito importantes na caracterização de espécies distintas. Nos ciprinídeos, de um modo geral, considera-se que um par de NORs representa a condição primitiva, e que a localização múltipla dessas regiões, poderá surgir efectivamente de rearranjos estruturais como é o caso das translocações parciais. Em espécies piscícolas, as características dos NORs têm sido usadas para estabelecer relações filogenéticas, existindo estudos feitos nomeadamente em ciprinídeos norte-americanos (e.g. Amemiya e Gold, 1990). Estes autores descreveram, baseados no número de NORs, na posição que ocupam e no tipo de cromossomas em que se localizam, 15 fenótipos específicos para espécies diplóides: revelaram que 74% das espécies analisadas possuíam apenas um par de NORs, 24% possuíam dois pares, e só 4% possuíam três pares.

Num estudo efectuado em vinte espécies diplóides de ciprinídeos asiáticos, Takai e Ojima (1986) também encontraram um tipo de variação semelhante: 60% possuíam um par de NORs, 30% dois pares e 10% mais do que dois pares.

O tipo de polimorfismo encontrado no número de Ag-NORs activos por genoma e no tamanho relativo dos NORs num mesmo par de homólogos, está descrito para uma série de espécies de peixes (e.g. Feldberg e Bertollo, 1985). Estes resultados podem dever-se, ou a uma diferença na quantidade de cistrões ribossómicos entre os NORs, ou a diferenças entre a actividade desses genes. Esta variação pode ocorrer entre diferentes NORs de um mesmo espécime. Por exemplo, o número de cistrões que codificam para o RNA ribossómico (18S e 28S) pode variar entre cromossomas distintos e entre homólogos (e.g. Warburton e Henderson, 1979). É provável que a redundância génica do rDNA possa causar permutas desiguais, como duplicações e deleções espontâneas, conduzindo assim a uma variação no número de cópias desses genes (Ritossa et al. 1966). A tendência dos organizadores nucleolares para se associarem e formarem nucléolos facilita trocas a nível do rDNA, entre cromossomas homólogos ou não, contribuindo assim para a variabilidade no número de cistrões ribossómicos (Ruiz, 1982).

		<i>C. lusitanicum</i>	<i>C. almacai</i>
Morfologia	Características Merísticas	menor nº escamas linha lateral 46,16 (2,02)	maior nº escamas linha lateral 50,83 (3,47)
		número inferior escamas fiada transversal superior 10,49 (0,45)	número superior escamas fiada transversal superior 10,91 (0,61)
		5 a 6 dentes faríngeos (direita)	6 dentes faríngeos (direita)
		número inferior branquiaspinhas 29,89 (2,29)	número superior branquiaspinhas 30,47 (2,59)
Citogenética	Características Morfométricas	comprimento / altura da cabeça maiores 0,78 (0,07)	comprimento / altura da cabeça menores 0,16 (0,01)
		menor distância pré-dorsal 0,51 (0,02)	maior distância pré-dorsal 0,53 (0,02)
		menor distância pré-ocular 0,04 (0,01)	maior distância pré-ocular 0,05 (0,01)
Citogenética	Valor Diplóide	2n=50	2n=50
	NF	94	94
	Fórmula Cromossómica	7M:15SM:3A	7M:15SM:3A
	Nº Sinais CMA ₃ -NOR positivos	2-4	2-4
Citogenética	Nº Sinais Ag-NOR positivos	2-4	2-3
Tamanho Genoma (média)		2,72 pg - 3,01 pg	2,56 pg (mais pequeno)

Tabela 17: Comparação das diferenças entre as espécies irmãs; [média (desvio padrão)].

As limitações inerentes a interpretações baseadas nas bandas Ag-NORs residem exactamente no facto desta marcação ser específica para as sequências dos NORs que estiveram transcripcionalmente activas na interfase precedente e não nas próprias sequências e, como tal, torna-se difícil interpretar se esse heteromorfismo representa a perde ou ganho de actividade transcripcional, ou apenas das sequências (Gold, 1984). Note-se que Pendás et al. (1993), num estudo através de técnicas de hibridação *in situ*, sugerem que o polimorfismo encontrado em relação ao tamanho dos NORs poderá estar relacionado com diferenças estruturais na quantidade de rDNA. Takai e Ojima (1986) referem, ainda, que o heteromorfismo entre homólogos é mais frequente em espécies que apresentam NORs relativamente grandes. Em *C. lusitanicum*, este tipo de heteromorfismo surgiu apenas entre os homólogos do par 9, ou seja, aqueles que apresentam os NORs de maiores dimensões.

Neste trabalho, os resultados encontrados evidenciaram algumas placas metafásicas nas quais não se observou correspondência com a marcação por CMA₃ revelando-se, assim, os NORs inactivos na interfase precedente. No entanto, o número de CMA₃-NORs evidenciou um elevado grau de polimorfismo, tanto intra- como inter-individual nas diferentes populações e em geral, quando estão activos dois sinais NOR por genoma, estes localizam-se aparentemente no par 9; quando estão activos três sinais NOR surge, para além do par 9, num cromossoma pertencente ao par 10; quando aparecem quatro sinais NOR positivos, surge marcado o outro homólogo desse mesmo par.

A marcação por bandas-C revelou a existência de heterocromatina constitutiva, essencialmente a nível dos centrómeros, com variações em todas as populações de intensidade e de tamanho, situação que se encontra descrita como sendo a mais comum nos peixes (Ozouf-Costaz e Foresti, 1992). A diferenciação observada na intensidade desta marcação nos pares de cromossomas poderá reflectir uma variação na quantidade de heterocromatina constitutiva. Este bandeamento permitiu, ainda, a localização de blocos heterocromáticos (marcadores) que variaram de posição nos cromossomas e nas populações: um par acrocêntrico com heterocromatina terminal (par 23) na população da Samarra e um cromossoma submetacêntrico com um bloco de heterocromatina terminal no braço longo (par 9) em ambas as populações da Bacia do Tejo. É de salientar que, tal como verificado pela maioria dos autores (e.g. Moreira-Filho et al. 1984; Sola et al. 1986; Ráb et al. 1990; Padilla et al. 1993), algumas regiões onde se localizaram os NORs (cromossoma submetacêntrico com heterocromatina constitutiva em todo o braço curto) apresentaram-se C-positivas.

Em relação à diferenciação de cromossomas sexuais, vários autores sugerem que esse processo poderá estar relacionado com o decurso da heterocromatização (e.g. Sola et al. 1993). Neste caso, devido ao facto de se ter em apenas marcado dois exemplares

por ribeira, não foi possível verificar qualquer tipo de relação entre a marcação com bandas-C e o sexo.

O padrão de marcação encontrado após digestão *in situ* com a endonuclease *AluI*, o qual é semelhante ao da marcação por bandeamento-C, foi na generalidade comparável ao descrito para outras espécies de peixes (e.g. Cau et al. 1992; Padilla et al. 1993). A endonuclease de restrição *HaeIII* revelou um padrão semelhante mas um bandeamento mais atenuado ao nível dos centrómeros. Ambas as enzimas permitiram a identificação de alguns pares de cromossomas: os pares 1, 8 e 23 são os cromossomas de maiores dimensões mas o primeiro apresenta centrómero mediano, o segundo submediano e o terceiro acrocêntrico, o cromossoma 9 é o segundo maior submetacêntrico, o cromossoma 10 também é submetacêntrico mas de menor dimensão que o anterior e o par 22 é o cromossoma mais pequeno com centrómero submediano.

