



Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas

**Caracterização Citogenética de *Hoplias malabaricus*
capturados na Região do Médio e Baixo Paraguaçu.**

Analú Cruz Souza

Cruz das Almas, Novembro de 2010.



Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas

**Caracterização Citogenética de *Hoplias malabaricus*
capturados na Região do Médio e Baixo Paraguaçu.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Colegiado do Curso de
Ciências Biológicas para obter-se o Diploma
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra Soraia Barreto Aguiar
Fonteles.

Orientanda: Analu Cruz Souza.

Cruz das Almas, Novembro de 2010

Ficha Catalográfica

S729

Souza, Analu Cruz

Caracterização citogenética do Teleósteo *Hoplias malabaricus* capturados na Região do médio rio Paraguaçu/ Analu Cruz Souza._ Cruz das Almas - Ba, 2010.

24 f.; il.

Orientador: Soraia Barreto Aguiar Fonteles.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Área de Concentração: Ciências Biológicas.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 16 / 12 / 2010



Prof. Soraia Barreto Aguiar Fonteles, D.Sc

Orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB



Prof. Ricardo Franco Cunha Moreira, D.Sc

1º Membro

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB



Profª. Meiby Carneiro de Paula Leite, D.Sc.

2º Membro

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

“Aprender é a única coisa que nunca se cansa, nunca se tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Agradeço ao Senhor Jesus por toda coragem me concedida para realizar este trabalho. Pelas lágrimas recolhidas nos momentos de dificuldades e desânimo. Pela alegria de saber que estava concretizando-se um sonho almejado, e de ter consciência de está fazendo o que gosto na área escolhida. Ah Senhor tua presença em todos os momentos foram decisivos em minha vida. A Ti Senhor a Honra, a Glória e Todo o Louvor.

Aos meus pais que mesmo na distância soube me ensinar no silêncio da saudade. Ensinaram-me essas lições que a vida passa para nós quando os pais na ausência desejariam. Amo vocês. Obrigada por entenderem minha escolha, e por me esperarem ansiosos em cada retorno à casa materna.

Aos amigos e colegas que souberam compartilhar vitórias e lutas nesses quatro anos e meio de convivência. São muitos que gostaria de abraçar nesse momento especial. Aqueles que um dia estive comigo e que hoje torcem para que eu siga em frente com cabeça erguida. Encontraremos-nos novamente nesses caminhos da vida. E aos amigos-irmãos que estão ainda comigo nessa caminhada, á vocês um grande abraço e muito carinho.

Agradeço de todo coração a minha querida amiga, professora, orientadora desse trabalho, Prof. Dra Soraia Barreto Aguiar Fonteles. Primeiro quero agradecer por acreditar que possuo potencial para desenvolver feitos nessa área tão linda que é a Genética, obrigada pelos ensinamentos de Citogenética, área que não conhecia antes, mas com você aprendi a amar. Agradeço por todos os incentivos e correções acadêmicas. E por ter disponibilizado o Laboratório de Ictiogenética para que pudesse aprender a fazer ciência com Amor e Responsabilidade, cuidando do bem estar dos animais que neste caso foram e continuará sendo, os peixes.

Agradeço a UFRB Universidade que me acolheu e formou-me Bacharel em Ciências Biológicas. Ao NEPA (Núcleo de Pesquisa em Pesca e Aqüicultura) pelos amigos conquistados e pelos espaços físicos laboratoriais cedidos na realização deste trabalho.

Resumo

A citogenética consiste em estudos do número cromossômico como também das formas cromossômicas. Existem técnicas para visualização dos cromossomos obtidos através de metáfases. Essas técnicas podem ser convencional com Giemsa e/ou coloração diferenciais de Regiões Organizadoras de Nucléolos e Banda C. A variabilidade cariotípica em peixes mostra a necessidade de se analisar sistematicamente os seus grupos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente o Teleósteo *Hoplias malabaricus* capturados na Região do médio rio Paraguaçu. Essa análise foi realizada através de coletas em Tupiaçu distrito de Cabaceiras do Paraguaçu. Foi sistematizado o número cariótipo de *Hoplias malabaricus* de $2n=40$, encontradas Regiões Organizadoras de Nucléolos na região telomérica dos cromossomos. Esses resultados corroboram com outros estudos, os quais mencionam que *Hoplias malabaricus* constitui-se em um complexo de espécie, com cinco cariótipos diferentes, variando de $2n=39$ a $2n=42$. E assim, faz-se necessário uma revisão taxonômica da espécie, já que dados morfológicos e citogenéticos afirmam que possa existir varias espécies crípticas dentro de uma única classificação taxonômica.

Palavras- Chaves: Erythrinidae, cromossomos e espécie críptica.

Abstract

Cytogenetics is the study of chromosome number as well as ways chromosome morphology. There are techniques for visualization of chromosomes obtained from metaphases. These techniques can be with conventional Giemsa and / or differential staining Nucleolar Organizer Regions and C. Banda. The karyotypic variability in fish shows the need to systematically analyze their groups. The goal of the present work was to characterize cytogenetically *H. Malabaricus*. This analysis was performed using samples in Tupiaçu district of Cabaceiras do Paraguaçu. It was systematized the number karyotype of *H. malabaricus* $2n = 40$, found Nucleolar Organizer Regions in the telomeric region of chromosomes. These results corroborate other studies, which mention that *H. malabaricus* is in a complex of species, with five different karyotypes ranging from $2n = 39$ to $2n = 42$. And so it is necessary a taxonomic revision of the species, since morphological and cytogenetic say there may be several cryptic species within a single classification.

