

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

ANÁLISE DA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA DE CHARACIDAE DA BACIA DO SÃO  
FRANCISCO

Wellington Adriano Moreira Peres

São Carlos

2005

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

ANÁLISE DA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA DE CHARACIDAE DA BACIA DO SÃO  
FRANCISCO

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológica e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução. (Campo de Pesquisa: Citogenética)

Wellington Adriano Moreira Peres

São Carlos

2005

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

P437ad

Peres, Wellington Adriano Moreira.  
Análise da diversidade cariotípica de Characidae da  
bacia do São Francisco / Wellington Adriano Moreira Peres.  
-- São Carlos : UFSCar, 2005.  
102 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2005.

1. Citogenética. 2. Characideo. 3. Fish – DNAr 18S. 4.  
DNAr 5S. 5. Evolução cariotípica. I. Título.

CDD: 574.87322 (20<sup>a</sup>)

Orientador

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Dedico esse trabalho a meus  
pais Sebastião e Izoldina

## Agradecimentos

Deixo aqui meus agradecimentos a todos que contribuíram com a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho por ter aceitado a difícil tarefa de me orientar, um aluno sem qualquer experiência anterior em citogenética. Sempre me deixou à vontade para escolher o que e como fazer, mas sempre com ótimas sugestões. Por isso muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Carlos Bertollo, meu segundo orientador. No início eu o incomodava até para ver minhas preparações cromossômicas e ele sempre me atendia com muita boa vontade.

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti que sempre me atendeu muito bem, como se fosse um de seus alunos.

Aos técnicos Piau e Toninho pela colaboração na coleta e manutenção dos peixes nos aquários.

Ao Dr. Yoshimi Sato, CODEVASF, Três Marias-MG pelo auxílio na coleta dos espécimes e ao MsC. Flávio C. T. Lima, USP, pelas identificações taxonômicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Genética e Evolução.

A FAPESP (Proc. 03/03642-1) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos e também orientadores: Caroline Garcia, Débora Diniz, Elisangela Bellafronte e Liano Centofante. Eles me ensinaram das preparações cromossômicas a Hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

A Lelê, minha amiga e um exemplo de pessoa, pelas nossas alegrias.

Ao Marc, meu amigo Doido, pela grande colaboração nesse trabalho.

Ao Vitor, por ter me ensinado sua técnica lunática de ampliar foto e pela companhia do cooper.

A Terumi por me ensinar a fazer uma mini prep com mais 800ng/ $\mu$ L.

Ao Cristiano (Kit) por ter me acolhido em sua casa na minha primeira semana em São Carlos.

Ao Marcelo e ao Daniel pela contribuição nos papers.

A Priscila por, algumas vezes, deixar eu usar seu computador.

Ao Rubens e a Karine por, entre outras coisas, revisarem meu projeto.

E a todos os amigos do departamento (Allysson, Ana Karina, Anna Carolina, Artur, Carol Lincoln, Celeste, Cláudio, Cristiane, Eloize, Fábio Camilo, Fernando, Felipe, Flavinha, Iderval, Júlia, Luiz, Luiz Fernando, Maressa, Marilena, Mercival, Michelle, Patrícia, Paulo Roberto, Renata, Regiane, Rodrigo, Roberta, Rosângela, Rose, Tati, Tatiane Rosado, Thais, Thiago) pela companhia e amizade.

Aos amigos do corredor: Fernando Góes, Guilherme Torres e Márcio pelo apoio computacional e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos de Goiás: Carlos Eduardo, Edvaldo, Fabíola, Francisca, Kleber, Lorena, Matheus e Natália, que sempre colaboraram com minha formação.

E a meus pais e irmãos pela contribuição em todas minhas conquistas.

Para ser grande, Sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a Lua toda

Brilha, porque alta vive.

(Ricardo Reis)



## Resumo

A família Characidae consiste de aproximadamente 30 subfamílias, altamente diversificadas e, provavelmente, não compreendendo um grupo monofilético. No entanto, algumas subfamílias, em particular, podem constituir grupos monofiléticos, compartilhando especializações. No presente trabalho foram analisadas 9 espécies pertencentes a 6 gêneros de Characidae, utilizando técnicas clássicas de coloração, bem como hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e fluorocromos GC específicos, como Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). Foi observado um número diplóide 2n=58 cromossomos em *Myleus micans*, com 26M+18SM+8ST+6A; 2n=50 em *Astyanax lacustris* com 8M+20SM+16ST+6A; 2n=50 em *A. altiparanae* com 8M+20SM+12ST+10A; 2n=50 em *Astyanax scabripinnis* com 12M+24SM+2ST+6A; 2n=50 em *Orthospinus franciscensis* com 12M+30SM+2ST+6A; 2n=52 em *Piabina argentea* com 8M+14SM+16ST+14A; 2n=52 e três citótipos em *Serrapinnus heterodon*, com 17M+20SM+14ST+1A, 16M+20SM+14ST+2A e 15M+20SM+14ST+3A; 2n= 52 em *Serrapinnus piaba* com 16M+20SM+14ST+2A; e 2N=50 em *Hasemanina nana* sendo 8M+42SM. Resultados após a FISH com a sonda de rDNA 18S indicaram a presença desses genes nos cromossomos onde foram identificadas as NORs ativas, além de sítios adicionais, como visto em *M. micans*, *A. scabripinnis*, *P. argentea* e *S. piaba*. Assim como os sítios de NORs, as regiões de rDNA 5S foram evidenciadas em diferentes números e posições entre as espécies estudadas. Os dados obtidos corroboram a diversidade cromossômica comumente relatada para Characidae, reforçando sua condição polifilética.

## Abstract

Family Characidae consists of approximately 30 highly diversified subfamilies that probably do not comprise a monophyletic group. However, a few particular subfamilies may constitute monophyletic groups sharing specializations. In the present work, nine specimens belonging to six genera were analyzed using classic staining techniques as well as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and GC-specific fluorochromes, such as Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). A diploid number of 2n=58 chromosomes was observed in *Myleus micans*, with 26M+18SM+8ST+6A; 2n=50 in *Astyanax lacustris* with 8M+20SM+16ST+6A; 2n=50 in *A. altiparanae* with 8M+20SM+12ST+10A; 2n=50 in *Astyanax scabripinnis* with 12M+24SM+2ST+6A; 2n=50 in *Orthospinus franciscensis* with 12M+30SM+2ST+6A; 2n=52 in *Piabina argentea* with 8M+14SM+16ST+14A; 2n=52 and three cytotypes in *Serrapinnus heterodon*, with 17M+20SM+14ST+1A, 16M+20SM+14ST+2A and 15M+20SM+14ST+3A; 2n= 52 in *Serrapinnus piaba* with 16M+20SM+14ST+2A; and 2N=50 in *Hasemania nana* with 8M+42SM. FISH results with the 18S rDNA probe indicated the presence of these genes in the chromosomes where NORs were active, besides additional sites, as seen in *M. micans*, *A. scabripinnis*, *P. argentea* and *S. piaba*. Similar to the NOR sites, the 5S rDNA regions were evidenced in different numbers and positions throughout the studied species. The data obtained corroborate the chromosome diversity often reported for Characidae, reinforcing its polyphyletic condition.

## Lista de figuras

FIGURA 1 - BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO.....	21
FIGURA 2 - ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE ANALISADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	25
FIGURA 3 - CARIÓTIPO SEQÜENCIAL DE <i>MYLEUS MICANS</i> .....	40
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE RDNA E CMA3 EM <i>MYLEUS MICANS</i> .....	40
FIGURA 5 - CITÓTIPOS DE <i>SERRAPINNUS HETERODON</i> . GIEMSA, BANDA C E AG-NOR.....	51
FIGURA 6 - CARIÓTIPO DE <i>SERRAPINNUS PIABA</i> . GIEMSA, BANDA C E AG-NOR.....	52
FIGURA 7 - FISH COM SONDA DE RDNA 18S EM <i>SERRAPINNUS HETERODON</i> E <i>S. PIABA</i> ...	52
FIGURA 8 - CARIÓTIPO DE <i>PIABINA ARGENTEA</i> .....	61
FIGURA 9 - CARIÓTIPO DE <i>HASEMANIA NANA</i> .....	62
FIGURA 10 - CARIÓTIPO DE <i>ORTHOSPINUS FRANSISCENSIS</i> .....	63
FIGURA 11 - CARIÓTIPO SEQÜENCIAL DE <i>ASTYANAX LACUSTRIS</i> .....	74
FIGURA 12 - CARIÓTIPO SEQÜENCIAL DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAÉ</i> .....	75
FIGURA 13 - CARIÓTIPO SEQÜENCIAL DE <i>ASTYANAX SCABRIPINNIS</i> .....	75
FIGURA 14 - LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE RDNA 18S E 5S EM ESPÉCIES DE <i>ASTYANAX</i> ...	77
FIGURA 15 - LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE RDNA 18S EM ESPÉCIES DE CHARACIDAE.....	87
FIGURA 16 - LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE RDNA 5S EM ESPÉCIES DE CHARACIDAE.....	88

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. FAMÍLIA CHARACIDAE.....	12
1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ANALISADAS.....	14
1.2.1. <i>Myleus</i> .....	14
1.2.2. <i>Astyanax</i> .....	14
1.2.3. <i>Hasemania</i> .....	15
1.2.4. <i>Piabina</i> .....	15
1.2.5. <i>Orthospinus</i> .....	16
1.2.6. <i>Serrapinnus</i> .....	16
1.3. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES.....	17
1.4. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CHARACIDAE.....	18
1.5. A BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO.....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. ESPÉCIES ANALISADAS.....	24
3.2. METODOLOGIAS.....	26
3.2.1. <i>Indução de metáfase</i> .....	26
3.2.2. <i>Preparação de cromossomos mitóticos</i> .....	26
3.2.3. <i>Bandamento C</i> .....	27
3.2.4. <i>Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)</i> .....	27
3.2.6. <i>Hibridação in situ fluorescente (FISH)</i> .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. CAPÍTULO I.....	31
4.2. CAPÍTULO II.....	41
4.3. CAPÍTULO III.....	53
4.4. CAPÍTULO IV.....	64
4.5. CAPÍTULO V.....	78
<b>5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Região Neotropical é extremamente diversificada e complexa, considerando os diferentes biomas que dela fazem parte. Sua rede hidrográfica é portadora dos mais representativos grupos de espécies de peixes de água doce do mundo. Essa diversidade pode ser diretamente correlacionada com a heterogeneidade estrutural, bem como com a história geológica dessa região.