No estudo paralelo efectuado por Carvalho (2006), o cariótipo da espécie *C. almacai* foi analisado com base em indivíduos das Bacias do Arade e do Mira tendo-se verificado a existência de uma fórmula haplóide idêntica à de *C. lusitanicum* (7M:15SM:3A, NF=94) (v. Tabela 17). Deste modo, considerando o potencial do fenótipo cariológico como um carácter taxonómico, os resultados deste trabalho permitiram comprovar que *C. lusitanicum* é efectivamente uma espécie muito próxima de *C. almacai*. Para além disso, o valor diplóide de ambas as espécies ($2n=50$) é, com efeito, a condição mais comum nos ciprinídeos da sub-família Leuciscinae (Ráb e Collares-Pereira, 1995), apesar de existirem táxones com fenómenos de poliploidia, como é o caso do complexo ibérico *Squalius alburnoides* (revisto em Alves et al. 2001).

O polimorfismo cromossómico observado com a marcação NOR revela que ambas as espécies apresentam uma variação no número de sinais positivos (entre dois e quatro), sendo que a maioria apresenta três CMA₃-NORs, mas registaram-se diferenças a nível de sinais Ag-NORs, com *C. lusitanicum* a apresentar um número máximo de quatro Ag-NORs (mas com percentagens mais elevadas para dois e três sinais), enquanto que *C. almacai* apresenta um número máximo de apenas três Ag-NORs (v. Tabela 17). Estes dados não são concordantes com o descrito por Rodrigues e Collares-Pereira (1996), que observaram em todos os espécimes com três ou quatro sinais Ag-NORs, sempre quatro sinais CMA₃-NORs, e em indivíduos que apresentavam um número máximo de dois sinais Ag-positivos, apenas dois sinais CMA₃-positivos. Esta diferença poderá dever-se ao facto de termos analisado um maior número de placas metafásicas ou mesmo ao facto de termos estudado diferentes populações (os referidos autores estudaram indivíduos de *C. almacai* apenas da Bacia do Mira que, na altura, eram classificados como *C. lusitanicum*). As limitações inerentes à interpretação destes sinais Ag-NORs, devem-se ao facto de esta marcação ser específica para as regiões organizadoras do nucléolo que

estiveram activas durante a transcrição na interfase precedente, e não à própria região NOR (Gold, 1984). Deste modo, torna-se difícil interpretar se esta variação entre as duas espécies se deve à existência de um verdadeiro polimorfismo ou apenas à actividade dos NORs no período interfásico.

Como tal, será de todo o interesse a continuação deste tipo de estudos, através de técnicas de cultura celular, para obtenção de placas metafásicas de melhor qualidade, assim como o apuramento das técnicas de digestão *in situ* com enzimas de restrição e a hibridação *in situ* por fluorescência, uma vez que permitem validar com mais eficácia o grau de polimorfismo cromossómico a nível intra e inter-populacional.

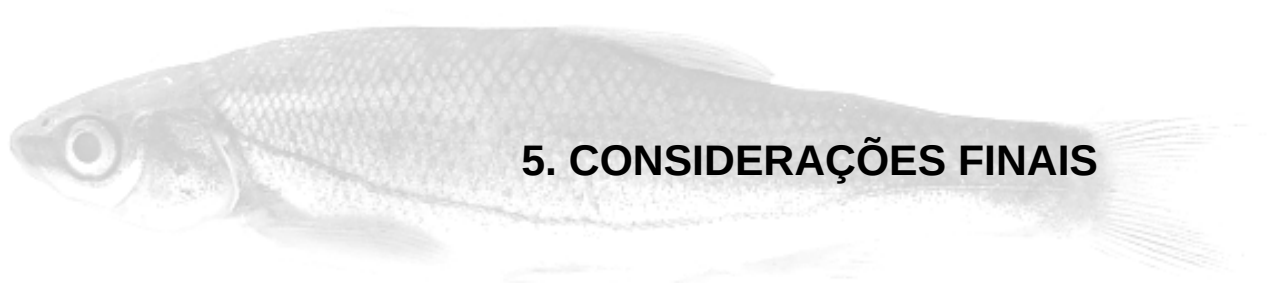
4.3 Quantificação do DNA nuclear

A variação do tamanho do genoma, entre indivíduos da mesma população ou mesmo entre espécies, parece resultar de pequenas alterações na quantidade de DNA pois a distribuição do DNA nuclear em espécies ciprinícolas é contínua e normal, sugerindo ganhos e perdas de DNA com efeito cumulativo e independente (Gold e Amemiya, 1987). Estes autores também consideraram que diferenças no tamanho do genoma poderão surgir com novos processos de especiação.

Entre os vários espécimes analisados das distintas populações de *C. lusitanicum*, (com a excepção do indivíduo triploide observado na Bacia da Samarra), parecem existir diferenças relevantes a nível populacional. De facto, as diferenças entre as médias são significativas: a população da Samarra revelou-se significativamente diferente da população do Tejo 2 e da Junqueira; e a população do Tejo 1 da população da Junqueira. No entanto, verifica-se que tal como evidenciado por Collares-Pereira e Moreira da Costa (1999), não existe uma correlação directa entre os valores de DNA nuclear e o número de cromossomas das espécies ciprinícolas.

A análise comparativa do conteúdo de DNA nuclear de *C. lusitanicum* e de *C. almacai* (v. Tabela 17), apesar do estudo citogenético ter revelado uma grande identidade entre estas espécies, revelou algumas diferenças: *C. almacai* possui um genoma mais pequeno (média = 2,56 pg) (Carvalho, 2006), enquanto que *C. lusitanicum* apresentou um valor médio superior em todas as populações estudadas (2,72 pg - 3,01 pg). Estas pequenas variações poderão estar relacionadas com o facto de *C. lusitanicum* e *C. almacai* terem divergido de um ancestral comum quando do processo de isolamento das respectivas bacias hidrográficas pela formação da Serra do Caldeirão (Mesquita et al. 2001) apresentando áreas de distribuição da amplitude muito distinta - *C. lusitanicum* tem uma distribuição mais ampla do que *C. almacai*, que se encontra a ocupar uma área

geográfica muito mais restrita e de características tipicamente semi-áridas - (v. Figura 2). Acresce que *C. lusitanicum* apresenta, em geral, maiores efectivos e, portanto, uma maior variabilidade populacional, com polimorfismos genéticos bem caracterizados, quando comparado com *C. almakai*, cuja percentagem de loci polimórficos é muito inferior (Rodrigues, 1993; Alves e Coelho, 1994; Mesquita et al. 2001).



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal componente deste estudo, isto é, a análise da variabilidade inter-populacional em termos morfológicos e citogenéticos de *Chondrostoma lusitanicum*, bem como a sua comparação com a espécie-irmã *Chondrostoma almacai* baseada nos dados de Carvalho (2006), permitiu um avanço significativo no conhecimento dos dois endemismos.

Com efeito procedeu-se, em particular, à redefinição o cariótipo da Boga Portuguesa e caracterizar a variabilidade morfológica e o tamanho do genoma das várias populações analisadas, podendo resumir-se como conclusões mais relevantes, as seguintes:

1. O estudo morfológico confirmou a existência de uma clara diferenciação populacional em *C. lusitanicum* verificando-se a existência de dois grupos bem demarcados: as populações das bacias do litoral oeste, Samarra e Tejo 2 (Rio Maior), e as restantes analisadas (Tejo 1 - Ribeira de Raia- Sado e Sines). Face ao padrão encontrado, uma vez que a série-tipo foi obtida na Bacia do Sado, é recomendável que se proceda à análise de outras amostras deste e de outros cursos de água incluindo outros afluentes da margem esquerda do Tejo, dado o comportamento mais heterogéneo da população do Tejo 1, de modo a tornar possível uma delimitação mais precisa da referida variação populacional. O estudo comparativo das duas espécies-irmãs confirmou a caracterização morfológica anteriormente descrita (Coelho et al. 2005);