Key Words: Erythrinidae, chromosomes and cryptic species.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 Introdução..... | 6 |
| 2 Justificativa..... | 7 |
| 2.1 Importância Econômica da Pesca..... | 7 |
| 3 Revisão de Literatura..... | 8 |
| 3.1 Família Erythrinidae..... | 8 |
| 3.2 Taxonomia de <i>Hoplias malabaricus</i> | 8 |
| 3.3 Aspectos Ecológicos de <i>Hoplias malabaricus</i> | 12 |
| 3.4 Reprodução..... | 12 |
| 3.5 Desova e Cuidado Parental..... | 13 |
| 3.6. Citogenética..... | 14 |
| 4 Objetivo Geral..... | 17 |
| 4.1 Objetivos Específicos | 17 |
| 5 Material e Metodos..... | 18 |
| 5.1 Considerações Gerais sobre a Área de Estudo..... | 18 |
| 6 Resultados | 21 |
| 7 Discussão..... | 23 |
| 8 Conclusão..... | 24 |
| Referências Bibliográficas..... | 25 |

1. Introdução

Os cromossomos de vertebrados têm sido desde longa data objeto de interesse de pesquisas, as quais procuraram aperfeiçoar diferentes métodos e técnicas de obtenção e análise (Kasahara, 2009). A maneira para conseguir cromossomos dos organismos pode ser através da citogenética. Esta técnica consiste em verificar o número cromossomo das espécies em estudo, como também determinar a morfologia cromossômica. Para isso, lança-se mão de metodologias para visualização dos cromossomos, como coloração convencional por Giemsa, Ag-NORs (coloração por nitrato de prata) e outras colorações diferenciais.

Os peixes apresentam uma grande diversidade de formas cariótipas que incluem variações no número e forma cromossômicas, presença de cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais, e prováveis polimorfismos cromossômicos.

Segundo Martins (2006), a pesquisa dos cromossomos constitui uma poderosa ferramenta que pode contribuir para a obtenção de respostas para muitas dúvidas relacionadas com a biogeografia, evolução, estrutura cromossômica e organização do genoma dos peixes.

Nos últimos anos, os trabalhos de citogenética de peixes têm se expandido significativamente, superando a fase de simples identificação do número e morfologia dos cromossomos, passando a abordar aspectos populacionais, em que se analisam tipos distintos de polimorfismos. A variabilidade cariotípica verificada nesses estudos revela a necessidade de analisar sistematicamente grupos naturais de peixes, levando em conta sua distribuição geográfica e utilizando ao máximo as facilidades de técnicas genéticas e metodologias disponíveis. Sendo assim, os trabalhos de citogenética de peixes é um campo que requer maior exploração.

2. Justificativa

2.1 Importância Econômica da Pesca

A atividade pesqueira para exploração de recursos em águas continentais é geralmente realizada por comunidades ribeirinhas. Esse recurso pesqueiro, em muitos casos são fontes de rendas e base para alimentação (Hilsdorf, *et al.* 2006). O entendimento da estrutura genética populacional de uma dada espécie é importante para a conservação de recurso biológico aquático, pois permite o conhecimento das diferenças genéticas geradas por processos anteriores e suas relações com as diferenças adaptativas das populações. Ainda de acordo com Hilsdorf *et al.* (2006), a exploração indiscriminada de um estoque pesqueiro pode comprometer várias populações de uma mesma espécie. O conceito de estoque de pesca defini-se como um grupo de peixes da mesma espécie, habitando uma mesma área e que estão dentro da faixa etária (ou de tamanho) permitida para serem pescados.

As preocupações e ações referentes aos impactos sobre a diversidade nos ecossistemas aquáticos estão muito mais relacionadas à percepção do desaparecimento de uma dada espécie do que a diminuição da diversidade genética da espécie. A depauperação da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo. A habilidade de uma espécie de se adaptar às constantes modificações do meio ambiente depende em grande parte do nível de diversidade genética encontrada na mesma (Solé-Cava, 2001).

Segundo Hilsdorf *et al.* (2006), a pesca pode afetar a composição ou mesmo a variabilidade de uma espécie, uma das questões importantes para o manejo de estoques está relacionada a identificação correta da espécie que está sendo capturada. A relevância disto reside no fato de que registros de desembarque para estimativa de biomassa e cotas de captura podem ser sub ou superestimados, em razão da existência de espécies crípticas, isto é, espécies diferentes que por semelhanças fenotípicas são incluídas sob um mesmo táxon. Muitas vezes a análise genética destas espécies pode levar a considerá-las como estoque de uma mesma espécie, ou de espécie diferente.

O grau de diferenciação genética em organismos aquáticos depende de vários fatores que levam as populações à homogeneidade ou heterogeneidade. O estudo do fluxo gênico entre as populações, por exemplo, esclarece em última

instância, o quanto as populações podem estar em conexão genética ou isolada ao longo de suas histórias.

A avaliação da organização genética de uma espécie distribuída em uma ou várias bacias hidrográficas, determina a intensidade com que o fluxo gênico entre suas populações vem ocorrendo. Se a troca de genes entre estas populações tem sido limitada e uma determinada espécie esteja sobre pesca predatória, a possibilidade de sua recuperação genética pela migração é pequena e a chance de colapso da pesca dessa espécie em determinada região geográfica pode ocorrer devido ao evento de extinção.

Por ocupar uma posição básica na filogenia dos vertebrados e constituir quase a metade desse grupo; estar distribuído em uma enorme diversidade de habitats e por apresentar uma série de peculiaridades citogenéticas, os peixes constituem um grupo ideal para investigação de problemas evolutivos (Nirchio, 2006). Estudo genético em peixes de água doce tem sido conduzido por diversos grupos de pesquisas no Brasil elucidando vários aspectos da caracterização cromossômica, processos de hibridização, conservação genética, sistemática molecular (Wasko *et al.* 2004).

Sendo assim, justifica-se a importância deste trabalho com estudos genéticos da espécie *Hoplias malabaricus*, para que se conheça melhor as populações locais e evite seu esgotamento pesqueiro, já que sua pesca ocorre no baixo Rio Paraguaçu pelas comunidades ribeirinhas da região. Outra razão para seu estudo citogenético se deve a pequena amostragem no Estado da Bahia nessa área de pesquisa, tendo em vista que em outros estados do Brasil já foram realizados estudos cariótipos prévios com a espécie.

3. Revisão de Literatura

3.1 Família Erythrinidae

Erythrinidae é uma pequena família de Characiformes, peixes de água doce que inclui três gêneros denominados *Erythrinus* (Scopoli, 1777), *Hoplerythrinus* (Gill, 1896) e *Hoplias* (Gill, 1903) com ampla distribuição geográfica. Os eritrínídeos são peixes que, em geral, possuem variações cariótípicas de interesse evolutivo (Bertollo *et al.* 2000). Os três gêneros são carnívoros, vivendo preferencialmente em ambientes parados (Bertollo *et al.* 1997).

Segundo Morelli *et al.* (2007), a taxonomia e sistemática dos Erythrinidae não está totalmente esclarecida, existindo várias dúvidas sobre suas relações filogenéticas.