Os peixes de água doce neotropicais, aproximadamente 24% de todas as espécies de peixes e um oitavo de toda a biodiversidade dos vertebrados, ocorrem em menos de 0,003% da água doce do planeta (VARI; MALABARBA, 1998). Estimativas apontam que possam existir mais de 8.000 espécies de peixes neotropicais de água doce (SCHAEFER, 1998). A maior parte dessa diversidade, mais especificamente a sul americana, pertence a um dos cinco grupos dominantes: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Ciclídeos (LUNDBERG et al., 2000). A ordem Characiformes inclui a família Characidae, uma das maiores e mais complexas entre as famílias da ordem, que compreende mais de 776 espécies distribuídas em 152 gêneros (FROESE; PAULY, 2005).

### 1.1. FAMÍLIA CHARACIDAE

A família Characidae está presente em praticamente todos os ambientes de água doce, desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul da Argentina (LUCENA, 1993; FROESE; PAULY, 2005). Seus integrantes são vulgarmente conhecidos como lambaris, dourados, pacus, matrinhãs, peixe-cachorro, entre muitos outros, e são coletados com relativa facilidade nos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados

(BRITSKY et al., 1988). Possuem hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e exploram uma grande variedade de habitats.

Grande parte das subfamílias de Characidae foi proposta originalmente por Eigenmann, no início do século passado, numa série de trabalhos. Posteriormente, foram sendo descritos novos gêneros que não se encaixavam em nenhuma dessas subfamílias. De fato, no momento, Characidae não pode ser considerado como um grupo monofilético (WEITZMAN; MALABARBA, 1998), diferenciando-se dos Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae e Parodontidae, que são inseridos em grupos naturais (VARI, 1983). Desse modo, Characidae necessita de revisões que possam esclarecer as verdadeiras relações entre os grupos que compõe esta família.

No território brasileiro estão presentes cerca de 400 espécies de Characidae (BRITSKI, 1972). Apesar do grande número de espécies encontradas, muitas delas, antes relatadas como abundantes em certos sistemas, hoje correm o risco de desaparecer por completo, sem ao menos serem estudadas do ponto de vista biológico e econômico. Nesse cenário, a destruição de habitat, bem como a introdução de espécies exóticas, figuram como alguns dos principais fatores na diminuição da diversidade dos ambientes aquáticos na região Neotropical (SUNAGA; VERANI, 1991; ORSI; AGOSTINHO, 1999; BOJSEN; BARRIGA, 2002; LATINI; PETRERE JR., 2004).

Assim, faz-se necessário estudos que possam auxiliar a taxonomia, bem como identificar as variações populacionais importantes para a manutenção das espécies. Além disso, os peixes constituem um dos melhores grupos para estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos, uma vez que apresentam características

biológicas peculiares e ocupam uma posição central na evolução dos vertebrados (TOLEDO-FILHO et al., 1978).

## 1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ANALISADAS

### 1.2.1. *Myleus*

O gênero *Myleus* pertence à subfamília Serrasalminae e é encontrado principalmente nas bacias Amazônica, mas com alguns representantes na Bacia do Paraná-Paraguai e São Francisco (JÉGU, 2003). *M. micans* (LÜTKEN, 1875), endêmico da bacia do rio São Francisco (FOWLER, 1950), é conhecido popularmente como pacu e pode atingir porte acima dos três quilogramas de peso corporal. Possui hábito alimentar preferencialmente herbívoro e invertívoro (POMPEU, 1997).

### 1.2.2. *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é um dos táxons de peixes de água doce mais amplamente distribuído nas Américas. Sua distribuição vai desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (BRITSKI, 1972). Para Eigenmann (1921), esse gênero possui 74 espécies e subespécies. Já Garutti e Britsky (2000) consideraram aproximadamente 100 espécies nominais. Além do número impreciso é provável que muitas espécies ainda estejam para serem descritas, pois a similaridade morfológica e as definições taxonômicas pouco detalhadas dificultam sua identificação (MELO, 2001). Anteriormente alocado em Tetragonopterinae, *Astyanax* é hoje considerado um gênero *Incertae Sedis* em Characidae (Lima et al., 2003).

*A. lacustris* e *A. altiparanae* são espécies de bacias diferentes, sendo a primeira da bacia do rio São Francisco e a segunda do Alto Paraná. Por apresentarem um padrão morfológico similar eram, há até a pouco tempo, consideradas como uma única espécie, denominada *A. bimaculatus*. No entanto, recentes estudos identificaram particularidades suficientes para classificá-las com espécies distintas. Embora *A. lacustris* tenha o mesmo padrão de colorido de *A. altiparanae* no flanco, dela difere por outros caracteres, tais como alturas aproximadamente iguais das porções acima e abaixo da linha horizontal que passa pela fenda bucal, dentes grandes com penta- e hexacúspides e menor número de dentes pequenos no dentário (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Do mesmo modo, *A. scabripinnis* parece não representar uma única unidade taxonômica, pois muitas de suas populações são diferenciadas tanto morfológica quanto citogeneticamente, a ponto de poderem constituir novas espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

### 1.2.3. *Hasemanina*

Esse gênero, anteriormente alocado em Tetragonopterinae, foi também listado recentemente em gêneros *Incertae Sedis* em Characidae (LIMA et al., 2003). É composto por apenas cinco espécies de pequeno porte, geralmente não ultrapassam 2,7 cm. *Hasemanina nana* (LÜTKEN, 1875) é endêmica da bacia do rio São Francisco (LIMA et al., 2003).

### 1.2.4. *Piabina*

*Piabina argentea* (REINHARDT, 1867) é a única espécie do gênero (LIMA et al., 2003). É constituída por peixes pequenos (podendo atingir 70 mm), de corpo



alongado com dentes do pré-maxilar dispostos em três séries na região mediana, linha lateral completa e nadadeira anal curta com 20 a 24 raios (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). *Piabina* foi recentemente alocada em gêneros *Incertae Sedis* em Characidae (LIMA, et al., 2003).

#### 1.2.5. *Orthospinus*

*Orthospinus franciscensis* (EIGENMANN, 1916) é uma espécie da subfamília Stethaprioninae, endêmica da bacia do rio São Francisco. A presença de um espinho pré-dorsal bem desenvolvido e ganchos modificados na nadadeira anal caracterizam o monofiletismo dessa subfamília (REIS, 1989). *O. franciscensis* apresenta corpo muito comprimido e alto e menos de 40 escamas na linha lateral (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

#### 1.2.6. *Serrapinnus*

Os peixes do gênero *Serrapinnus* são de pequeno porte e geralmente não ultrapassam 5 cm, pertencentes à subfamília Cheirodontinae. São abundantes em ambientes lênticos e em águas de planícies. A origem monofilética de Cheirodontinae é suportada por caracteres relacionados à morfologia dentária, cobertura muscular sobre a região anterior da bexiga natatória e padrão de colorido na região umeral (MALABARBA, 1998). *Serrapinnus* é um novo gênero proposto para Cheirodontinae (MALABARBA, 1998) e inclui espécies anteriormente alocadas nos gêneros *Cheirodon*, *Holesthes* e *Odontostilbe*, além de novas espécies. *S. piaba* (LÜTKEN, 1875) e *S. heterodon* (EIGENMANN, 1915) são encontradas na bacia do rio São Francisco.

### 1.3. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES

A citogenética de peixes neotropicais tem fornecido informações importantes sobre a fixação de rearranjos cromossômicos que podem auxiliar a identificação de espécies crípticas através da análise citotaxonômica (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; CENTOFANTE et al., 2003). Até o final dos anos 70, pouco se conhecia sobre as características citogenéticas da ictiofauna neotropical. Os dados disponíveis limitavam-se ao conhecimento do número cromossômico de algumas poucas espécies, muitas das quais obtidas de espécimes de origem geográfica desconhecida (TOLEDO-FILHO et al., 1978).

Nos últimos anos, os estudos citogenéticos focalizando espécies de peixes Neotropicais tiveram um grande desenvolvimento. No ano 2000 já eram conhecidos os números diplóides e/ou haplóides de cerca de 921 espécies, englobando 252 gêneros e 44 famílias (OLIVEIRA; TOLEDO; FORESTI, 2000). Esses dados incluem, além de número e fórmula cromossômica, informações sobre a presença de cromossomos sexuais diferenciados, presença de cromossomos supranumerários, do tipo B, distribuição de heterocromatina constitutiva, número e localização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs).