2. Também a análise do conteúdo de DNA nuclear revelou diferenças significativas entre as populações de *C. lusitanicum*, caracterizando-se os indivíduos da Ribeira da Samarra por uma maior variabilidade relativamente às restantes populações, as quais apresentaram indivíduos com conteúdos inferiores e menos variáveis. Aliás, foi na Ribeira da Samarra que foi detectado pela primeira vez um indivíduo triplóide, provavelmente originado a partir de um oócito não-reduzido. O estudo comparativo com a espécie-irmã permitiu evidenciar que esta espécie se caracteriza por possuir um genoma significativamente maior;

3. Apesar das análises anteriores terem demonstrado a existência de diferenciação inter-populacional para as bacias estudadas, a análise citogenética não permitiu a detecção de outros marcadores cromossómicos, à excepção dos blocos de heterocromatina constitutiva que tipificaram as populações da Samarra, Tejo 1 e Tejo 2. No entanto, foi confirmada para esta espécie a fórmula cromossómica haplóide anteriormente descrita por Rodrigues e Collares-Pereira (1996) - 7M: 15SM: 3A, NF=94 - tendo os resultados da aplicação da técnica de digestão *in situ* com endonucleases às populações da Samarra, Tejo 1 e Tejo 2, permitido identificar inequivocamente seis pares de cromossomas (pares 1, 8, 9, 10, 22 e 23). Foram, ainda, observados organizadores

nucleolares múltiplos em todas as populações, em associação com um elevado grau de poliformismo intra-populacional. Porém, embora *C. almakai* apresente uma fórmula cromossómica idêntica, em termos comparativos, *C. lusitanicum* caracteriza-se, aparentemente, por possuir um número mais elevado de sinais CMA₃-NORs positivos (3 a 4 sinais *versus* um número máximo de três sinais observado em *C. almakai*).

O facto de não ter sido possível detectar alterações cromossómicas através da técnica de FISH, poderá estar relacionado com o reduzido número de placas analisadas recorrendo apenas a um tipo de sondas (teloméricas) ou ser, efectivamente, o resultado da ausência de diferenciação cromossómica inter-populacional a este nível. Assim, será de todo o interesse a continuação deste estudo, utilizando, nomeadamente, outras sondas (e.g. 28S, DNA satélite) no sentido de obter mais dados referentes ao processo de diferenciação cromossómica das populações analisadas, face à elevada diferenciação encontrada neste trabalho com os outros marcadores (morfológicos e do conteúdo de DNA nuclear).

Esta diferenciação foi, aliás, recentemente corroborada pelos resultados do estudo de marcadores genéticos moleculares (DNA mitocondrial e nuclear – Sousa et al. submetido) que sugeriram a existência de duas linhagens ancestrais a evoluir independentemente (Tejo e Samarra por um lado, e Sado e Sines por outro), o que permite recomendar, desde já, muita prudência na adopção de estratégias de recuperação que envolvam a mistura das respectivas populações através de processos de translocação e/ou de repovoamentos.

Face ao acentuado declínio das duas espécies estudadas, que constituem endemismos lusitanianos e que se encontram actualmente classificadas como “Criticamente em Perigo”, torna-se urgente a definição de medidas de conservação adequadas, uma vez que a sua área de distribuição se encontra muito confinada a bacias com flutuações sazonais significativas em termos de regime hidrológico, o que potencia a sua vulnerabilidade a acções antrópicas, como a extracção de água e de materiais inertes, a introdução de espécies exóticas predadoras, a construção de barragens e açudes, a descarga de efluentes não tratados e o incumprimento da legislação existente (Magalhães, 2002; Mesquita e Coelho, 2002).

A implementação de tais medidas revela-se premente, pois na maioria dos casos, existem pequenos troços cujas condições ambientais não são adversas e que, por esse facto, podem funcionar como reservatórios confinados e especialmente vulneráveis de espécies piscícolas, os quais, em alguns casos, poderão constituir os últimos redutos da história ictiofaunística ibérica.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allendorf FW, Ryman N, Utter FM: **Genetics and fishery management- past, present and future.** In *Populations Genetics and Fishery*. Edited by Ryman N & Utter F. Seattle: Univ. Washington Press; 1987:1-19.

Almaça C: **Zoogeografia e especiação dos ciprinídeos de Península Ibérica.** *Revista Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* 1976, **4**:1-28.

Almaça C: **Freshwater fish and their conservation in Portugal.** *Biological Conservation* 1995, **72**:125-127.

Almaça C: *Peixes dos Rios de Portugal*. Lisboa: Edições INAPA; 1996.

Amemiya CT, Bickham JW, Gold JR: **A cell culture technique for chromosome preparation in cyprinid fishes.** *Copeia* 1984, 232-235.

Amemiya CT, Gold JR: **Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosome.** *Copeia* 1986, 226-231.

Almeida-Toledo LF: *Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes Part 7 – Cytogenetic markers.* Porto Alegre: Edipucrs; 1998.

Amores A, Giles V, Thode G, Alvarez MC: **Adaptative character of a Robertsonian usion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes).** *Heredity* 1990, **65**:151-155.

Alvarez MC, Otis J, Amores A, Guise K: **Short-term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish.** *Fish Biology* 1991, **39**:817-824.

Alves MJ, Coelho MM: **Genetic variation and population subdivision of the endangered Iberian cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*.** *Journal of Fish Biology* 1994, **44**:627-636.

Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ: **Evolution in action through hybridisation and polyploidy in a Iberian freshwater fish: a genetic review.** *Genetica* 2001, **111**:375-385.

Artori RF, Molina WF, Bertollo LA, Junior PM: **Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes).** *Genet Mole Biol* 1999, **22**:39-44.

Banarescu P: **Origin and affinities of the fresh-water fish fauna of Europe.** *Ichthyologia* 1973, **5**:1-8.

Barlow GW: **Causes and significance of morphological variation in fishes.** *Syst Zool* 1961, **10**:105-117.

Baron JC: **Note bibliographique sur les chromosomes des poissons.** *Cah.O.R.S.T.O.M. Sér. Oceanogr.* 1974, **12(2)**:99-112.

Bernardi G: **The vertebrate genome: isochors and evolution.** *Mol Biol Evol* 1993, **10**:186-204.

Bernardi G, Mouchiroud D, Gautier C, Bernardi G: **Compositional patterns in vertebrate genomes: conservation and changes in evolution.** *Journal Mol Evol* 1988, **28**:7-8.

Blackburn EH: **Switching and signalling at the telomere.** *Cell* 2001, **106**:661-673.

Blaxhall PC: **Fish chromosome techniques: a review of selected literature.** *Journal Fish Biol.* 1975, **7**:315-320.

Bristein VJ, Andrei IP, Goncharov BF: **DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry.** *Cytometry* 1993, **14**:377-383.

Boroń A: **Comparative chromosomal studies on two minnow fish, *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) and *Eupallasella perenurus* (Pallas, 1814); an associated cytogenetic-taxonomic consideration.** *Genetica* 2001, **111**:387-395.

Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queirós AI, Rogado L, Santos-Reis M: *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Lisboa: Instituto de Conservação da Natureza; 2005.

Caputo V, Sorice M, Vitturi R, Magistrelli R, Olmo E: **Cytogenetic studies in some species of Scorpaeniformes (Teleostei: Percomorpha)**. *Chromosome Res.* 1998, **6**:255-262.

Carvalho C: **Estudo citogenético e morfológico de *Chondrostoma almacai* (Pisces, Cyprinidae) e da variabilidade intra- e interpopulacional**. Relatório Estágio. Universidade Évora, FCUL; 2006.

Cau A, Coluccia E, Deiana AM, Pichiri G, Rossino R, Salvatori S, Mezzanotte, R: **Chromosomes and DNA of *Anguilla anguilla*: a study with restriction endonucleases**. *Genome* 1992, **35**:838-843.