O gênero *Hoplias* se distingue dos outros dois gêneros da família Erythrinidae por apresentar dentes caninos no maxilar e na porção anterior do dentário, possuem a nadadeira ventral com oito raios, e anal com 10 a 12 raios (Britski *et al.*, 1988). Esse gênero é composto por nove espécies, sendo elas: *H. aimara* (Valenciennes, 1847); *H. brasiliensis* (Agassiz, 1829); *H. lacerdae* (Miranda Ribeiro, 1908); *H. macrophthalmus* (Pellegrin, 1907); *H. malabaricus*, (Bloch, 1794); *H. microcephalus* (Agassiz, 1829); *H. microlepis* (Günther, 1864); *H. patana* (Valenciennes, 1847) e *H. teres* (Valenciennes, 1847). No Brasil, são encontradas cinco espécies: *H. brasiliensis*, *H. lacerdae*, *H. macrophthalmus*, *H. malabaricus* e *H. microcephalus*.

3.2 Taxonomia de *Hoplias malabaricus*

A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), pertence à família Erythrinidae, e é conhecida popularmente como traíra. Essa espécie é natural do Rio Paraguauçu, carnívora, de comportamento sedentário e com ampla distribuição na América do Sul e Central. Em *Hoplias malabaricus* a linha dentária converge na forma de “V” invertido, possui língua provida de placas ósseas com dentes diminutos (Britski *et al.* 1988). (Figura 1).



Fig. 1 *Hoplias malabaricus* (Traíra). Fonte: Analu Souza

De acordo com Morelli (1998), *H. malabaricus* apresenta o corpo cilíndrico com uma leve depressão lateral, possui nadadeira dorsal angular, cabeça bastante longa, boca ampla e mandíbulas proeminentes, com dentes fortes e cônicos, com presença de caninos. Os olhos são circulares e estão dispostos na metade proximal da cabeça. A porção dorsal da cabeça mostra-se mais escura do que a ventral, assim como o restante do corpo, que varia desde marrom escuro passando a um bege claro. Possui manchas marrons, dispostas perpendicularmente, com uma leve inclinação em direção à cauda. Segundo Oyakawa (1998), graças a esta coloração, a traíra se camufla na vegetação para capturar suas presas. Na fase adulta apresentam hábitos sedentários, típicos de espécies não migratórias, ovos adesivos e cuidados parentais (Lamas, 1993). Ocupam o topo da cadeia alimentar nos pequenos cursos d'água, predando outras espécies de peixes de menor tamanho, inclusive de sua própria espécie, crustáceos e moluscos (Kenny, 1995; Galvis *et al.* 1997; Brito, 2003). Apresentam hábitos noturnos e, durante o dia, aninham-se em locais com vegetação abundante (Sabino, 1998), atingem cerca de 60 cm de comprimento e pesam em torno de 3 kg (Morelli, 1998).

A espécie *H. malabaricus* apresenta uma das maiores distribuições de peixes characiformes da região Neotropical (Maria, 2007) e está presente no Continente Americano, desde o sul da província de Buenos Aires (rio Salado) até o Panamá (Berra, 1981), diferentemente das demais espécies de *Hoplias*, que estão restritas a algumas pequenas áreas. Segundo Oyakawa (2003), em sua recente revisão bibliográfica de peixes de água doce, são reconhecidas nove espécies para o

gênero *Hoplias*, mas sugere-se a existência de formas ainda não descritas, o que reforça a idéia de uma situação taxonômica confusa para o táxon.

Segundo Maria (2007), outros autores consideram *Hoplias malabaricus* como um conjunto de espécies, e ainda há a necessidade de definição destas espécies. Pesquisas realizadas por especialistas não chegaram a um consenso quanto á taxonomia dentro do gênero *Hoplias*, o que existi é um conflito em relação ao número de espécie (Bertollo *et al.*, 2000). Diversos estudos de citogenética corroboram com estas dúvidas taxonômicas, esses estudos mostram uma grande diversidade cariotípica entre populações diferentes de *H. malabaricus* indicando a ocorrência de diferentes espécies escondidas. Espécies deste gênero tais como: *H. malabaricus*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Erythrinus erythrinus* possuem diferentes cariótipos (citótipos), facilmente caracterizada pelo número de cromossomos e composição, bem como pela presença de distintos sistemas de cromossomos sexuais. Essas constatações podem levar, futuramente, uma revisão taxonômica do gênero *Hoplias* (Bertollo *et al.* 1997, Dergam *et al.* 1998; Dergam, 1990).

Vicari *et al.* (2005), cita uma recente revisão do táxon onde foram identificados sete principais citótipos diferentes para esta espécie. Estas diferenças entre os cariótipos evidenciam a ocorrência de ausência de fluxo gênico. Com a possibilidade de isolamento reprodutivo nas populações dessa espécie, surge um caso de complexo de espécie, com várias espécies crípticas reconhecidas dentro de um único nome.

Hoplias malabaricus é uma espécie intensamente estudada no ponto de vista citogenético (Bertollo *et al.*, 1997). Análises populacionais de diferentes bacias hidrográficas mostram uma diversidade cariotípicas em termo de número e tipo de cromossomos em seus complementos diplóides. A emergência desses citótipos poderia resultar, pelo menos parcialmente, do hábito sedentário da espécie. Essa característica talvez induza a formação de populações locais ou subpopulações com pouca conexão por fluxo gênico, como decorrência de isolamento-por-distância. Portanto, seria de se esperar que populações de diferentes bacias hidrográficas divergissem geneticamente (Bertollo *et al.* 2000).

3.3 Aspectos Ecológicos de *Hoplias malabaricus*

3.4 Reprodução

A atividade reprodutiva de *Hoplias malabaricus* é acentuada nos meses de setembro e outubro quando o índice gonadossomático (IGS) avaliado apresenta-se maior (Barbieri, 1989). Seu período reprodutivo é variado de acordo com fatores ambientais como: períodos de inundação, de chuva, seca, altas temperaturas, e variáveis regionais (Prado *et al.* 2006).

A espécie também possui desova parcelada, com fertilização externa, confirmada pela alta frequência de indivíduos semi-desovados. Essa é uma característica de peixes tropicais, com desenvolvimento assincrônico dos ovócitos. Para as traíras esse é um comportamento adaptativo que evita a competição pelo local de desova e alimento para as larvas. E, além disso, pode ser considerada como estratégia de manutenção da espécie (Barbieri, 1989).