Tem sido descrito, para um crescente número de espécies, o padrão de bandas de restrição, a localização *in situ* de seqüências de DNA ribossômico, de DNA satélite obtido de regiões pericentroméricas, de cromossomo B, ou seqüências teloméricas e, mais recentemente, análises imunocitogenéticas a partir de padrões obtidos pela marcação por anticorpos.

Os peixes Neotropicais apresentam ampla variabilidade cariotípica (OLIVEIRA et al., 1988). Alguns grupos possuem números diplóides conservados, como os

Curimatidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Anostomidae, Prochilodontidae, mas podem apresentar fórmulas cariotípicas diferentes, sugerindo a ocorrência de rearranjos não-Robertsonianos, enquanto que a situação dos Characidae parece ser mais complexa (AREFJEV, 1990a).

#### 1.4. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CHARACIDAE

Os resultados obtidos a partir de estudos citogenéticos em Characidae refletem a sua heterogeneidade, uma vez que têm sido detectadas diferentes tendências citogenéticas entre diferentes subfamílias. Estudos iniciais nesse grupo foram realizados por Post (1965), que apresentou uma listagem de números cromossômicos de várias espécies de peixes, incluindo algumas espécies de Characidae. Desde então, o conhecimento citogenético nesta família aumentou consideravelmente. Oliveira et al. (1988) relacionaram 199 espécies de Characidae, cujos números haplóides e/ou diplóides já conhecidos evidenciaram uma grande diversidade cromossômica, compreendida entre  $2n=28$ , para uma espécie de *Hemigramus* (SCHELL, 1973) e  $2n=64$  para *Serrasalmus hollandi* (MURAMOTO et al., 1968), com predominância de cariótipos com  $2n=48$  e 52 cromossomos.

Arefjev (1990a) enfatizou a variabilidade cariotípica da família Characidae e concluiu que, para ser feita uma análise detalhada da evolução cromossômica e das relações filogenéticas, é necessário coletar mais informações citogenéticas, especialmente através de métodos de bandamento.

Rearranjos Robertsonianos e não-Robertsonianos podem estar igualmente envolvidos nos processos de variação cariotípica presentes nesse grupo (GALETTI JR.; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1994). Nos casos em que não há mudanças no número diplóide, inversões pericêntricas podem estar predominando na evolução

cromossômica (CESTARI; GALETTI JR., 1992a), além das inversões paracêntricas, mais difíceis de serem identificadas pelas técnicas citogenéticas convencionais.

Um aspecto bastante relevante para a família Characidae é a ocorrência de cromossomos supranumerários em várias espécies, como em *Astyanax eigenmanniorum* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994), *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004), *Moenkhausia intermedia* (PORTELA; GALETTI JR.; BERTOLLO, 1988), *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; PORTELA-CASTRO; JÚLIO; NISHIYAMA, 2000), *Oligosarcus pintoii* (FALCÃO; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1984), entre outros. Também foi descrita a ocorrência de triploidia natural para algumas espécies de *Astyanax*, entre as quais *A. schubarti* (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983), *A. scabripinnis* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO et al., 1994), *A. fasciatus* (MALACRIDA et al., 2000), *A. eigenmanniorum* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994). Além disso, definiu-se para o gênero *Triportheus* um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW que se apresenta presente em todas as espécies já analisadas desse gênero (BERTOLLO; CAVALLARO, 1992; ARTONI; BERTOLLO, 2002).

Em decorrência da grande variabilidade cariotípica em relação às regiões organizadoras de nucléolo (NORs), tanto no número como nos cromossomos portadores, podem ser estabelecidas diferenças evidentes entre espécies de Characidae (GALETTI JR., 1998). Com relação à coloração por fluorocromos GC-específicos, na grande maioria dos casos há uma coincidência de localização entre as marcações obtidas e as Ag-NORs, ou seja, os sítios de NORs detectados pela Prata (GALETTI JR.; RASH, 1993; GALETTI JR.; MESTRINER; MONACO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996). No entanto, alguns sítios banda C

positivos e fluorescentes com Distamicina A /Cromomicina A<sub>3</sub> não se relacionam com Ag-NORs (SOUZA, et al. 2001).

### 1.5. A BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO

A bacia do rio São Francisco é a quarta em importância entre as bacias brasileiras, ocupando cerca de 7,4% do território nacional. Abrange as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, cortando os Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (PAIVA, 1982) (figura 1). Ao longo de seu curso, o rio São Francisco estende-se por superfícies de altitude variável (entre 400 e 1000 m), sendo caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cascatas.

Esta bacia encontra-se dividida em três regiões: o vale superior, que compreende as regiões que vão desde a cabeceira do rio até a corredeira de Pirapora, o vale médio, que abrange desde a corredeira de Pirapora até a cachoeira Paulo Afonso e o vale inferior, que vai desta cachoeira citada até a foz. A bacia do São Francisco abrange cerca de 159 espécies de peixes, muitas delas caracterizadas pelo endemismo (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Paiva (1983), sugere que, para a distribuição de peixes pelo rio São Francisco, sejam levadas em consideração algumas características, tais como: (1) o São Francisco é um rio perene e que cruza o Brasil de oeste para leste; (2) na região do vale superior, as águas são torrenciais, frias e com pouco material em suspensão; (3) no vale médio, as águas possuem pequena velocidade com temperaturas mais elevadas e com um pouco mais de material orgânico em suspensão, e; (4) no vale inferior, nas proximidades do estuário, as lagoas marginais são verdadeiros criadouros de peixes, com água sedimentada, rica em nutrientes.



Figura 1 - Bacia do rio São Francisco

Grande parte da fauna de peixes do São Francisco concentra-se em seus afluentes permanentes e de água com pouco material em suspensão, sendo que são nas lagoas marginais que muitas espécies desovam, principalmente durante a piracema. A época predominante de reprodução tem início em outubro, antecedendo os meses mais chuvosos, com a chegada dos quais tem início a piracema (PAIVA, 1983).

Três Marias é um município do Estado de Minas Gerais localizado na região do vale superior do São Francisco, possuindo uma área total de 2.673 km<sup>2</sup>. A altitude máxima na região é de 975m (Div. Munic. Lassance) e a mínima de 504m (Foz de um afluente denominado rio Janeiro) (Prefeitura de Três Marias).

A região apresenta uma temperatura média anual de 24,3°C, sendo as temperaturas mínima e máxima médias anual iguais a 14°C e 30,1°C, respectivamente. A precipitação média anual é de 1.791mm, sendo os meses mais chuvosos os de outubro a dezembro, e os mais secos de junho a agosto (Prefeitura de Três Marias).

Em 1957 tiveram início as obras para a construção da barragem de Três Marias, as quais foram concretizadas em 1960. Esta barragem apresenta 2.700 m de extensão e altura máxima de 75m e, quando cheia, possui um volume da ordem de 21 bilhões de m<sup>3</sup> de água (Figura 2j). Esta construção visou alguns objetivos, como: regularização do rio, aumento do volume de água para navegação em Pirapora e Juazeiro, controle das cheias, obras de irrigação e produção de energia (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

Esta grande obra provocou o surgimento de obstáculos à migração reprodutiva dos peixes, além de restringir as cheias à jusante do reservatório, o que prejudicou o funcionamento natural das lagoas marginais, as quais eram tidas como

berçários naturais. Este fato despertou o interesse pelo manejo, visando tanto à exploração quanto à preservação.

## 2. OBJETIVOS

- 1- Caracterizar cromossomicamente espécies de pequenos Characidae ainda não estudados da região de Três Marias-MG, visando a obtenção de informações consistentes para o estudo da evolução cariotípica deste grupo.
- 2- Comparar os dados obtidos com os já disponíveis na literatura, procurando ampliar o conhecimento dos processos de diferenciação cromossômica na família Characidae.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar os estudos propostos neste trabalho foram coletados exemplares de Characidae em lagoas e córregos às margens do rio São Francisco, no município de Três Marias-MG, Brasil (figura 1). As espécies foram identificadas e depositadas no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

#### 3.1. ESPÉCIES ANALISADAS

*Myleus micans* (figura 2a)

*Astyanax lacustris* (figura 2b) (MZUSP 86918)

*A. scabripinnis* (figura 2d) (MZUSP 86914)

*Orthospinus franciscensis* (figura 2e) (MZUSP 86913)

*Piabina argentea* (figura 2f) (MZUSP 86912)

*Serrapinnus heterodon* (figura 2g) (MZUSP 86916).

*S. piaba* (figura 2h) (MZUSP 86915)

*Hasemanina nana* (figura 2i) (MZUSP 86917)

Foi incluído no projeto a espécie *Astyanax altiparanae* (figura 2c) (MZUSP 86919) que habita as águas da bacia do Alto Paraná. Os espécimes foram coletados no córrego Monjolinho na Universidade Federal de São Carlos.