Cavalcanti MJ, Monteiro LR, Lopes PRD: **Landmark-based Morphometric Analysis in Selected Species of Serranid Fishes (Perciformes: Teleostei)**. *Zoological Studies* 1999, **38**:287-294.

Chaves R, Adegas F, Santos S, Guedes-Pinho H, Heslop-Harrison JS: **In situ Hybridization and chromosome banding in mammalian species**. *Cytogenet. Genome Res.* 2002. **96**:113-116.

Clark MS, Wall WJ (Eds): **Chromosome identification**. In *Chromosomes The complex code*. London: Chapman & Hall; 1996:72-75.

Coelho MM: **Estudo sistemático de populações de *Chondrostoma* Agassiz, 1835 (Pisces, Cyprinidae). A especiação de *Ch. polylepis* Steind. 1865 and *Ch. willkommii* Steind. 1866**. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Departamento DBA; 1987.

Coelho MM, Brito RM, Pacheco TR, Pires AM: **Genetic variation and divergence of *Leuciscus pyrenaicus* and *L. carolitertii* (Pisces, Cyprinidae)**. *Journal of Fish Biology* 1995, **47**(sup A):243-258.

Coelho MM, Alves MJ, Rodrigues E: **Patterns of genetic divergence of *Chondrostoma lusitanicum* in intermittent Portuguese rivers.** *Fisheries Management and Ecology* 1997, **4**:223-232.

Coelho MM, Bogutskaya N, Rodrigues J, Collares-Pereira MJ: ***Leuciscus torgalensis* and *L. aradensis*, two new cyprinids for Portuguese fresh waters.** *Fisheries Management and Ecology* 1998, **52**:937-950.

Coelho MM, Mesquita N, Collares-Pereira MJ: ***Chondrostoma almaçai*, a new cyprinid species from the southwest of Portugal, Iberian Peninsula.** *Folia Zoolica* 2005, **54**:201-212.

Collares-Pereira MJ: **Les *Chondrostoma* à bouche arquée de la Péninsule Ibérique (avec la description de *Ch. Lusitanicum* nov. Sp.) (Poissons, Cyprinidae).** *Comptes rendus de l'Académie de Sciences de Paris Série D* 1980, **291**:275-278.

Collares-Pereira MJ: **Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros *Chondrostoma* Agassiz, 1835, *Rutilus* Rafinesque, 1820 e *Anaocypris* Collares-Pereira, 1983.** Tese de Doutoramento. Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa; 1983a.

Collares-Pereira MJ: **Cytotaxonomic Studies in Iberian Cyprinids. I. Karyology of *Chondrostoma lusitanicum*** Collares-Pereira, 1980. *Cytologia* 1983b, **48**:753-496.

Collares-Pereira MJ: **Cytotaxonomic Studies in Iberian Cyprinids. II. Karyology of *Anaocypris hispanica* (Steindacher, 1866), *Chondrostoma lemmingii* (Steindacher, 1866), *Rutilus arcasi* (Steindacher, 1866) and *Rutilus macrolepidotus* (Steindacher, 1866).** *Cytologia* 1985, **50**:879-890.

Collares-Pereira MJ: ***In vivo* direct chromosome preparation (air drying technique).** pp. 15-19. In "*First International Workshop on Fish Cytogenetic Techniques*": 1992a; Paris. Edited by Ozouf-Costaz C, Foresti F, Almeida-Toledo L: *Museum Nat. Histoire Naturelle, 1992a Paris*. 1992a:15-19.

- Collares-Pereira MJ: Ag-NOR staining. In "First International Workshop on Fish Cytogenetic Techniques". Eds. C. Ozouf-Costaz, F. Foresti & L. Almeida Toledo, *Museum Nat. Histoire Naturelle, Paris*, 1992b; 38-43 pp.
- Collares-Pereira MJ: **The karyology of barbins and the possible plesiomorphic condition of polyploidy in Cyprinidae.** *Bull Fr Pêche Piscic* 1994, **334**:191-199.
- Collares-Pereira MJ, Coelho MM: **Polyploidy versus diploidy: a new model for the karyological evolution of Cyprinidae.** *Arq. Mus. Bocage (N.S.)* 1989, **1(26)**:375-383.
- Collares-Pereira MJ, Moreira da Costa L: **Intraspecific and interspecific genome size variation in Iberian Cyprinidae and the problem of diploidy and polyploidy, with review of genome sizes within the family.** *Folia Zoologica* 1999, **48(1)**:61-76.
- Collares-Pereira MJ, Ráb : **NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae) re-examination by FISH.** *Genetica* 1999, **105**:301-303.
- Cunha C, Coelho MM, Carmona JA, Doadrio I: **Phylogeographical insights into the origins of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events.** *Molecular Ecology* 2004, **13**:2807-2817.
- Dawley RM, Goddard KA: **Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus neogaeus*.** *Evolution* 1988, **42**:649-659.
- Denton TE: *Fish chromosome methodology*. Edited by Charles CT. Illinois: Springfield; 1973:166pp.
- Dressler LG, Seamer LC: **Controls, standars and histogram interpretation in DNA flow cytometry.** In *Flow Cytometry Part A (2nd ed.)*. Edited by Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. San Diego: Academic Press, Inc; 1994:241-262.
- Doadrio I, Carmona JA: **A new species of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1832 (*Actynopterigii*, Cyprinidae) from the Iberian Peninsula.** *Graellsia* 2003, **59**:29-36.
- Doadrio I, Madeira MJ: **A new species of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (*Actynopterygii*, Cyprinidae) from the Iberian Peninsula and southwestern France.** *Graellsia* 2004, **60**:107-116.

Doležel J: **Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants.** *Phytochemical Analysis* 1991, **2**:143-154.

Doležel J: **Applications of flow cytometry for the study of plant genomes.** *J Applied Genetics* 1997, **38(3)**:285-302.

Dutrillaux B: *Sur la nature et l'origine des chromosomes humains.* Paris: L'Expansion Scientifique; 1975:104pp.

Fechheimer NS: **The present status of animal cytogenetics and its role in animal sciences.** *Cytogenetics of Animals* 1989, 1-9.

Feldeberg E, Bertollo LAC: **Nucleolar organizing regions in some species of neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes).** *Caryologia* 1985, **38**:319-324.

Feldeberg E, Porto JIR, Nakayma CM, Bertollo LAC: **Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*.** *Genome* 1993, **36**:372-376.

Filipe AF, Marques TA, Seabra S, Tiago P, Ribeiro F, Moreira da Costa L, Cowx IG, Collares-Pereira MJ: **Selection of Priority Áreas for Fish Conservation in Guadiana River Basin, Iberian Península.** *Conservation Biology* 2004, **18(1)**:189-200.

Fontana F, Lanfredi M, Rossi R, Bronzi P, Arlati G: **Established cell lines from three sturgeon species.** *Sturg Quaterly* 1995, **3**:6.

Foresti F, Foresti DE Almeida-Toledo L, Ozouf-Costaz C (Eds): *First International Workshop on Fish Cytogenetic Techniques – Draft Report and Contributions.* 1992 Concarneau, France; 1992: 129pp.

Gante HF, Collares-Pereira MJ, Coelho MM: **Introgressive hybridisation between two Iberian *Chondrostoma* species (Teleostei, Cyprinidae) revisited: new evidence from morphology, mitochondrial DNA, allozymes and NOR-phenotypes.** *Folia Zoologica* 2004, **53**:423-432.

Gilles A, Lecointre G, Faure E, Chapaz R, Brun G: **Mitochondrial Phylogeny of the European Cyprinids: Implications for their systematics, reticulate evolution and colonization time.** *Molecular Phylogenetic Evolution* 1998, **10**:132-143.

Goddard KA, Dawley RM: **Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnows (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae).** *Evolution* 1990, **44**:1052-1065.