As melhores condições alimentares para *H. malabaricus* são as que antecedem a reprodução e durante a reprodução. Nesse período, há um aumento da produção de síntese protéica. Seu crescimento é mais rápido nos dois primeiros anos, antes de atingir o tamanho de primeira maturação gonadal. A diminuição da velocidade de crescimento é decorrente da demanda de nutrientes para a formação dos gametas nos indivíduos adultos e dos gastos energéticos no processo da desova.

As fêmeas de *H. malabaricus* podem alcançar de 141,0 mm até 230 mm do seu tamanho corporal, em sua primeira reprodução (Barbieri, 1989). Os ovócitos maduros possuem diâmetro de 1,75 mm e seu número varia de 6,446 a 14,131 (Araújo-Lima, 2001).

Outro aspecto que também tem gerado controvérsias nas análises populacionais de peixes tropicais com desova parcelada é a validade do método da leitura de anéis etários em escamas (Barbieri, 1989). Nas espécies de traíras a formação dos anéis ocorre no período reprodutivo e os mesmos são decorrentes de um retardamento no crescimento em comprimento.

3.5 Desova e Cuidado Parental

Guardar os ovos é a forma mais comum de cuidado parental entre os peixes (Clutton- Brock, 1991). É majoritariamente na espécie *Hoplias malabaricus*, somente um dos genitores está envolvido nesse comportamento de cuidado parental.

Na família Erythrinidae o cuidado com a prole encontra-se com maior frequência entre os machos do que entre as fêmeas (Prado *et al.* 2006). O percentual é de 61% contra 39%, e o cuidado biparental ocorre com menos de 25% na família (Gross, 1981). Os principais benefícios com o cuidado parental para os Erytinideos são a redução da predação dos ovos e com isso o aumento da eclodibilidade dos mesmos (Baylis, 1981).

Para *Hoplias malabaricus* o cuidado parental feito pelos machos, os quais foram observados perto dos ninhos por dias após a desova, protegendo os ovos de sua espécie de outros peixes. A fertilização externa prevalece devido à marcação de território. A presença de múltiplas e parceladas desovas é importante na evolução do cuidado parental por machos. Pois, assim sua atividade de cuidado é facilitada. Machos territorialistas são importantes para defender o território de desovas de outros peixes, e de outras fêmeas de *H. malabaricus* (Prado *et al.* 2006).

As espécies da família Erythrinidae são caracterizadas pela fertilização externa, construção de ninhos e proteção aos ovos realizada pelos machos (Blumer, 1982). Alguns estudos com a traíra, mostram que as posturas ficam expostas no ninho aberto e com pouca vegetação circundante, sendo essa situação comum para essa espécie. Isto pode ser por pouca pressão de predadores. A proteção dos pais, profundidade do local dos ninhos protegem os ovos e as larvas dessa espécie da predação.

Os ovos da espécie *H. malabaricus* apresentam aderência. Nas larvas as glândulas adesivas localizadas na cabeça fazem com que as mesmas permaneçam aderidas ao fundo do rio e/ou próximas umas das outras, essa é uma adaptação para evitar a dispersão do ninho e evitar redução da proteção parental. Esse comportamento diminui a predação (Araujo-Lima, 2001).

Com poucos dias da eclosão dos ovos, as larvas de *H. malabaricus* nadam com a bexiga natatória inflamada, tem os olhos pigmentados, boca formada, movimentos ondulatórios, desenvolvimento da nadadeira peitoral, intensa circulação sanguínea sub-epitelial, alimentação de micro-crustáceos. Com o início da

alimentação exógena, as larvas se movimentam para encontrar alimentos e assim, as glândulas perdem sua utilidade. A intensa vascularização sob a epiderme das larvas aumenta a eficiência das trocas gasosas, adaptação á condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido do meio ambiente.

3.6 Citogenética

Antes que Mendel, em 1865, publicasse suas observações sobre a transmissão dos caracteres, os citologistas já haviam mostrado que o núcleo era uma estrutura característica de todas as células, que era capaz de formar novos núcleos por divisão e que durante sua divisão surgiam estruturas alongadas, posteriormente denominadas *cromossomos*.

Um ano após o trabalho de Mendel, Haeckel, em 1866, propunha ser o núcleo o principal agente da herança (Guerra, 1988). Nos primeiros anos do presente século foi proposta a *teoria da herança cromossômica*, baseada nas leis mendelianas da herança, redescobertas em 1900 por Correns, de Vries e Tschermak. Desde essa época a Citogenética e a Genética passaram a superpor os seus conhecimentos numa área comum, mais tarde denominada *Citogenética*. Atualmente, a Citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução.

O óvulo fecundado sofre divisões sucessivas, dando origem às células animais. Estas divisões formam células filhas idênticas, cada uma delas contendo um conjunto de cromossomos idênticos herdados da célula mãe no processo de mitose. Exceto na primeira divisão do zigoto, todas as células crescem para alcançar um tamanho que seja o dobro do início da divisão. E neste processo de mitose o número de cromossomos é duplicado e todos os conjuntos duplicado se movem sobre um conjunto de microtúbulos para um pólo da célula que se divide (Nirchio, 2006).

Cada cromossomo metafásico é sempre formado por duas subunidades paralelas (*cromátides*) cada uma das quais constituídas por um único fio de DNA, associado a proteínas e RNA, denominado *cromonema* (Guerra, 1988). As

cromátides se encontram presas entre si por uma região mais delgada e fracamente corada chamada *constricção primária* ou *centrômero*. O centrômero divide a cromátide em dois segmentos (*braços cromossômicos*). Menos freqüentemente o centrômero se situa em um dos extremos da cromátide, resultando na formação de um único braço cromossômico por cromátide. A extremidade livre de qualquer braço cromossômico é denominada *telômero*.

Em um ou poucos cromossomos do conjunto cromossômico de cada espécie aparece outra constricção da cromátide, tão fracamente corada quanto o centrômero, conhecida como *constricção secundária*. O segmento cromossômico situado entre a constricção secundária e o telômero é denominado *satélite*. Do ponto de vista funcional, as três regiões cromossômicas que merecem maior atenção são o centrômero, a constricção secundária e o telômero.