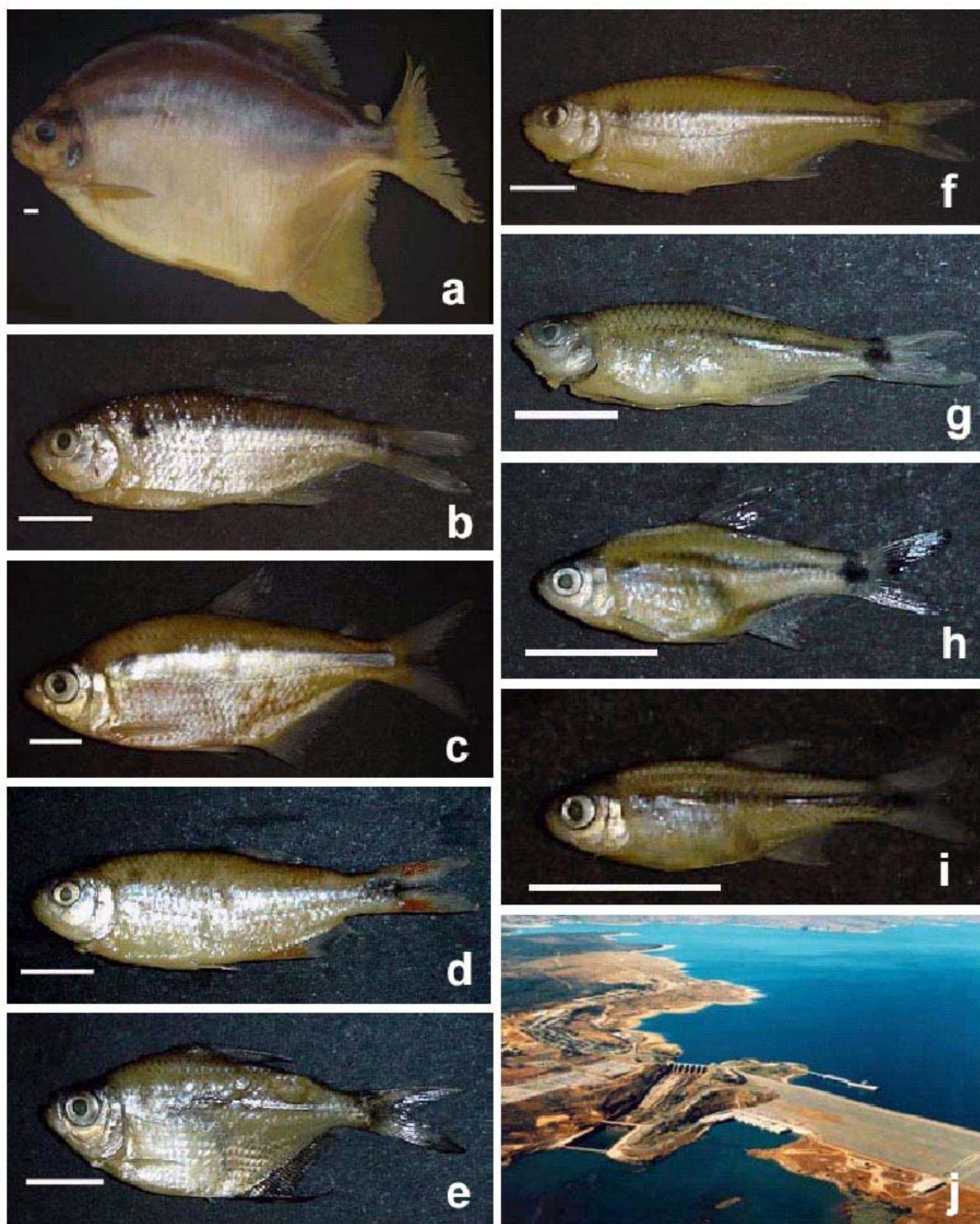


Figura 2 - Espécies da família Characidae analisadas no presente trabalho: a) *Myleus micans*; b) *Astyanax lacustris*; c) *A. altiparanae*; d) *A. scabripinnis*; e) *Orthospinus franciscensis*; f) *Piabina argentea*; g) *Serrapinnus heterodon*; h) *S. piaba*; i) *Hasemanina nana*; j) Represa de Três Marias-MG. A barra corresponde a 10mm.

## 3.2. METODOLOGIAS

### 3.2.1. *Indução de metáfase*

Foi utilizada a técnica de indução do aumento na frequência mitótica nas células de defesa através da injeção de suspensão de levedura (LEE; ELDER, 1980).

### 3.2.2. *Preparação de cromossomos mitóticos*

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim por meio da técnica de preparação direta (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978): Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 1mL para cada 100g do animal.

1. Após 30 min sacrificar o animal, retirar o rim e dissociar em solução hipotônica de KCl 0,075mol/L.
2. Incubar a suspensão celular por 20min em estufa a 37°C.
3. Pingar 6 gotas de fixador (metanol/ácido acético-3:1) homogeneizar o material e centrifugar a 900rpm/10min.
4. Descartar o sobrenadante e acrescentar 10mL de fixador, homogeneizar e centrifugar a 900rpm/10min.
5. Repetir o passo 4 por mais duas vezes.
6. Após desprezar o sobrenadante da última centrifugação adicionar 200 a 1000 $\mu$ L de fixador homogeneizar e guardar o material a -20°C.

Alternativamente, utilizou-se a técnica de Gold, Shipley e Powers (1990):

1. Retirar o rim, colocar em solução de Hanks, dissociar e incubar por 25min com 4 gotas de colchicina 0,025%.
2. Centrifugar a 900rpm/10min, descartar o sobrenadante e acrescentar 10mL de solução hipotônica de KCl 0,075mol/L.

3. Incubar por 20min, em seguida, fazer as fixações como no protocolo anterior. Para a análise cromossômica, três gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina de vidro e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 7min.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtlocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), de acordo com a razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico. Para a determinação do número fundamental (NF) (número de braço dos cromossomos) foram considerados com dois braços os cromossomos M, SM e ST e com um único braço os cromossomos A.

### 3.2.3. *Bandamento C*

A identificação das regiões de heterocromatina constitutiva seguiu a metodologia descrita por Sumner (1972):

1. Mergulhar a lâmina em HCl 0,2mol/L a 42°C por 15min.
2. Lavar a lâmina e mergulhar em Ba(OH)<sub>2</sub> 5% a 42°C por 30s a 2min.
3. Em seguida mergulhar três vezes em HCl 0,2mol/L.
4. Lavar a lâmina e mergulhar em 2xSSC a 60°C por 30min.
5. Lavar a lâmina, secar ao ar e corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 5min.

### 3.2.4. *Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)*

A identificação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-NORs) seguiu a técnica descrita por Howell e Black (1980), com algumas adaptações:

1. Mergulhar a lâmina em HCl 0,2mol/L a 42°C por 3min.

2. Lavar em água corrente e secar ao ar.
3. Pingar na lâmina 3 gotas de solução aquosa de gelatina (2%) com ácido fórmico (1%).
4. Pingar 6 gotas de  $\text{AgNO}_3$  (50%), cobrir com uma lamínula e incubar na estufa a  $60^\circ\text{C}$ .
5. Quando a lâmina apresentar coloração castanha lavar em água corrente e secar ao ar.

### 3.2.5. Coloração com Cromomicina ( $\text{CMA}_3$ )

O procedimento de coloração cromossômica com  $\text{CMA}_3$  seguiu a técnica descrita por Schmid (1980) com algumas modificações:

1. Colocar  $150\mu\text{L}$  de solução de distamicina A  $0,3\text{mg/mL}$  sobre a lâmina, cobrir com uma lamínula e após 15 min lavar em água corrente e deixar secar ao ar.
2. Colocar  $100\mu\text{L}$  da solução de cromomicina  $\text{A}_3$  sobre a lâmina, cobrir com uma lamínula e após 1h lavar em água corrente e secar ao ar.
3. Montar com lamínula utilizando solução saturada de sacarose e guardar no escuro a temperatura ambiente.

Analisar após 30 dias em microscópio de epifluorescência com filtro de 450-490nm.

### 3.2.6. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S foi obtida pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel, Straume e Gray (1986), com sondas de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), obtidas por Hatanaka e Galetti JR. (2004) e de *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) por Martins e Galetti JR. (2001a), respectivamente:

### Marcação da sonda

1. As sondas foram marcadas com biotina através de ‘Nick Translation’ com o kit Bionick™ Labeling System, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen™).
2. Desidratar a lâmina em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100%) por 5 min cada. Incubar as lâminas com RNase (40µg/mL em 2xSSC) em câmara úmida a 37°C por 1h.
3. Fixar os cromossomos com formaldeído 1%, PBS 1X, MgCl<sub>2</sub> 50mM por 10 min a temperatura ambiente.
4. Desidratar a lâmina em série alcoólica.
5. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5min.
6. Desnaturar a sonda em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10%, 2xSSC, DNA de placenta humana 200µg/µL, sonda 3,75 ng/µL, volume final de 400µL) a 100°C por 10 min.
7. Colocar 50µL da solução de hibridação em cada lâmina e incubar em câmara umedecida com formamida 60% overnight.
8. Lavar com formamida 50% em 2xSSC a 42°C por 20min e com 0,1xSSC a 60°C por 15 min.
9. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM (No Fat Dry Milk 5%, 4xSSC).
10. Incubar as lâminas com 90µL de FITC 2,5ng/µL em NFDM por 30 min.
11. Incubar as lâminas com 90µL de anti-avidina 1% em NFDM por 30 min.
12. Repetir o passo 10.
13. Repetir o passo 11.
14. Repetir o passo 10.