Gold JR: **Cytogenetics.** In *Fish physiology*. Edited by Hoar WS, Randall J, Brett J. New York: Academic Press; 1979, 8:353-405.

Gold JR: **Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American Cyprinid fishes.** *Copeia* 1984, **37**:133-139.

Gold JR, Amemiya CT: **Genome size variation in North American minnows (Cyprinidae). II: Variation among 20 species.** *Genome* 1987, **29**:481-489.

Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers PK: **Improved methods for working with fish chromosome with a review of metaphase chromosome banding.** *Journal of Fish Biology* 1990, **37**:563-575.

Gromicho M, Collares-Pereira MJ: **Polymorphism of major ribosomal gene chromosomal sites (NOR-phenotypes) in the hybridogenetic fish *Squalius alburnoides* complex (Cyprinidae) assessed through crossing experiments.** *Genetica* 2004, **122**:291-302.

Gromicho M, Ozouf-Coastaz C, Collares-Pereira MJ: **Lack of correspondence between CMA3-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding.** *Cytogenet. Genome Res.* 2005, **109**:507-511.

Gromicho M, Coelho MM, Alves MJ, Collares-Pereira MJ: **Cytogenetic analysis of *Anaecypris hispanica* and its relationship with paternal ancestor of the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex.** *Genome* 2006, **49**:1621-1627.

Hawkins JR: **The detection of rearrangements.** In *Finding Mutations The Basics*. Edited by Hawkins JR. Oxford: IRL Press; 1997:19-26.

Hellmer A, Voiculescu I, Schempp W: **Replication banding studied in two cyprinid fishes.** *Chromosoma* 1991, **100**:524-531.

Howell WM, Black DA: **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective developer: a 1-step method.** *Experientia* 1980, **36**:1014-1015.

Humphries JM, Bookstein FL, Chernoff B, Smith GR, Elder RL, Poss SG: **Multivariate discrimination by shape in relation to size.** *Systematic Zoology* 1981, **30**:291-308.

Ivanov VN: **Techniques for fish chromosome preparation.** *Journal Ichthyology* 1972, **12(3)**:389-396.

Jankun M, Martínez P, Pardo BG, Kirtiklis L, Ráb P, Rábová M, Sanchez L: **Ribosomal genes in Coregonid fishes (*Coregonus lavaretus*, *C. albula* and *C. peled*) (Salmonidae): single and multiple nucleolus organizer regions.** *Heredity* 2001, **87**:672-679.

Jankun M, Ocalewicz K, Mochol M: **Chromosome banding studies by replication and restriction enzyme treatment in Vendace (*Coregonus albula*) (Salmonidae, Salmoniformes).** *Folia Biologica* 2004, **52**:47-51.

Jiménez R, Burgos M, Diaz de la Guardia: **A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's.** *Heredity* 1988, **60**:125-127.

Kapoor VC: *Principles and Practices of Animal Taxonomy.* USA: Science Publishers; 1998.

Kent M, Chandler R, Wachtel S: **DNA analysis by flow cytometry.** *Cytogenetic Cell Genetics* 1988, **47**:88-89.

Klinkhardt MB: **Comparison of the karyology (C-banding, Ag-NOR) of eelpout (*Zoarces viviparous*) from the White Sea and the Baltic Sea.** *Cytobios* 1991, **68**:29-36.

Klinkhardt MB, Tesche M, Greven H: *Database of Fish Chromosomes.* Westarp Wissenschaften, Magdeburg; 1995.

Leitão A, Chaves R, Santos S, Guedes-Pinho H, Boudry P: **Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: comparative karyological analysis within Ostreidae.** *Genome* 2004, **47**:781-788.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, **52**:201-220.

Lima-de-Faria A, Isaksson M, Olsson E: **Action of restriction endonucleases on the DNA and chromosomes of *Muntyacus muntjak*.** *Hereditas* 1980, **92**:267-273.

Lloyd MA, Thorgaard GH: **Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes.** *Chromosoma* 1988, **96**:171-177.

Lozano R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M: **An analysis of coho salmon chromatin by means of C-banding, Ag- and fluorochrome staining, and in situ digestion with restriction endonucleases.** *Heredity* 1991, **66**:403-409

Magalhães MF: **Gradientes espaciais, variabilidade ambiental e estrutura de comunidades piscícolas em rios de tipo mediterrâneo.** Tese de Doutorado. Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa; 2002.

Magalhães MF, Schlosser IJ, Collares-Pereira MJ: **The role of life-history in the relationship between population dynamics and environmental variability in two Mediterranean stream fishes.** *Journal of Fish Biology* 2003, **63**:300-313.

Maltagliati F, Domenici P, Fosch CF, Cossu P, Casu M, Castelli A: **Small-scale morphological and genetic differentiation in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a coastal brackishwater pond and an adjacent pool in northern Sardinia.** *Oceanologica* 2003, **26**:111-119.

Martínez P, Viñas A, Bouza C, Arias J, Amaro R & Sánchez L: **Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain.** *Heredity* 1991, **66**: 9-17.

Mayr E: *Principles and Systematics Zoology.* McGraw-Hill Publishers; 1969.

Medina FJ, Solanilla EL, Sánchez-Pina MA, Fernández-Gómez ME: **Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining.** *Chromosoma* 1986, **94**:259-266.

Meffe GK: **Conservation genetics and the management of endangered fishes.** *Fisheries* 1986, **11**:14-23.

Meffe GK: **Genetic approaches to conservation of rare fishes: examples from North American desert fishes.** *Journal of Fish Biology* 1990, **37 Suppl A**:105-112.

Mesquita N, Carvalho G, Shaw P, Crespo E, Coelho MM: **River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis.** *Heredity* 2001, **86**:253-264.

Mesquita N, Coelho MM: **The ichthyofauna of the small Mediterranean-type drainages of Portugal: its importance for conservation.** In *Conservation of freshwater-fishes: Options for the Future*. Edited by Collares-Pereira MJ, Cowx IG, Coelho MM. Oxford: Blackwell Science; 2002: 65-71.

Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK: **Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates.** *Proc Natl Acad Sci* 1989, **86**:7049-7053.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM: **Struture and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish.** *Can J Genet* 1984, **26**:564-568.

Morescalchi A, Morescalchi MA, Odierna G, Stingo V, Capriglione T: **Karyotype and genome size of zoarcids and notothenioids (Teleostei, Perciformes) from the Ross Sea: cytotaxonomic implications.** *Polar Biology* 1996, **16**:559-564.

Nakamura D, Tiersch TR, Douglas M, Chandler RW: **Rapid identification of sex in birds by flow cytometry.** *Cytogenet Cell Genet* 1990, **53**:201-205.

Nelson JS: *Fishes of the World* 3th Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1994.

Ocalewicz K, Jankun M, Boroń A: **Karyotypic characterization of bream, *Abramis brama* (Pisces, Cyprinidae).** *Folia Zoologica* 2004, **53(3)**:329-334.