A descrição das características do conjunto, do número, tamanho e forma de cada tipo de cromossomo de uma espécie é conhecida como *cariótipo* (Guerra, 1988). Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie. A representação do cariótipo pode ser feita na forma de *cariograma* construído a partir da fotografia ou de um desenho detalhado de uma metáfase em que todos os cromossomos estão bem corados e individualizados. Esses cromossomos são recortados e os homólogos são emparelhados e enumerados dentro de uma determinada ordem (do maior para o menor).

As características mais evidentes do cariótipo são a posição do centrômero o que determina a morfologia, o número e tamanho dos cromossomos (Nirchio, 2006).

No estágio de metáfase, os cromossomos se encontram alinhados em um plano mediano da célula, formando a chamada *placa metafásica*. Durante a metáfase, os cromossomos são mais facilmente analisado devido á sua maior contração e individualização. A observação é grandemente aumentada quando se aplicam substancias antimitóticas as células em divisão. Essas substâncias ligam-se ás proteínas (*tubulinas*) que formam as fibras do fuso acromático, impedindo sua polimerização e conseqüentemente suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos já formados. As células assim tratadas são denominadas *c-metáfases* e se caracterizam por apresentarem cromossomos metafásicos bem separados (Guerra, 1988).

Ainda segundo Guerra (1988) alguns segmentos cromossômicos mantêm-se altamente condensados no DNA durante todo o ciclo nuclear. Essa região de alta condensação reflete a existência de um dos dois tipos de cromatina, denominada *Heterocromatina*. A heterocromatina é um componente do material hereditário bem distinto e com condensação compactada. Uma das suas principais características é a ausência de atividade gênica. Em geral, cada cromossomo eucariótico possui apenas uma pequena fração de heterocromatina, embora possam também ser inteiramente *eucromático* ou inteiramente heterocromático.

Os genes que possam estar localizados nessa região estão permanentemente bloqueados. O bloqueio da transcrição desses genes associa-se ao estado condensado da heterocromatina. Outra característica da heterocromatina muito marcante é a *replicação tardia do DNA*. Isto é, a heterocromatina inicia a sua replicação depois da eucromatina, caracteristicamente no final da fase S. Guerra, (1988) ressalta ainda que a fração heterocromática seja um dos pontos críticos na citogenética atual.

A visualização da heterocromatina foi possibilitada pelo desenvolvimento de técnica diferencial de coloração em qualquer fase do ciclo cromossômico. O reconhecimento dos cromossomos individualmente ocorre geralmente na metáfase, e nesse estágio todo o cromossomo, exceção das constrições, mostra-se igualmente corado, não permitindo a visualização dos blocos de heterocromatina (Guerra, 1988).

As bandas de Ag-NORs podem ser visualizadas por um método de passo único segundo o protocolo de Howell e Black (1980). Esta técnica baseia-se na afinidade do nitrato de prata pelas proteínas nucleolares, as quais, provavelmente persistem na região de constrição secundária durante todo o ciclo celular. Permitindo corar os nucléolos em interfase e tais regiões em cromossomos metafásicos.

A utilização dessa técnica para detectar Ag-NORs é útil, visto que a coloração convencional com Geimsa, não localiza essa constrição secundária associada ao nucléolo e situada na extremidade terminal dos cromossomos (Guerra, 1988).

4. Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente populações de *Hoplias malabaricus*, capturadas na região do médio rio Paraguaçu.

4.1 Objetivos Específicos

- ❖ Criar um banco de tecidos de *Hoplias malabaricus* capturadas na região do médio rio Paraguaçu.
- ❖ Comparar as características citogenéticas encontradas com os citótipos já encontrados para a espécie na Bacia do Rio Itapicuru e Contas e na Bacia do Rio Adjacente em Ponta Grossa, sul do Brasil.

5. Material e Métodos

5.1 Considerações Gerais sobre a Área de Estudo

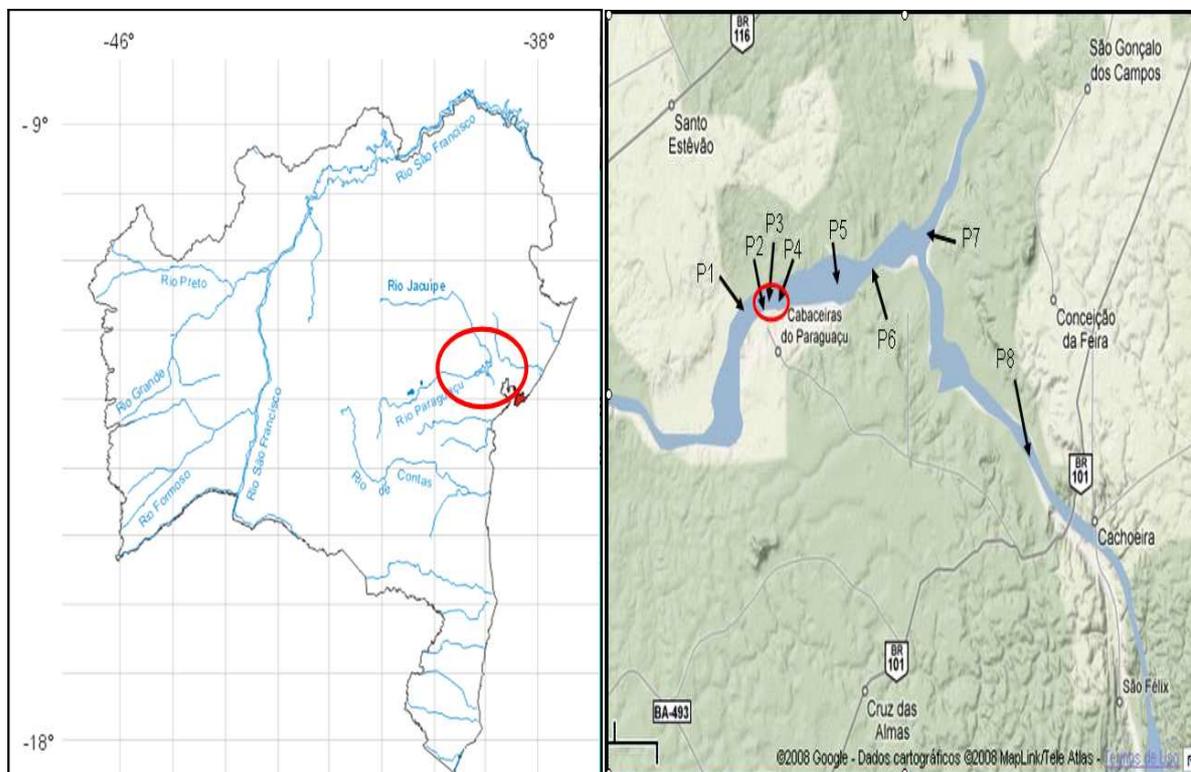


Fig. 2 Mapa da Bahia com destaque para o Reservatório de Pedra do Cavalo (Foto: SRH) e imagem aérea do Reservatório (Imagem: Google Maps).