15. Desidratar em série alcoólica.

16. Montar a lâmina com 25  $\mu$ L de antifading e 1  $\mu$ L iodeto de propídio (50 $\mu$ g/mL).

#### 4. RESULTADOS

Os resultados e discussão estão apresentados em cinco capítulos, os quais constituem artigos científicos em fase de preparação ou submetidos à publicação. As referências bibliográficas estão no final do volume.

CAPÍTULO I – Caracterização cariotípica de *Myleus micans* (LÜTKEN, 1875) (Pisces, Characidae, Serrasalminae).

CAPÍTULO II – Caracterização cariotípica em espécies do gênero *Serrapinnus* (Teleostei, Characidae), com a descrição de um polimorfismo estrutural em *S. heterodon*.

CAPÍTULO III – Caracterização cariotípica de três espécies de Characidae da bacia do rio São Francisco (Teleostei, Characiformes)

CAPÍTULO VI – Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae)

CAPÍTULO V – Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em nove espécies da família Characidae (Teleostei, Characiformes)

#### 4.1. CAPÍTULO I

**Caracterização cariotípica de *Myleus micans* (LÜTKEN, 1875) (Pisces,  
Characidae, Serrasalminae)**



## **Caracterização cariotípica de *Myleus micans* (LÜTKEN, 1875) (Characidae, Serrasalminae)**

Wellington Adriano Moreira Peres, Luiz Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira-Filho

### Resumo

Nesse trabalho são apresentados dados cromossômicos inéditos para *Myleus micans*, uma espécie da subfamília Serrasalminae endêmica da bacia do rio São Francisco, Brasil. O número diplóide encontrado foi  $2n=58$  com  $26M+18SM+8ST+6A$  para ambos os sexos. Foi observado heterocromatina na região pericentromérica de poucos cromossomos e somente o par 27 apresentou na região telomérica. Ag-NORs múltiplos foram detectadas após a coloração com nitrato de prata em quatro cromossomos. A coloração com  $CMA_3$  também revelou quatro sítios cromossomos, dois coincidentes com os evidenciados pelo nitrato de prata. Por outro lado, sete sítios de 18S foram identificados após hibridação *in situ* fluorescente (FISH), e somente um par cromossômico portador de rDNA 5S. Foi discutida a relação entre *Myleus* e os outros gêneros de Serrasalminae.

Palavras chave: Citogenética; Pisces; Characidae; Serrasalminae; *Myleus*

### Introdução

A ordem Characiformes apresenta um padrão evolutivo e biogeográfico complexo e constitui um grupo ecologicamente e morfologicamente diversificado (ORTÍ; MEYER, 1997). A subfamília Serrasalminae consiste de 80 espécies endêmicas e amplamente distribuídas na América do Sul. Essas espécies são

caracterizadas pelo corpo comprimido, nadadeira dorsal longa com mais de 16 raios e a presença de escamas modificadas formando uma serra na região abdominal (ORTÍ et al., 1996; JÉGU, 2003). Serrasalminae foi dividida em duas linhagens de acordo com características morfológicas: linhagem A compreendendo os “pacus” e linhagem B compreendendo as “piranhas” (MACHADO-ALLISSON, 1983). Entretanto, usando seqüências de DNA mitocondrial, Ortí et al. (1996) encontraram uma relação mais complexa para esse grupo a qual foi suportada por outros dados filogenéticos evidenciando o parafiletismo do gênero *Myleus*. Esse gênero é encontrado principalmente na bacia Amazônica, mas possui algumas espécies nas bacias do Paraná-Paraguai e São Francisco.

Os estudos citogenéticos na família Characidae se iniciaram com os trabalhos de Post (1965). Desde então, os dados cromossômicos vêm sendo apresentados, não apenas com as técnicas convencionais para obtenção de cariótipos, mas também com técnicas de bandamento, aplicação de fluorocromos base-específicos e hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Arefjev (1990a) enfatizou a variabilidade cariotípica dessa família e concluiu que para ser feita uma análise detalhada da evolução cromossômica e das relações filogenéticas é necessário coletar mais informações citogenéticas, especialmente através de métodos de bandamento.

Na subfamília Serrasalminae, *Serrasalmus* é o gênero mais estudado. O número diplóide mais freqüente é  $2n=60$  (GALETTI, JR.; SILVA; CERMINARO, 1985; CESTARI; GALETTI JR., 1992a, b; MARTINS-SANTOS; JÚLIO; SANTOS, 1994; NAKAYAMA; PORTO; FELDBERG, 2002). No entanto, pode variar de  $2n=58$  em *S. rombeus* (NAKAYAMA et al., 2001) a  $2n=64$  em *S. hollandi* (MURAMOTO et al., 1968). Entretanto, o menor número diplóide em Serrasalminae é encontrado nos

gêneros *Piaractus* e *Mylossoma*, ambos com  $2n=54$  (NIRCHIO et al., 2003), o que pode representar uma condição ancestral para essa subfamília (ORTÍ et al., 1996).

Por outro lado, dados citogenéticos em *Myleus* ainda não são representativos totalizando apenas 6 das 15 espécies do gênero. Nesse sentido analisamos citogeneticamente a espécie *Myleus micans* (LÜTKEN, 1875) endêmica da bacia do São Francisco, para fornecer dados que possam ajudar a esclarecer as relações filogenéticas do gênero *Myleus*.

## Material e Métodos

Foram analisados dez espécimes de *Myleus micans*, quatro machos e seis fêmeas, de uma população do rio São Francisco (Três Marias, MG, Brasil). Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior e posterior, por meio da técnica de preparação direta de acordo com Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho, (1978). A análise da heterocromatina constitutiva (banda C) e das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) seguiram as metodologias descritas por Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com poucas adaptações. A mesma metáfase foi analisada seqüencialmente na coloração convencional em Geimsa, banda C e coloração com nitrato de prata (Ag-NORs). Para detectar as regiões ricas em GC, os cromossomos foram também corados com o fluorocromos específico cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), de acordo com Schmid (1980). A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foram mapeadas usando hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986), com sondas obtidas de *Prochilodus lineatus* (HATANAKA; GALETTI JR., 2004) e *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JR., 2001), respectivamente.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), de acordo com a razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico.

## Resultados

Um total de 302 células analisadas apresentaram um número diplóide modal de  $2n=58$  cromossomos, em ambos machos e fêmeas, com  $26M+18SM+8ST+6A$  (Figura 3a). O número fundamental (número de braços dos cromossomos) também foi igual para ambos os sexos, não sendo observada nenhuma diferença na morfologia dos cromossomos entre eles. Foi observado em alguns poucos cromossomos heterocromatina na região pericentromérica. Somente o par acrocêntrico 27 apresentou heterocromatina na região terminal do braço longo (Figura 3b). As Ag-NORs foram observadas em 2-4 cromossomos, na região telomérica do braço curto do par subtelocêntrico 26 e do par acrocêntrico 28 (Figura 3 - box), caracterizando assim um sistema múltiplo de Ag-NOR para essa espécie.

Foram evidenciados quatro sinais  $CMA_3$  positivos (sítios cromossômicos GC ricos) (Figura 4b), dois localizados na região pericentromérica de um par metacêntrico (provavelmente o 3° par) e os outros dois na região telomérica do braço curto do par acrocêntrico 28.

Além dos pares 26 e 28, evidenciados pela prata, mais três cromossomos foram evidenciados com rDNA 18S (Figura 4a), sendo um par metacêntrico médio, e um único cromossomo acrocêntrico. Nesses três cromossomos, os sítios de rDNA 18S foram localizados no braço curto próximo ao centrômero. As Ag-NORs do par cromossômico 28 foram coincidentes com heterocromatina evidenciada pela técnica

de bandamento C, bem com um sinal CMA<sub>3</sub> positivo. No entanto, o mesmo não foi observado para o par 26, também portador de Ag-NORs. Um único sítio de rDNA 5S foi localizado na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos médios (Figura 4c).

## Discussão

O número diplóide  $2n=58$  é compartilhado por todas as espécies de *Myleus*, com exceção de *Myleus aff. rhomboidalis* com  $2n=62$  (PARRA, 2000), e parece ser basal para o gênero. Por outro lado, observa-se uma diferenciação quanto à distribuição dos tipos cromossômicos nessas espécies. Assim, rearranjos não-Robertsonianos, principalmente inversões pericêntricas, podem ter desempenhado um importante papel na diversificação cariotípica desses peixes.

Através de análises seqüenciais das preparações cromossômicas, pelas técnicas de coloração Giemsa convencional, bandamento C e coloração com nitrato de prata, foi possível identificar com precisão os cromossomos portadores de heterocromatina constitutiva (Figura 3b) e localizar as Ag-NORs nos pares 26, e 28 (Figura 3 - box). No entanto, essa espécie apresentou poucos blocos heterocromáticos quando comparada com outras espécies do gênero e da subfamília Serrasalminae. Parra (2000) observou blocos heterocromáticos na região pericentromérica da maioria dos cromossomos e na região proximal de alguns pares em *M. schomburgkii*. Do mesmo modo, praticamente todos os cromossomos das espécies de *Serrasalmus* analisadas apresentaram heterocromatina nas regiões centroméricas e teloméricas, além de alguns blocos intersticiais (CESTARI; GALETTI JR., 1992b; CENTOFANTE; PORTO; FELDBERG, 2002; NAKAYAMA; PORTO; FELDBERG, 2002).