- Ohno S, Muramoto J, Christian L: **Diploid-Tetraploid relationship among old-world members of the fish family Cyprinidae.** *Ibidem* 1967, **23**:1-9.
- Ozouf-Costaz C, Foresti F: **Fish cytogenetic research: advances, applications and perspectives.** *Netherlands Journal of Zoology* 1992, **42**:277-290.
- Padilla JA, Fernández-García JL, Rabasco A, Martínez-Trancón M, Rodríguez De Lesma I, Pérez-Regadera JJ: **Characterization of the karyotype of the tench (*Tinca tinca* L.) and analysis of its chromosomal heterochromatic regions by C-Banding, Ag-staining, and restriction endonucleases banding.** *Cytogenet Cell Genet* 1993, **62**:220-223.
- Panzerá F, Álvarez F, Sánchez-Rufas J, Pérez R, Suja J, Scvortzoff E, Estramil E, Dujardin J, Salvatella R: **C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *T. infestans* (Hemiptera-Reduviidae).** *Genome* 1992, **35**:1068-1074.
- Panzerá F, Pérez R, Panzerá Y, Álvarez F, Scvortzoff E, Salvatella R: **Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (H-R).** *Chromosome Research* 1995, **3**:143-150.
- Panzerá F, Giménez-Abián M, López-Sáez J, Giménez-Martín G, Cuadrado A, Cánovas J, De la Torre C.: **Competence for nuclear replication and the NOR-chromosomes of *Allium cepa* L.** *European Journal of Cell Biology* 1997, **72**:9-12.
- Pella J, Miller GB: **Use of genetic marks in stock composition analysis.** In *Populations Genetics and Fishery*. Edited by Ryman N, Utter F. Seattle: Washington University Press; 1987:241-255.
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E: **Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon.** *Cytogenet Cell Genet* 1993, **63**:128-130.
- Phillips RB, Zajicek KD: **Q-band chromosomal polymorphisms in lake trout (*Salvelinus namaycush*).** *Genet* 1982, **101**:227-234.
- Phillips RB, Reed KM: **Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review.** *Aquaculture* 1996, **140**:197-216.

Powers PK, Gold JR: **Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XX. Chromosomal NOR variation in genus *Luxilus*.** *Copeia* 1992:332-343.

Ráb P, Roth P, Arefjev VA: **Chromosome studies of european Leuciscinae fishes (Pisces, Cyprinidae). Karyotype of *Aspius aspius*.** *Caryologia* 1990, **43**:249-255.

Ráb P, Collares-Pereira MJ: **Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes): a review.** *Folia Zoologica* 1995, **44**:193-214.

Rábová M, Ráb P, Ozouf-Costaz C, Ene C, Wanzebock J: **Comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the fish genus *Vimba* (Cyprinidae).** *Genetica* 2003, **118**:83-91.

Rábová M, Monteiro R, Collares-Pereira MJ, Rab P: **Short-term fin fibroblast culture for fish karyotyping.** In *Techniques of Fish Cytogenetics*. Edited by Ozouf-Costaz C, Foresti F, Almeida-Toledo LF, Pisano E, Kapoor BG. USA: Science Publisher, Inc; in press.

Reed KM, Phillips RB: **Molecular cytogenetic analysis of highly repeatd DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*.** *Cytogenet Cell Genet* 1995, **70**:104-107.

Ritossa FM, Atwood KC, Lindsly DL, Spiegelman S: **On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA.** *Natl Cancer Inst Monogr* 1966, **23**:449-472.

Robalo JI, Almada VC, Santos CS, Moreira MI, Doadrio I: **New species of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1832 (Actynopterigii, Cyprinidae) from western Portugal.** *Graellsia* 2005, **61**:19-29.

Robalo JI, Almada VC, Levy A, Doadrio I: **Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007, **42**:362-372.

Roberts FL: **Chromosome cytology of the Osteichthyes.** *Progr. Fish. Cult.* 1967, **29**:75-83.

Rodrigues EMT: **Detecção de marcadores genéticos na diferenciação das populações de *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira, 1980 (Pisces, Cyprinidae), das bacias da Samarra e do Mira.** Relatório de Estágio de Licenciatura. Faculdade de Ciências Universidade Lisboa; 1993.

Rodrigues EM, Collares-Pereira MJ: **NOR polymorphism in the Iberian Species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces, Cyprinidae).** *Genética* 1996, **98**:59-63.

Rossi AR, Gornung E, Crosetti D, De Innocentiis S, Sola L: **Cytogenetic analysis of *Oedalechilus labeo* (Pisces: Mugilidae), with a report of NOR variability.** *Marine Biology* 2000, **136**:159-162.

Rossi AR, Gornung E, Sola L, Nirchio M: **Comparative molecular cytogenetic analysis of two congeneric species, *Mugil curema* and *M. liza* (Pisces: Mugiliformes), characterized by significant karyotype diversity.** *Genetica* 2005, **125**:27-32.

Ruiz IRG: **Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides.** *Cienc Cult* 1982, **34**:470-473.

Sánchez L, Martínez P, Bouza C, Vinãs A: **Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes.** *Heredity* 1991, **66**:241-249.

Schaefer SA: **Morphometric investigations in cyprinid biology.** In *Cyprinid Fishes. Systematics, Biology and Exploitation*. Edited by Winfield IS, Nelson JS: Chapman and Hall; 1991:55-82.

Sharma AK, Sharma A: *Chromosomes Techniques. Theory and Practice*. Butterworth & CO; 1980:711pp.

Silva TL, Reis A, Hewitt, Roseiro JC: **Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos.** *Boletim Biotecnologia* 2004, **77**:32-40.

Simpson GG: *Princípios de Taxonomia Animal*. New York: Columbia University Press; 1962.

Slijepcevic P: **Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion.** *Chromosoma* 1998, **107**:136-140.

Sola L, Cataudella S, Capanna E: **New developments in vertebrate cytotaxonomy. III. Karyology of bony fishes: a review.** *Genetica* 1981, **54**:285-328.

Sola L, Arcangelli R, Cataudella S: **Nucleolus organizer chromosomes in a teleostean species of tetraploid origin, *Cyprinus carpio*.** *Cytogenet Cell Genet* 1986, **42**:183-186.

Sola L, Bressanelo S, Rasch EM, Monaco PJ: **Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. IV. Sex chromosomes, sex chromatin composition and Ag-NOR polymorphisms in *Poecilia latipinna*: a population from Mexico.** *Heredity* 1993, **70**:67-71.

Sola L, Gornung E: **Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview.** *Genetica* 2001, **111**:397-412.

Sousa V, Penha F, Collares-Pereira MJ, Chikhi L, Coelho MM: **Genetic structure and signature of population decrease in the critically endangered freshwater cyprinid *C. lusitanicum*.** (submetido).

Strauss RE: **Evolutionary allometry and variation in body form in south american catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae).** *Systematic Zoology* 1985, **34**:381-396.

Strauss RE, Bond CE: **Taxonomic methods: morphology.** In *Methods for Fish Biology*. Edited by Schreck CB, Moyle PB. Maryland U.S.A: American Fisheries Society; 1990:109-139.

Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp. Cell Res.* 1972, **75**:304-306.

Sumner AT: *Chromosome Banding*. London: Unwin Hyman; 1990:434pp.

Takai A, Ojima Y: **Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes.** In *Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fish Biology: 1986; Tokyo*. Edited by Uyeno T, Arai R, Taniuchi T, Matsuura K: Ichthyological Society of Japan; 1986:899-909.

Tiersch TR, Chandler RW, Wachtel SS, Elias S: **Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content.** *Cytometry* 1989, **10**:706-710.

Thorgaard GH: **Chromosomal differences among rainbow trout populations.** *Copeia* 1983, 650-662.

Thorgaard GH, Allen SK: **Chromosome manipulation and markers in fisheries management.** In *Populations Genetics and Fishery*. Edited by Ryman N, Utter F. Seattle: Washington University Press; 1987:310-331.

Ueda T, Naoi H, Arai R: **Flexibility on the karyotype evolution in bitterlings (Pisces, Cyprinidae).** *Genetica* 2001, **111**:423-432.

Verma RS, Babu A: **Fluorescence in situ hybridization techniques.** In *Human Chromosomes. Principles and Techniques*. Edited by Verma RS, Babu A. USA: McGraw-Hill, Inc.; 1995:184-227.

Vindeløv LL, Christensen IJ, Jensen G, Nissen NI: **Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standars.** *Cytometry* 1983, **3**:328-331.

Warburton D, Hendreson AS: **Sequential silver staining and hybridization *in situ* on nucleolus organizing regions in human cells.** *Cytogen Cell Genet* 1979, **24**:168-175.