A Bacia Hidrográfica do Rio Paraguaçu compreende 22 municípios pertencentes à Chapada Diamantina, com uma área de 12.860 Km², apresentando os seguintes limites naturais: ao Norte (N): Bacias dos Rios São Francisco e Itapicuru; ao Sul (S): Bacias dos Rios de Contas, Jiquiriçá e Jaguaribe; ao Oeste (W): Bacia do Rio São Francisco; ao Leste (E): Bacias dos Rios Pojuca, Inhambupe e a Baía de Todos os Santos (foz).

O Alto Curso do Rio Paraguaçu têm suas nascentes no município de Barra da Estiva, na Serra do Sincorá, nas Fazendas Farinha Molhada, Paraguaçu e Brejões, à aproximadamente 1.200 metros de altitude em relação ao nível do mar. O Rio Paraguaçu toma a direção norte, atravessando os municípios de Ibicoara, Mucugê e Andaraí; nesse trecho, recebe os Rios Riachão (Ibicoara), Rio Preto (Mucugê) e Bahiano (Andaraí) mudando a direção para leste, até cerca de 5 Km à jusante de Andaraí, quando recebe o Rio Santo Antônio, seguindo a direção do seu curso para

leste, onde inicia o seu Médio Curso, até desembocar na Baía de Todos os Santos. Localizado na região Centro - Oeste do Estado da Bahia, entre as coordenadas de 11°17'S e 13°36'S de latitude sul, e 38°50'W e 42°01'W de longitude oeste.

A Barragem de Pedra do Cavalo está situada no Baixo Rio Paraguaçu, sua importância para o Recôncavo Baiano caracteriza-se por sua disponibilidade hídrica de 4,5 bilhões de m³ de água doce. A localização dessa barragem é estratégica, a 30 km do campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas e a 100 km da capital Salvador.

Um total de 36 Indivíduos foram amostrados em cinco expedições de coleta. Foram realizadas quatro expedições em Tupiaçu distrito de Cabaceiras do Paraguaçu, com as seguintes coordenadas geográficas: Lat. 12 32' 48,48"S e Long 39 18' 14,43" W, e uma coleta na Represa do rio Paraguaçu na localidade Anjilim: Lat. 12 32' 43,67" S e Long 39 17' 3,94" W. Os espécimes adquiridos foram transportados em um balde com bombas de oxigênio para aeração e levados para o laboratório de Ictiogenética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. No laboratório foram colocados em um aquário e/ou num tanque com aeração constante até o momento da preparação citogenética. (Figura 3).



Fig. 3 Espécimes de traíras, Fonte:Analu.

No laboratório, os espécimes foram pesados e medidos com paquímetro. De cada espécime foram retirado 1 ml de sangue da coluna vertebral, na região pós-anal e armazenados em tubos tipo "Eppendorf" devidamente etiquetados com os números de cada espécime, com a finalidade de futuros estudos genéticos.



Fig. 4 Montagem da Bancada para preparações citogenéticas

Para as preparações citogenéticas foi feito um corte na região da nadadeira caudal até a região próxima ao opérculo, com o objetivo de coletar parte do tecido da endoderme, coração, fígado, que foram conservados em álcool, e rim na porção cefálica e posterior. A retirada de células renais tem como fundamento a obtenção de placas metafásicas da mitose. Para isso, o tecido do rim é colocado na solução de Hank's, adicionado a duas gotas de colchicina, de concentração 0,02%, numa placa de Petri, levado à estufa 27°C, posteriormente acrescenta-se 6 ml de KCl e dessa forma é seguido o protocolo (Foresti et al., 1981).

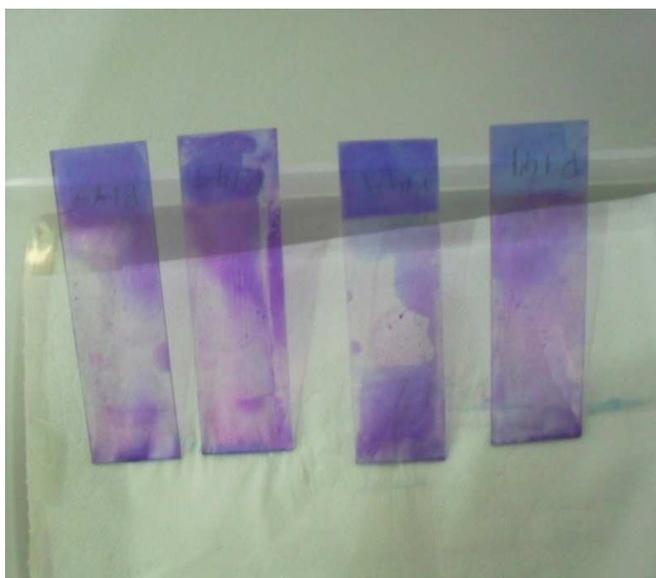


Fig. 5 Lâminas com coloração de GIEMSA

Após o término do protocolo, foram preparadas lâminas para serem pingadas com duas gotas do material para obtenção de metáfase. (Fig. 6). As mesmas foram coradas com solução de Giemsa e Nitrato de Prata após 24 horas de pingadas. Os

espécimes estudados foram identificados com etiquetas enumeradas e conservados em formol, para compor a coleção de peixes do Laboratório de Ictiogenética da Prof. Dra. Soraia Aguiar Fonteles, NEPA-UFRB.