A técnica de coloração com nitrato de prata (HOWELL; BLACK, 1980) é comumente usada para detectar as regiões organizadoras do nucléolo (NORs) que estiveram ativas na interfase anterior à mitose, sendo designadas Ag-NORs. Em Serrasalmiinae, Ag-NORs múltiplas representam uma característica comum (GALETTI, JR.; SILVA; CERMINARO JR., 1985; CESTARI; GALETTI JR., 1992a; NAKAYAMA et al., 2001; NAKAYAMA; PORTO; FELDBERG, 2002; CENTOFANTE; PORTO; FELDBERG, 2002). Por sua vez, *Myleus micans* apresentou no máximo 4 cromossomos marcados pelo nitrato de prata, sendo os pares 26 (subtelocêntrico) e 28 (acrocêntrico). O segmento Ag-NOR do par 28 também apresentou heterocromatina evidenciada pela técnica de bandamento C o que indica uma associação entre o sítio Ag-NOR com heterocromatina. Dados semelhantes foram descritos para *M. schomburgkii* o qual apresentou Ag-NORs associadas e não associadas à heterocromatina (PARRA, 2000).

Entre os peixes, uma correspondência entre Ag-NORs e sítios banda C positivos é relativamente comum (GALETTI JR.; RASH, 1993; GALETTI JR.; MESTRINER; MONACO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996) podendo facilitar o acúmulo desses *loci* (FUJIWARA et al., 1998). É possível que a ausência de associação entre Ag-NORs e sítios banda C positivos, menos freqüente, esteja relacionada a um número reduzido de cópias repetidas de rDNA por sítio e à uma pequena quantidade de heterocromatina (FUJIWARA et al., op. cit.).

Por outro lado, em Parodontidade, rearranjos envolvendo as Ag-NORs são facilitados pela heterocromatina adjacente e não coincidente as mesmas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1984). Tratamento com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> tem sido usado para evidenciar regiões ricas em GC as quais, freqüentemente, são coincidentes com as NORs, especialmente em anfíbios e

peixes (SCHMID, 1980; AMEMIYA; GOLD, 1986; GALETTI JR.; RASCH, 1993a, b; GALETTI JR.; MESTRINER; MONACO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996; entre outros). Entretanto, dos 4 cromossomos que apresentaram blocos CMA<sub>3</sub> positivos em *M. micans* (Figura 4b), apenas o par 28 foi evidenciado pela coloração com nitrato de prata (Figura 3 - box). Os outros dois cromossomos CMA<sub>3</sub> positivos, um par de metacêntricos, apresentaram a região pericentromérica marcada o que pode corresponder a sítios adicionais de NOR.

Para complementar os dados de NORs foi empregada a metodologia de FISH, com sonda de rDNA 18S. Além dos pares 26 e 28, evidenciados pelo nitrato de prata, encontramos mais dois cromossomos metacêntricos e um cromossomo ST/A portadores de cistrons de rDNA 18S (Figura 4a). O par metacêntrico, possivelmente, é o mesmo CMA<sub>3</sub> positivo que não foi marcado pelo nitrato de prata. Esses sítios adicionais de rDNA Ag-NORs negativos podem ser inativos ou constituídos de pseudogenes, uma vez que a coloração com nitrato de prata é capaz de revelar somente as NORs que estiveram ativas na intérfase anterior a mitose (MILLER et al., 1976). Por conseguinte, os dados de Ag-NORs ou CMA<sub>3</sub>, não podem ser considerados como definitivos na localização dos sítios de rDNA 45S nos cromossomos.

Assim como as NORs, os sítios de rDNA 5S parecem ser variáveis em Serrasalmiinae. Em *M. micans* foi possível identificar dois cromossomos homólogos apresentando sítios de 5S (Figura 4c), o que também foi observado em *Serrasalmus spilopleura* por Daniel-Silva (2001). No entanto, em *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *P. brachipomus*, essa autora identificou quatro cromossomos portadores de rDNA 5S.

De acordo com Ortí et al. (1996), Serralmiinae pode ser dividida em três grandes grupos, sendo as piranhas (grupo A) mais relacionadas aos pacus dos gêneros *Myleus* e *Mylesinus* (grupo B) e mais distantes dos pacus dos gêneros *Mylossoma*, *Colossoma* e *Piaractus* (Grupo C). Assim, a relação entre os três grupos também seria suportada pelo número de sítios de rDNA 5S, sendo que os grupos A e B poderiam representar a condição ancestral com apenas um par de cromossomos portadores de 5S. Por outro lado, a presença de dois pares, seria uma sinapomorfia do grupo C.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem Dr. Yoshimi Sato, CODEVASF, Três Marias-MG pelo auxílio na coleta dos espécimes. Este trabalho foi apoiado pela FAPESP (Proc. 03/03642-1) e CNPq.



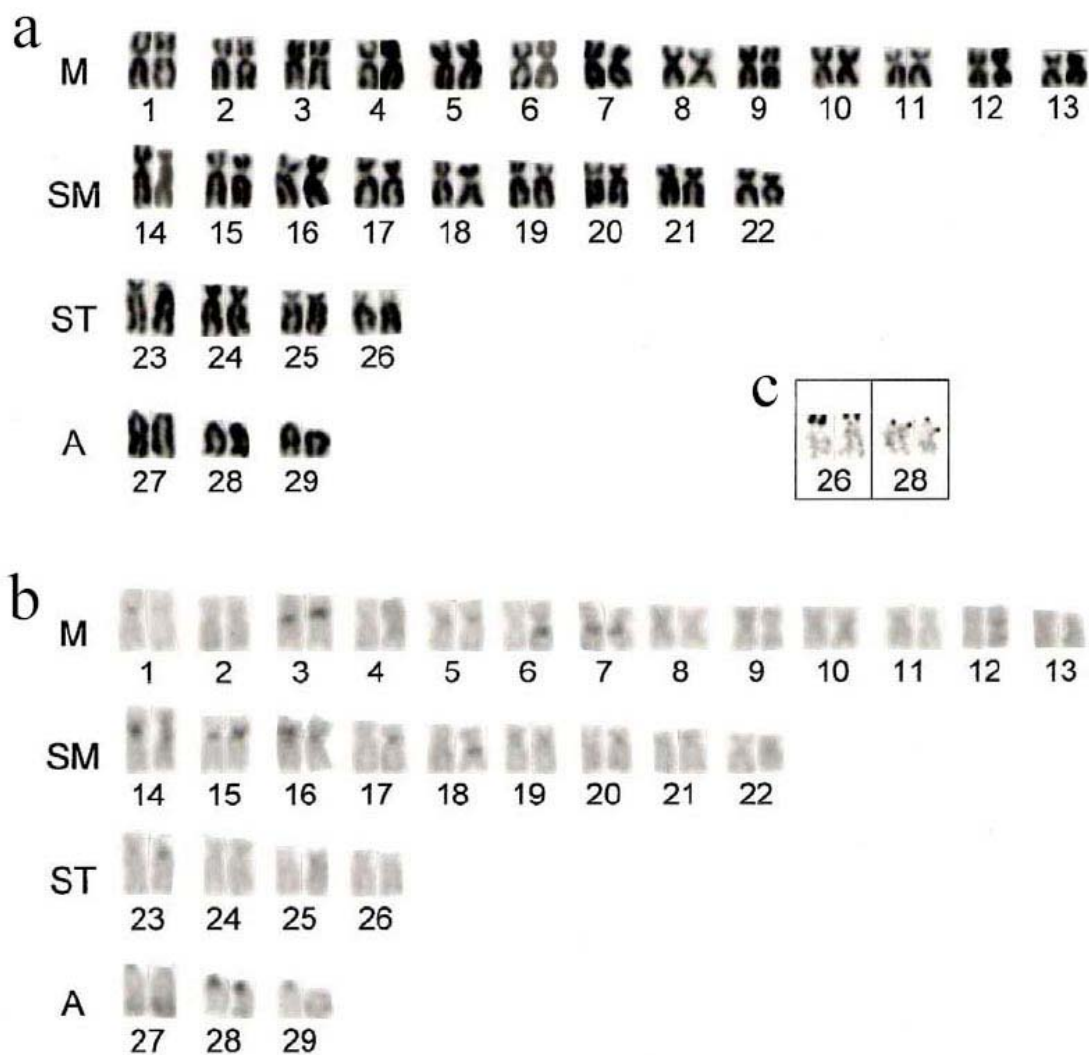


Figura 3 - Cariótipo sequencial de *Myleus micans*. (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NORs.

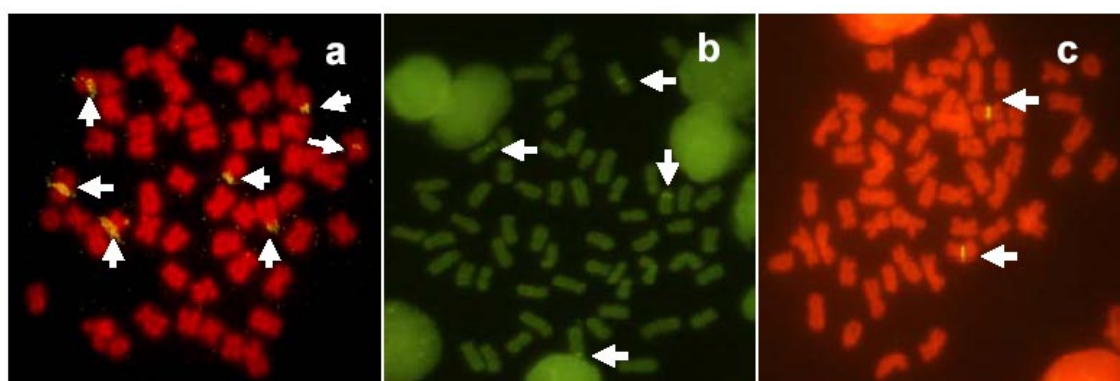


Figura 4 - Localização dos sítios (setas) de rDNA e CMA<sub>3</sub> em *Myleus micans*: (a) hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de rDNA 18S, (b) coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (c) FISH com sonda de rDNA 5S.