Weir BS: **Intraspecific differentiation.** In *Molecular Systematics*. Edited by Hillis DM, Morritz C. Sunderland: Sinauer Associates; 1990:373-410.



ANEXO I – Espécies piscícolas nativas das águas continentais ibéricas

Famílias / Espécies	P	E	Estatuto P ¹	Estatuto E ²	Convenção de Berna	Directiva Habitats
PETROMYZONTIDAE						
<i>Lampetra planeri</i>	+	+	CR	CR	Annexe III	Annexes II
<i>Lampetra fluviatilis</i> ^m	+	+	CR	RE	Annexe III	Annexes II, IV
<i>Petromyzon marinus</i> ^m	+	+	VU	VU	Annexe III	Annexe II
ACIPENSERIDAE						
<i>Acipenser sturio</i> ^m	+	+	RE	CR	Annexe II	Annexes II*, IV
ANGUILLIDAE						
<i>Anguilla anguilla</i> ^m	+	+	EN	VU		
CLUPEIDAE						
<i>Alosa alosa</i> ^m	+	+	EN	VU	Annexe III	Annexes II, V
<i>Alosa fallax</i> ^m	+	+	VU	VU	Annexe III	Annexes II, V
SALMONIDAE						
<i>Salmo salar</i> ^m	+	+	CR	EN	Annexe III	Annexes II, V
<i>Salmo trutta trutta</i> ^m	+	+	CR	VU		
<i>Salmo trutta fario</i>	+	+	LC	VU		
GASTEROSTEIDAE						
<i>Gasterosteus gymnurus</i>	+	+	EN	EN		
BLENNIIDAE						
<i>Salapia fluviatilis</i>	+	+	EN	EN	Annexe III	Annexes II
BALITORIDAE						
<i>Barbatula barbatula</i>		+		VU		
COBITIDAE						
<i>Cobitis calderoni</i>	+	+	EN	VU	Annexe III	
<i>Cobitis paludica</i>	+	+	LC	VU	Annexe III	
<i>Cobitis vettonica</i>		+		EN		
CYPRINIDAE						
<i>Anaocypris hispanica</i>	+	+	CR	EN	Annexe III	Annexes II, IV
<i>Barbus bocagei</i>	+	+	LC	LR/nt	Annexe III	Annexe V
<i>Barbus comizo</i>	+	+	EN	VU	Annexe III	Annexes II, V
<i>Barbus graellsii</i>		+		LR/nt	Annexe III	Annexe V
<i>Barbus guiraonis</i>		+		VU	Annexe III	Annexe V
<i>Barbus haasi</i>		+		VU		Annexe V
<i>Barbus meridionalis</i>		+		VU	Annexe III	Annexes II, V
<i>Barbus microcephalus</i>	+	+	NT	VU	Annexe III	Annexe V
<i>Barbus steindachneri</i>	+		NT			
<i>Barbus sclateri</i>	+	+	EN	LR/nt	Annexe III	Annexe V
<i>Chondrostoma almacai</i>	+		CR			
<i>Chondrostoma arcasii</i>	+	+	EN	VU	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma arrigonis</i>		+		EN	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma duriense</i>	+	+	LC	VU	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma lemmingii</i>	+	+	EN	VU-EN	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma lusitanicum</i>	+		CR			
<i>Chondrostoma oligolepis</i>	+		LC			
<i>Chondrostoma occidentale</i>	+		-			
<i>Chondrostoma oretanum</i>		+		CR		
<i>Chondrostoma miegii</i>		+		LR/nt	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma polylepis</i>	+	+	LC	LR/nt	Annexe III	Annexe II

ANEXO I – Espécies piscícolas nativas das águas continentais ibéricas

Famílias / Espécies	P	E	Estatuto P ¹	Estatuto E ²	Convenção de Berna	Directiva Habitats
<i>Chondrostoma turiense</i>		+		EN	Annexe III	Annexe II
<i>Chondrostoma willkommii</i>	+	+	VU	VU	Annexe III	Annexe II
<i>Squalius alburnoides</i>	+	+	VU	VU	Annexe III	Annexe II
<i>Squalius aradensis</i>	+		CR			
<i>Squalius carolitertii</i>	+	+	LC	VU		
<i>Squalius cephalus</i>		+		VU		
<i>Squalius palaciosi</i>		+		EN		Annexe II
<i>Squalius pyrenaicus</i>	+	+	EN	VU-EN	Annexe III	
<i>Squalius torgalensis</i>	+		CR			
<i>Phoxinus phoxinus</i>		+		LR/nt VU		
<i>Tinca tinca</i> ^(?)	+	+	NE			
COTTIDAE						
<i>Cottus gobio</i>		+		CR	Annexe II	Annexe II
CYPRINODONTIDAE						
<i>Aphanius iberus</i>		+		EN	Annexes II, III	Annexe II
VALENCIIDAE						
<i>Valencia hispanica</i>		+		EN	Annexe II	Annexes II*, IV
ATHERINIDAE ^{ma}						
<i>Atherina boyeri</i>	+	+	DD			
PLEURONECTIDAE ^{ma}						
<i>Platichthys flesus</i>	+	+	DD			
MUGILIDAE ^{ma}						
<i>Chelon labrosus</i>	+	+				
<i>Mugil cephalus</i>	+	+				
<i>Liza ramada</i>	+	+	LC			
<i>Liza aurata</i>	+	+				
MORONIDAE ^{ma}						
<i>Dicentrarchus labrax</i>	+					
SYNGNATHIDAE ^{ma}						
<i>Syngnathus abaster</i>	+	+				
TOTAL (excluindo as famílias marinhas)	35	44	24	37	31	30

Anexo I.1: Espécies piscícolas nativas nas águas continentais ibéricas e respectivos estatutos de conservação (P – Portugal; E – Espanha; assinaladas a negrito as espécies de peixes primários endémicas; Categorias IUCN: *EX* – extinto; *EW* – extinto na natureza; *RE* – regionalmente extinto; **CR** – criticamente em perigo; **EN** – em perigo; **VU** – vulnerável; *NT* – quase ameaçado; *LC* – pouco preocupante; *DD* – informação insuficiente; *NE* – não avaliado; *NA* – não aplicável).

¹ Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral et al., 2005); ² “Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de Espana” (Doadrio, 2001, ed.); ^m espécie migradora anfibiótica; ^{ma} família marinha, de presença ocasional nas águas doces; ^(?) ciprinídeo cuja presença na PI como espécie introduzida não está totalmente confirmada; * espécie prioritária na Directiva Habitats 92/43/CEE, anexo II (1992). (Collares-Pereira, Com. Pessoal).