6. Resultados

Os espécimes tiveram uma variação no peso, com média de 278,29 g; e um comprimento médio de 27,95 cm. Os números diplóides encontrados dos espécimes de *Hoplias malabaricus* trabalhados foram $2n=38$, $2n=39$, $2n=40$ e $2n=42$. A maioria dos espécimes apresentou o cariótipo de $2n=40$, sendo este o número diplóide abundante nesta população. (Fig. 7).

Os cromossomos apresentaram-se com morfologia típica de metacêntrico e também submetacêntrico, segundo a fórmula $20m + 20sm$. Esta fórmula é usada convencionalmente para determinar a morfologia dos cromossomos. E a sua determinação é baseada na proporção do braço longo cromossômico. Quando o braço longo apresenta tamanho de 1,0 a 1,7 cm é denominado metacêntrico (m). E apresentando tamanho de 1,71 a 3,0 é considerado submetacêntrico (sm).

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) foram identificadas na região telomérica e são múltiplas. (Fig. 8).



Fig. 6 Metáfase de *H. malabaricus*, corados por Giemsa.

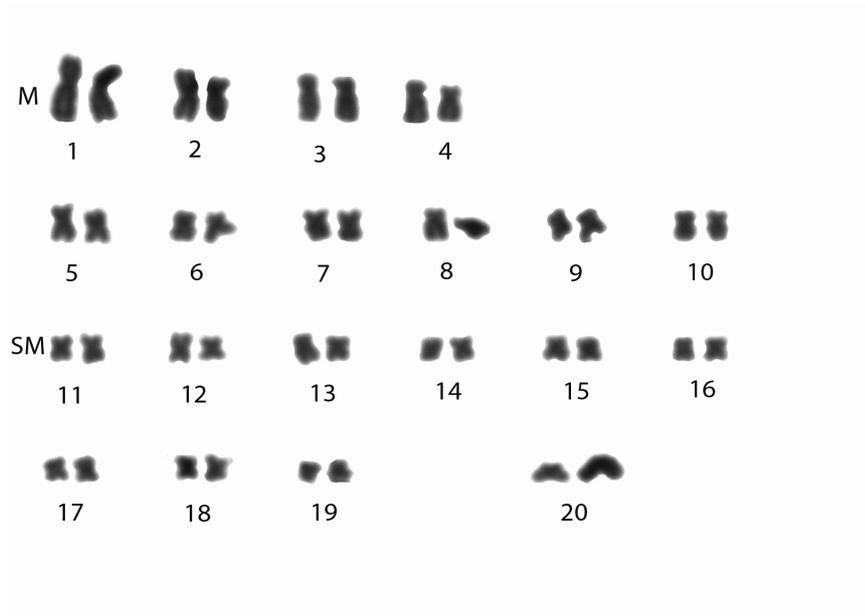


Fig. 7 Cariótipo *H. malabaricus* 2N= 40, corados por Giemsa



Fig. 8 Metáfase de *Hoplias malabaricus* evidenciando marcação de Regiões Organizadoras de Nucléolo. Coloração por nitrato de prata.

7. Discussão

Os resultados encontrados para os números diplóides de $2n=38$, $2n=39$, $2n=40$ e $2n=42$ corroboram com a hipótese de revisão taxonômica da espécie, devido à ocorrência de vários cariótipos diferentes encontrados em outras pesquisas. Segundo Bertollo *et al.* (1997), análises populacionais mostraram diversidade de cariomorfos, em termos de números e tipos de cromossomos em diferentes bacias hidrográficas. Vários cariótipos foram identificados em *H. malabaricus*, o que sugere que a espécie deve ser considerada como um complexo de espécies (Jacobina, 2009). O número diplóide de $2n=40$ também foi amostrado no rio de Contas- Sudeste da Bahia, sugerindo um cariomorfo simpátrico para *H. malabaricus* (Jacobina, 2009).

As formas de cromossomos metacêntricos têm sido amostradas em outros trabalhos. O primeiro par de cromossomos é caracterizado por um tamanho maior, enquanto os pares restantes apresentam uma diminuição progressiva no tamanho (Bertollo *et al.* 2000; Jacobina, 2009).

As análises encontradas referentes a Ag-NORs identificam-se com outras pesquisas para essa coloração diferencial. As Regiões Organizadoras de Nucléolos múltiplas são assim determinadas porque estão localizadas em pares de cromossomos diferentes e também nas duas cromátides irmãs. A localização na

região telomérica pode ser uma provável condição de sinapomorfia para este grupo de peixe (Vicari et al. 2006). Segundo Born (2006), Jacobina (2009), *H. malabaricus* é um grupo de peixes que possui sistema Ag-NORs múltiplo localizado na região telomérica dos distintos pares de cromossomos.

A Região Organizadora de Nucléolo (Ag-NORs) é constituída por múltiplas copias de genes ribossomais (18S, 5,8S e 28S), sendo, portanto, sítios de transcrição do DNAr (Nirchio, 2006). Estes sítios podem estar localizados em somente um par de cromossomos ou distribuídos em vários cromossomos do complemento. Para a espécie em estudo, as Ag-NORs múltiplas podem representar uma variação na expressão diferencial de algum DNAr. Portanto, pode também representar reais diferenças cariotípicas (Vicari et al. 2006).

O método mais empregado para obterem-se as posições de RONS é a coloração com nitrato de prata. Para essa coloração ser satisfatória a cromatina nucleolar deve estar descondensado (Constricção nucleolar). Nessa constricção ocorre atividade de transcrição previa, pois nessa região os cromossomos não estão condensados. Estudos sobre RONS tem mostrado que sua localização é espécie-específica para vários grupos de peixes (Nirchio, 2006).

8. Conclusão

A população de *Hoplias malabaricus* estudada no presente trabalho foi caracterizada citogeneticamente com o número diplóide variando de $2n=38$ a $2n=40$. Esse cariótipo mostra que essa população de *H. malabaricus* é também uma espécie críptica. Esse complexo de espécie foi também verificado em outras bacias hidrográficas dos estados brasileiros. Esse táxon requer uma revisão taxonômica mais cuidadosa, com possibilidade de separar em nomenclaturas diferentes, as espécies escondidas que são identificadas com a mesma definição.