#### 4.2. CAPÍTULO II

**Caracterização cariotípica em espécies do gênero *Serrapinnus* (Teleostei, Characidae), com a descrição de um polimorfismo estrutural em *S. heterodon***

**Caracterização cariotípica em espécies do gênero *Serrapinnus* (Teleostei, Characidae), com a descrição de um polimorfismo estrutural em *S. heterodon***

Wellington Adriano Moreira Peres, Luiz Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira Filho

Resumo

A família Characidae, uma das maiores e mais diversificadas da região Neotropical, certamente não constitui um grupo monofilético. Paralelamente, os dados citogenéticos também mostram ampla variabilidade cromossômica, indicando que a citogenética pode fornecer informações importantes para uma melhor compreensão das relações entre as espécies dessa família. Nesse trabalho foram analisadas duas espécies do gênero *Serrapinnus*, provenientes da bacia do rio São Francisco. As duas espécies, *S. heterodon* e *S. piaba*, apresentaram um mesmo número diplóide,  $2n=52$  cromossomos, e uma mesma fórmula cariotípica,  $16M+20SM+14ST+2A$ . A distribuição de heterocromatina, evidenciada pelo bandamento C, mostrou-se semelhante entre as duas espécies. Por outro lado, em *S. heterodon* foi evidenciado um sistema de NORs simples, enquanto que em *S. piaba* foi caracterizado um sistema de NORs múltiplas, confirmados tanto pela coloração com o nitrato de prata como pela hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S. Além disso, foram observados mais dois tipos de cariótipos (citótipos) em *S. heterodon*,  $15M+20SM+14ST+3A$  e  $17M+20SM+14ST+1A$ , caracterizando um polimorfismo cromossômico estrutural na população. Ao que tudo indica, as diferenças entre os três citótipos devem ser devidas a inversões pericêntricas relacionadas aos pares 8 e 26. Nos modelos clássicos de especiação, os heterozigotos para inversões pericêntricas, assim como para translocações, podem ter influência em processos de

isolamento reprodutivo e especiação, visto que geralmente causam um certo grau de esterilidade. Nesse sentido, é destacada a relevância do processo de inversão pericêntrica na evolução cariotípica dos peixes.

Palavras chave: citogenética, peixes Neotropicais; inversões pericêntricas, evolução cariotípica.

### Introdução

Characidae é a maior família da ordem Characiformes, com aproximadamente 776 espécies distribuídas em 152 gêneros (FROESE; PAULY, 2005). Associada a esse grande número de espécies está uma ampla variedade de formas, as quais indicam uma origem parafilética para essa família (VARI, 1983; WEITZMAN; MALABARBA, 1998). No início do século passado, quando foi descrita a maioria das subfamílias de Characidae, eram consideradas as similaridades globais entre as espécies, não importando a origem de cada caráter, o que contribuiu para uma caracterização imprecisa de vários grupos.

Por outro lado, a subfamília Cheirodontinae é considerada monofilética, sendo composta por representantes de pequeno porte (usualmente com 30-40mm de comprimento) e abundantes em ambientes lênticos e águas de planícies na América do Sul e Central (MALABARBA, 1998). A origem monofilética desse grupo é suportada por caracteres relacionados à morfologia dentária, à musculatura e ao padrão de colorido na região umeral (MALABARBA, 1998). O gênero *Serrapinnus* foi recentemente proposto para Cheirodontinae (MALABARBA, 1998) e inclui espécies anteriormente alocadas nos gêneros *Cheirodon*, *Holesthes* e *Odontostilbe*, além de novas espécies.

Citogeneticamente, as espécies de Characidae também são bastante diversificadas. Apresentam variações quanto ao número diplóide (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983; OLIVEIRA et al., 1988; PORTELA; GALETTI JR.; BERTOLLO, 1988; AREFJEV, 1990a), distribuição de heterocromatina constitutiva (SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996; MANTOVANI et al., 2000; MANTOVANI et al., 2004), localização, número e tamanho das regiões organizadoras de nucléolo (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1984; GALETTI JR., 1998), presença de cromossomos supranumerários (MOREIRA-FILHO et al., 2001) cromossomos sexuais (ARTONI; BERTOLLO, 2002) diplocromossomos (SOUZA; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1995) e poliploidia (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994). Entretanto, são poucos os casos de polimorfismo cromossômico estrutural relatados para essa família (CENTOFANTE; PORTO; FELDBERG, 2002; PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001). Possivelmente, isso esteja relacionado à dificuldade em se detectar, através da coloração convencional, rearranjos que não alteram substancialmente a posição do centrômero, bem como ao tamanho das amostras analisadas em vários casos. Sendo assim, é evidente a importância de uma amostra significativa de espécimes estudados, além do emprego de metodologias que possibilitem identificar mudanças mais sutis nos cromossomos.

No presente trabalho, analisamos o cariótipo de duas espécies de Cheirodontinae do gênero *Serrapinnus*, com o emprego de algumas metodologias convencionais de análise e de localização *in situ* de seqüências de rDNA, apresentando também um caso de polimorfismo cromossômico estrutural.

## Material e Métodos

Foram analisados catorze espécimes de *Serrapinnus heterodon* (EIGENMANN, 1915), quatro machos e dez fêmeas, e dezesseis espécimes de *S. piaba* (LÜTKEN, 1875), cinco machos, seis fêmeas e cinco com sexo não determinado, coletados em uma pequena lagoa às margens do rio São Francisco (Três Marias, MG, Brasil). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, com os registros MZUSP 86916 e MZUSP 86915, respectivamente.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim por meio da técnica de preparação direta (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978). A análise da heterocromatina constitutiva (bandamento C) e das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) seguiram as metodologias descritas por Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente. Foi utilizada uma análise seqüencial com coloração Giemsa convencional, bandamento C e coloração com nitrato de prata (Ag-NORs) para uma identificação mais precisa dos cromossomos. A localização dos sítios de rDNA 18S foi obtida pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel, Straume e Gray (1986), com sondas de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), obtidas por Hatanaka e Galetti Jr. (2004).

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), de acordo com a razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico. Para a determinação do número fundamental (NF) (número de braço dos cromossomos) foram considerados com dois braços os cromossomos M, SM e ST e com um único braço os cromossomos A.

## Resultados

*Serrapinnus heterodon* apresentou um número diplóide modal constante, com  $2n=52$  cromossomos em ambos os sexos, porém com três tipos distintos de cariótipos (citótipos A, B e C). O citótipo A caracteriza-se por  $16M+20SM+14ST+2A$ ,  $NF=102$  (Figura 5a); o citótipo B por  $15M+20SM+14ST+3A$ ,  $NF=101$  (Figura 5b) e o citótipo C por  $17M+20SM+14ST+1A$ ,  $NF=103$  (Figura 5c). Não foi observada relação entre os citótipos e o sexo dos animais. A heterocromatina foi detectada na região pericentométrica de alguns poucos pares de cromossomos (Figura 5d). Somente o par subtelocêntrico 19 apresentou heterocromatina na região terminal do braço curto (Figura 5d), sendo que as Ag-NORs (Figura 5 - box) e os sítios de rDNA 18S (Figura 7a), foram localizados nessa mesma região, caracterizando assim um sistema de NOR simples para essa espécie.

*Serrapinnus piaba* apresentou um número diplóide modal de  $2n=52$  cromossomos, com  $16M+20SM+14ST+2A$ ,  $NF=102$ , em ambos os sexos (Figura 6a). A heterocromatina também se localiza na região pericentométrica de alguns poucos cromossomos (Figura 6b). Ag-NORs foram observadas em até três cromossomos, na região telomérica do braço curto de um par submetacêntrico e em um único subtelocêntrico (Figura 6 - box). Além desses três cromossomos, sítios de rDNA 18S foram também evidenciados em mais quatro cromossomos (Figura 7b), sendo localizados no braço curto do par acrocêntrico 26, onde também se verifica um segmento de heterocromatina, e em um par metacêntrico não identificado.

## Discussão

*S. heterodon* e *S. piaba*, apresentaram o mesmo número diplóide,  $2n=52$  cromossomos, com uma macro-estrutura cariotípica bastante similar. A distribuição das bandas C nessas duas espécies também se mostrou parecida. No entanto, a presença de heterocromatina no par 19 em *S. heterodon*, assim como no par 26 em *S. piaba* corresponde a caracteres que podem ser usados como marcadores para essas duas espécies. Da mesma forma, as NORs também se mostraram espécie específicas, com um sistema simples em *S. heterodon* e múltiplo em *S. piaba*, o que foi comprovado tanto pela coloração com o nitrato de prata, assim como pela hibridação *in situ* com sonda de rDNA 18S. No entanto, em *S. heterodon* foi observado um número maior de sítios de rDNA 18S comparativamente aos sítios de Ag-NORs. Tal ocorrência tem sido relativamente comum em espécies de peixes que apresentam um sistema de NOR múltiplo, como *Hoplias malabaricus* (BORN; BERTOLLO, 2000), *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), *A. parahybae*, *A. intermedius* e *A. giton* (KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), o que pode ser explicado pelo fato da coloração com nitrato de prata só evidenciar as NORs que estiveram ativas na interfase precedente (MILLER et al., 1976). O maior número de sítios de NORs em *S. piaba* indica que rearranjos cromossômicos, bem como eventos de transposição, podem ter contribuído para a dispersão desses cistrons durante a evolução cariotípica dessa espécie.