PBS 10x (Phosphate-buffered saline)

- 87,66g NaCl + 70,98g Na₂HPO₄
- Adicionar 900ml de H₂O dest
- Ajustar o pH com HCl (1N) até 7,4
- Perfazer com H₂O dest até 1000ml
- Autoclavar e guardar à temperatura ambiente

Meio de Cultura Completo

- 80ml Meio simples Leibowitz L-15
- 20ml Soro Fetal Bovino
- 1ml L-Glutamina
- 0,5ml penicilina – streptomicina

Tampão Fosfato (0,01M)

(Guardar a 4°C)

- 9,072g KH₂PO₄ + 23,876g Na₂HPO₄.12H₂O
- Adicionar 900ml de H₂O
- Ajustar o pH até 6,8
- Perfazer com H₂O dest até 1000ml

Tampão Mcllvaine

(Guardar a 4°C)

- 9,6g ácido cítrico + 14,2g Na₂HPO₄
- Adicionar 400ml de água dest
- Ajustar o pH a 7,0
- Perfazer com H₂O dest até 500 ml

Mcllvaine / MgCl₂

- 1,015 g de MgCl₂
- Dissolver em tampão Mcllvaine

Cromomicina A₃

(Guardar a -20°C)

- Diluir a cromomicina para uma concentração de 0,5mg/ml, em tampão Mcllvaine/MgCl₂
- Adicionar algumas gotas de etanol absoluto

Hepes / NaCl

(Guardar a 4°C)

- 595mg Hepes (5mM) + 4,375g NaCl (0,15M)
- Adicionar 400ml de H₂O dest
- Ajustar o pH a 7,0 com 1N NaOH
- Perfazer com H₂O dest até 500ml

Methyl Green + Hepes / NaCl

- 6mg de Methyl Green
- Dissolver em 50ml de Hepes / NaCl

2XSSC

- 14,4g NaCl + 8,24g C₆H₅Na₃O₇
- Adicionar 900ml de H₂O dest
- Ajustar o pH a 7,0
- Perfazer com H₂O dest até 1000ml
- Autoclavar e guardar à temperatura ambiente

1XPBD(100 ml)

(Guardar a 4°C)

- 20ml 20XSSC + 1ml de Tween
- Perfazer com H₂O dest até 100ml
- Ajustar o pH a 7,0

DAPI/Antifade

(Guardar no escuro a 4°C)

- 1ml Antifade Vectashield (Vectorlab)
- 12µl DAPI (100µg/ml solução DAPI em 2XSSC e guardar em alíquotas a -20°C)

Solução de criopreservação

(Guardar no escuro a 4°C)

- 85,5g sacarose + 11,76g ácido cítrico
- 50ml de DMSO (dimethyl sulfoxide)
 - Ajustar o pH a 7,6
 - Perfazer com H₂O dest até 1000 ml
- Adicionar 900ml de H₂O dest

Solução tampão+iodeto propídio

- 500mg ácido cítrico + 500µl Nonidet
- 25mg iodeto de propídio + 25mg Ribonuclease A
- Adicionar 900ml de H₂O dest
- Ajustar o pH a 7,6
- Perfazer com H₂O dest até 1000 ml
- Guardar em alíquotas de 10-20 ml, a -20°C ou a -80°C (tubos envolvidos em folha de alumínio)

ANEXO III – Número de exemplares e de sinais CMA₃-/ Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum*

População	Nº metafases observadas	Nº sinais CMA ₃ -NORs positivos				Nº sinais Ag-NORs positivos			
		1	2	3	4	1	2	3	4
SR73	12	0	1	9	2	0	1	9	2
SR74	33	0	0	9	24	0	0	19	14
SR81	10	0	5	5	0	5	5	0	0
SR83	31	6	17	7	1	9	19	3	0
SR84	35	1	12	18	4	12	19	4	0
SR88	4	0	0	4	0	0	4	0	0
SR89	13	0	1	12	0	6	5	2	0
SR90	32	0	0	15	17	6	13	9	4
SR91	29	0	0	16	13	0	4	20	5
SR92	2	0	2	0	0	0	2	0	0
SR93	7	0	0	6	1	0	5	2	0
SR94	25	0	2	13	10	2	10	11	2
SR95	4	0	4	0	0	0	4	0	0
SR96	27	0	3	13	11	6	5	15	1
SR97	3	0	0	0	3	2	0	0	1
SR98	32	10	22	0	0	14	18	0	0
SR99	25	0	1	22	2	2	11	11	1
SR100	33	0	0	1	32	3	5	13	12
SR101	30	0	14	16	0	3	20	7	0
SR102	19	0	1	18	0	7	7	5	0
SR103	24	0	1	12	11	13	8	3	0
SR104	33	0	0	33	0	1	4	28	0
SR105	29	0	0	27	2	1	7	21	0
SR106	27	3	17	7	0	9	15	3	0
SR107	31	5	14	12	0	6	24	1	0
SR108	24	0	3	21	0	7	10	7	0
SR109	28	0	0	16	12	0	3	18	7
SR110	32	0	0	24	8	13	13	4	2
SR113	14	0	0	14	0	0	4	10	0
SR114	20	0	9	11	0	5	12	3	0
SR116	25	4	19	2	0	7	18	0	0
SR117	23	0	0	23	0	2	2	19	0
SR118	31	0	4	27	0	2	14	15	0
SR120	37	0	3	33	1	0	16	20	1
SR121	17	6	11	0	0	16	1	0	0
SR125	8	0	2	4	2	0	7	1	0
SR127	35	0	0	35	0	3	18	14	0
Total (N=36)	844	35 4,15%	168 19,91%	485 57,46%	156 18,48%	162 19,19%	333 39,45%	297 35,19%	52 6,16%

Anexo IV.1: Número de exemplares, total de placas metafásicas analisadas, e número de sinais CMA₃- e Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum* na população da Samarra; a cinza está representado o espécime triploíde.

ANEXO III – Número de exemplares e de sinais CMA₃-/ Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum*

População	Nº metafases observadas	Nº sinais CMA ₃ -NORs positivos				Nº sinais Ag-NORs positivos			
		1	2	3	4	1	2	3	4
TR7	27	0	3	24	0	2	14	11	0
TR8	39	0	0	1	38	0	7	20	12
TR9	34	0	0	0	34	0	1	23	10
TR10	14	0	0	3	11	3	1	2	8
TR11	26	0	0	25	1	1	23	2	0
TR12	32	1	31	0	0	1	4	26	1
TR14	29	0	10	18	1	11	14	4	0
TR15	32	2	29	1	0	5	26	1	0
TR16	24	0	17	7	0	1	17	6	0
TR19	30	0	20	10	0	9	20	1	0
TR20	28	0	27	1	0	4	24	0	0
TR21	27	0	26	1	0	17	9	1	0
TR22	21	0	11	8	2	9	8	2	2
TR23	5	0	0	4	1	0	4	1	0
TR27	8	0	0	2	6	1	6	1	0
TR28	19	0	0	4	15	12	7	0	0
TR29	9	0	0	6	3	9	0	0	0
TR33	3	0	0	1	2	0	1	2	0
TR38	3	0	0	0	3	0	0	2	1
Total (N=19)	410	3 0,73%	174 42,44%	116 28,29%	117 28,54%	85 20,73%	186 45,37%	105 25,61%	34 8,29%
RMR3	44	1	24	19	0	2	35	7	0
RMR10	34	0	0	7	27	7	11	16	0
RMR11	22	0	0	5	17	0	5	13	4
RMR13	30	0	3	22	5	4	6	19	1
RMR14	30	0	1	27	2	6	10	13	1
RMR37	25	0	13	12	0	9	12	4	0
RMR38	22	0	0	17	5	2	11	9	0
RMR40	30	0	7	23	0	0	12	18	0
RMR44	18	0	7	11	0	5	6	7	0
RMR46	25	0	18	7	0	15	7	3	0
RMR47	31	0	2	29	0	0	12	19	0
RMR48	18	0	1	10	7	10	6	2	0
RMR49	32	1	17	14	0	4	17	11	0
RMR50	22	0	0	22	0	5	4	13	0
RMR51	19	0	0	12	7	0	12	7	0
RMR58	20	0	0	11	9	2	9	9	0
RMR60	28	0	2	24	2	2	17	9	0
RMR62	37	0	0	12	25	13	16	7	1
RMR63	34	0	0	8	26	1	7	25	1
RMR64	35	0	0	3	32	6	8	13	8
Total (N=20)	556	2 0,36%	95 17,09%	295 53,06%	164 29,50%	93 16,73%	223 40,11%	224 40,29%	16 2,88%

Anexo IV.2: Número de exemplares, total de placas metafásicas analisadas, e número de sinais CMA₃- e Ag-NORs positivos de *C. lusitanicum* na população do Tejo 1 (em cima) e da população do Tejo 2 (em baixo).