Referências Bibliográficas

- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. & BITTENCOURT, M. M. A reprodução e o início da vida de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 31(4): p 693-697. 2001.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Publicatio UEPG Biological and Health Sciences* 6(1): 43-60. 2000.
- BARBIERI, G. Dinâmica da Reprodução e Crescimento de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) da represa do Monjolinho, São Carlos/SP. *Revista Brasileira de Zoologia*. v.6. p 225-233. 1989.
- BAYLIS, J. R. The evolution of parental care in fishes, with reference to Darwin's rule male sexual selection. *Env. Biol. Fishes*. 6: p. 223-251. 1981.
- BERRA T. M. An atlas of distribution of the freshwater fish families in the world. Lincoln: University of Nebraska Press, 1981.
- BERTOLLO, L. A. C.; BORN, G. G.; DERGAM, J. A.; FENOCCHIO, A. S.; MOREIRA F. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613. 2000.
- BERTOLLO L. A. C., MOREIRA F. O., FONTES M. S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytotypes with 2n=40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics*. v. 20; p. 237-342. 1997.
- BLUMER, L. S. A bibliography and categorization of bony fishes exhibiting parental care. *Zool. J. Lin. Soc.*, 76: p. 1-22. 1982.
- BORN G. G.; BERTOLLO L. A. C. A New Sympatric Region for Distinct Karyotypic Forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Biology*, vol. 66, p. 205-210. 2006.
- BRITO S. G. C. Peixes do rio Paranapanema. São Paulo: Ed.Horizonte Geográfico, 2003.
- BRITSKI H. A, SATO Y. ROSA A. B. S. Manual de identificação de peixes da regiões de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. 3ª ed. Brasília: Codevasf. p. 54-55. 1988.
- CAIXETA, E. T., OLIVEIRA, A. C. B. BRITO, G. G. SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. CAIXETA, E. T. (ed) Marcadores Moleculares, Viçosa: UFV, cap.1, p. 9-68. 2006.
- CLUTTON-BROCK, T. H. *The evolution of parental care*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. p 352. 1991.

DERGAM, J. C.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO J. R., GUILIANO C. L.; BLAC H. F.; K. IV, W. C. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology* 21: 493-496. 1998.

DERGAM, J. C.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basins. *Brazilian Journal of Genetics* 13:755-766. 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp220. 1998.

GALVIS G, MOJICA J. I, CAMARGO M. Peces del río Catatumbo. Santafé de Bogotá (Colombia): Asociación Cravo Norte. p. 118. 1997.

GLOSS M. C. Citogenética comparativa das variedades selvagens de acará-disco (*Symphysodon* spp., Cichlidae, Perciformes) endêmicos da Amazônia: uma abordagem clássica e molecular dos cromossomos mitóticos e meióticos. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 2009.

GROSS, M. R. & SHINE, R. Parental care and mode of fertilization in ectothermic vertebrates. *Evolution*, 35(4): p. 775-793. 1981.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: Princípios básicos. In: Guerra, M. (Ed) *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Editora da Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil. p. 1-32. 2004.

GUERRA, M. Introdução à citogenética geral. Guanabara, Rio de Janeiro. p.1-12. 1988.

HILSDORF, A. W., RESENDE, E. K., MARQUES, D. K. S. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa. Documento 82, p. 8-11. 2006.

JACOBINA, U. P., AFFONSO P. R. A. M., CARNEIRO P. L. S., DERGAM J. A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Sociedade Brasileira de Ictiologia*, V. 7 (4), p. 617-622. 2009.

KASAHARA S. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 1ªed. p. 09 -15. 2009.

KENNY J. S. Views from the bridge: a memoir on the freshwater fishes of Trinidad. Maracas, St. Joseph, Trinidad and Tobago. p. 98. ; 1995.

LAMAS I. R. Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.

MARIA L. Diversidade Genética de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae) no Rio Grande do Sul (Brasil) [tese de doutorado]. Porto Alegre: PUCRS. p.14. 2007.

MARTINS, C. Estudios citogenéticos en peces mediante hibridación fluorescente *in situ*. In: Nirchio M. et al., Citogenética de peces. UDO Universidade de Oriente. Venezuela. Anexo. p. 110-112. 2006.

MORELLI, S., VICARI, M. R., BERTOLLO L. A. C. Citogenética evolutiva do grupo *Hoplias lacerdae*. Um comportamento particular em relação aos outros peixes eritrinídeos. Brazilian Journal of Biology, v.67, p. 3-4. . 2007.

MORELLI, S. Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero *Hoplias*, grupo *lacerdae*. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

MOURA, T. M. Estrutura Genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St. –Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás. [dissertação de mestrado]. Piracicaba-SP. Universidade de São Paulo, 2007.

NIRCHIO, M., OLIVEIRA C. Citogenética de Peces. UDO Universidade de Oriente. Venezuela. p.70- 73. 2006.

OYAKAWA O. T. Relações Filogenéticas das Famílias Pyrrhulididae, Lebiassinidae e Erythrinidae (Osteichthyes, Characiformes) [tese]. São Paulo (SP): Dept. Zoologia, Instituto de Biociências, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1998.

OYAKAWA O. T. Family Erythrinidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ, editors. Check List of the Freshwater Fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs; p 238-240. 2003.

PRADO, C. P. A., GOMIERO, L. M., FROEHLICH, O. Spawning and parental care in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) in the Southern Patanal, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia. v 66 (2B) p. 697- 702. 2006.

SABINO J., ZUANON J. A stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. V. 8. p. 201-210. 1998.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética de conservação. In: MATIOLI, S.R.(ed.). Biologia Molecular e Evolução, Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 172-192. 2001.

TEIXEIRA E. G. Adaptação de metodologias de manejo reprodutivo como subsídio para a implantação de um programa de melhoramento genético da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade chitralada no centro de pesquisa em Aquicultura-CPA/DNOCS [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal Do Ceará; 2007.

TORRES, A. C., FERREIRA A. T. SÁ, F. G. BUSO, J. A. CALDAS, L. S. NASCIMENTO, A.S. BRÍGIDO, M. M. ROMANO, E. Glossário de Biotecnologia Vegetal. Brasília: Embrapa/CNPq. p.128. 2000.

VICARI, M. R., ARTONI R. F., BERTOLLO L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*, V. 28, p. 103-110. 2005.

VICARI, M. R., PAZZA, R., ARTONI, R. F., MARGARIDO, V. P., BERTOLLO, A. C. Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguazu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n.2: p. 297-303. 2006.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish "matrincha" (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology*, v.20, p.48-52, 2004.