Em *S. heterodon* foi detectado um polimorfismo estrutural envolvendo pequenos cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, além de três citótipos com distintos números fundamentais. O citótipo A possui a mesma organização do cariótipo de *S. piaba*, sugerindo ser este o cariótipo básico do qual se originaram as demais formas cariotípicas observadas na população. No citótipo B observa-se a



ausência de um pequeno cromossomo metacêntrico do par 8, aparentemente substituído por um pequeno acrocêntrico. Já no citótipo C observa-se a ausência de um dos pequenos cromossomos acrocêntricos do par 26, aparentemente substituído por um pequeno metacêntrico. Assim sendo, é provável que esses dois citótipos tenham surgido por diferentes inversões pericêntricas, relacionadas aos pares 8 e 26, uma vez que os cromossomos invertidos possuem o mesmo tamanho dos respectivos cromossomos originais. Não foi encontrada a condição homozigota invertida, onde o par 8 seria constituído de dois acrocêntricos e o par 26 por 2 metacêntricos, o que pode estar relacionado ao tamanho amostral.

Um caso extremo de polimorfismo cromossômico foi descrito para *Ilyodon furcidens*, espécie que apresenta  $2n=48$  cromossomos, mas com uma variação clinal em relação ao número de cromossomos metacêntricos de 0 a 16 (TURNER et al., 1985). Nas espécies de peixes neotropicais não são freqüentes os casos de polimorfismos cromossômicos estruturais, com diferentes fórmulas cariotípicas intrapopulacionais. Entre os Characidae, variações envolvendo alguns poucos pares de cromossomos foram descritas em *Serrasalmus spilopleura* (NAKAYAMA; PORTO; FELDBERG, 2000; CENTOFANTE; PORTO; FELDBERG, 2002), *Astyanax altiparanae* (PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001) e *Bryconamericus aff. exodon* (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2002).

Os rearranjos cromossômicos que reduzem a fertilidade na condição heterozigota, como as inversões pericêntricas e translocações, podem ter um papel de destaque no processo de especiação pela redução do fluxo gênico (WHITE, 1968; LANDE, 1979). No entanto, se o rearranjo for uma barreira efetiva ao fluxo gênico, ele dificilmente seria fixado, a menos que ocorra uma distorção de segregação ou surja em uma população pequena, susceptível à deriva genética e ao

endocruzamento (LANDE, 1979; HEDRICK, 1981). Por outro lado, algumas inversões pericêntricas parecem não ter um efeito acentuado sobre a fertilidade do heterozigoto, podendo ser fixadas mais facilmente nas populações (ROBERTS, 1967; COYNE; AULARD; BERRY, 1991). Os rearranjos cromossômicos encontrados em *Ilyodon furcidens*, por exemplo, não se mostraram efetivos como mecanismo de isolamento reprodutivo (TURNER et al., 1985). Assim, após serem fixados, esses rearranjos podem proteger regiões do genoma coadaptadas a cada população, pela ausência de permutações, podendo contribuir para o desenvolvimento de um isolamento reprodutivo entre elas (ORTÍZ-BARRIENTOS et al., 2002).

De qualquer maneira, as inversões pericêntricas parecem ter desempenhado um papel fundamental na evolução cariotípica dos peixes, principalmente em grupos que possuem números diplóides conservados, como os Curimatidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Anostomidae, Prochilodontidae, mas que podem apresentar diferenças na fórmula cariotípica. Em *Astyanax scabripinnis* (Characidae), muitas populações locais conservam o mesmo número diplóide, mas são altamente diversificadas quanto à estrutura cariotípica (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991), indicando possíveis inversões pericêntricas associadas a essa diferenciação. Inversões pericêntricas foram também importantes na diferenciação morfológica de cromossomos sexuais, já que podem suprimir a recombinação entre os homólogos do par original no segmento invertido (BEÇAK et al., 1964; OGAWA; MURATA; MIZUNO, 1998; CARVALHO; OLIVEIRA; FORESTI, 2002; MCALLISTER, 2003).

Assim, como as inversões pericêntricas, é possível que as inversões paracêntricas tenham sido também de importância na diversificação cariotípica dos peixes. Embora esses rearranjos sejam mais difíceis de serem detectados com as

técnicas em uso na caracterização cromossômica em peixes, há alguns exemplos registrados no tocante aos sítios de rDNA. Em *Apareiodon piracicabae* e *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, uma inversão paracêntrica ocasionou a divisão do sítio original das Ag-NORs em dois sítios distintos no mesmo cromossomo (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1984; PORTO-FORESTI et al., 2004). Analogamente, em *Upsilonodus* sp, foi identificada uma inversão paracêntrica envolvendo sítios de rDNA 5S (KAVALCO et al., 2004).

Os dados citogenéticos em Cheirodontinae ainda são pouco representativos, considerando outros grupos de peixes já mais estudados. As poucas espécies já analisadas dessa subfamília apresentam um número diplóide conservado ( $2n=52$  cromossomos), embora com variações na sua fórmula cariotípica (WASKO et al., 2001). Assim sendo, esses dados evidenciam novamente o provável papel dos rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos, como as inversões pericêntricas, na evolução cariotípica desse grupo. No entanto, é necessário dados complementares sobre outros componentes dessa subfamília, para um melhor entendimento da sua evolução e relação entre seus gêneros e espécies.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato (CODEVASF, Três Marias, MG) pelo auxílio na coleta dos espécimes e MsC. Flávio C. T. Lima, pela identificação taxonômica. Esse trabalho foi apoiado pela FAPESP (Proc. 03/03642-1) e CNPq.

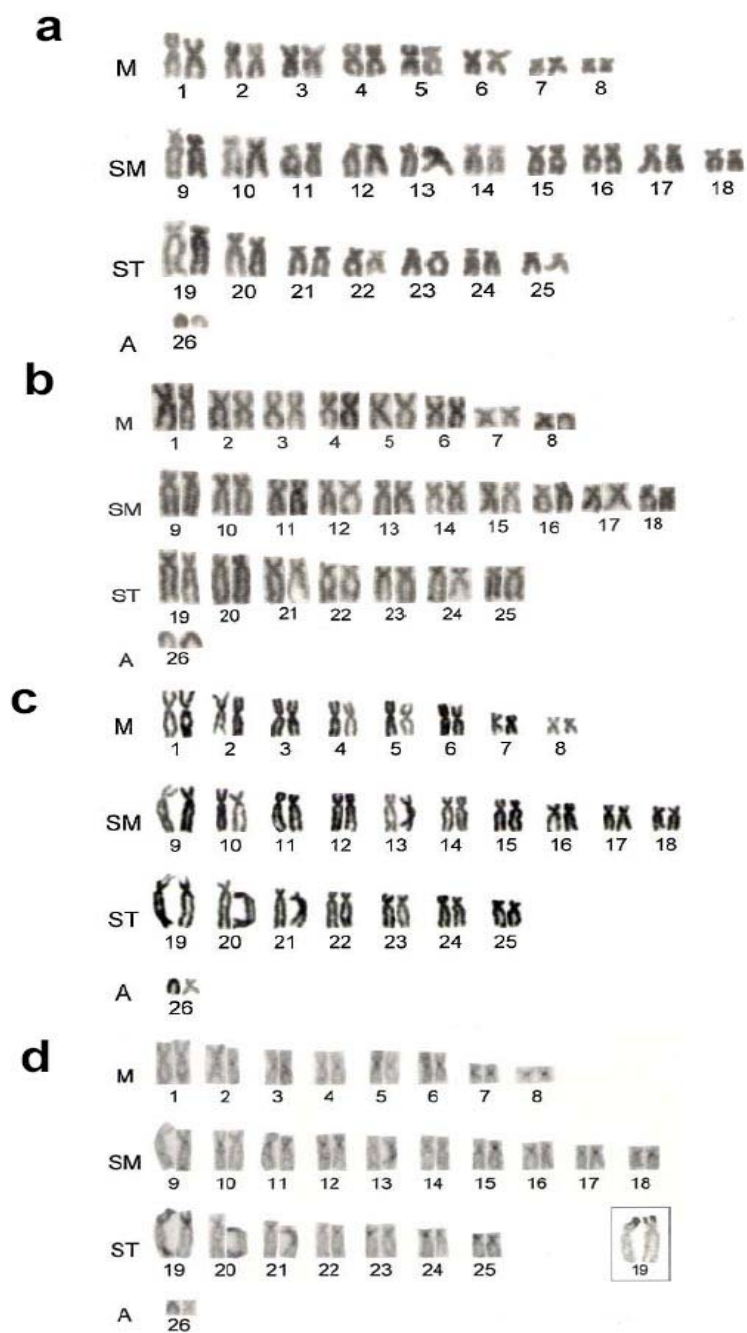


Figura 5 - Citótipos de *Serrapinnus heterodon*. Coloração convencional: (a) Citótipo A, (b) Citótipo B, (c) Citótipo C; (d) Bandamento C; (box) Ag-NOR.

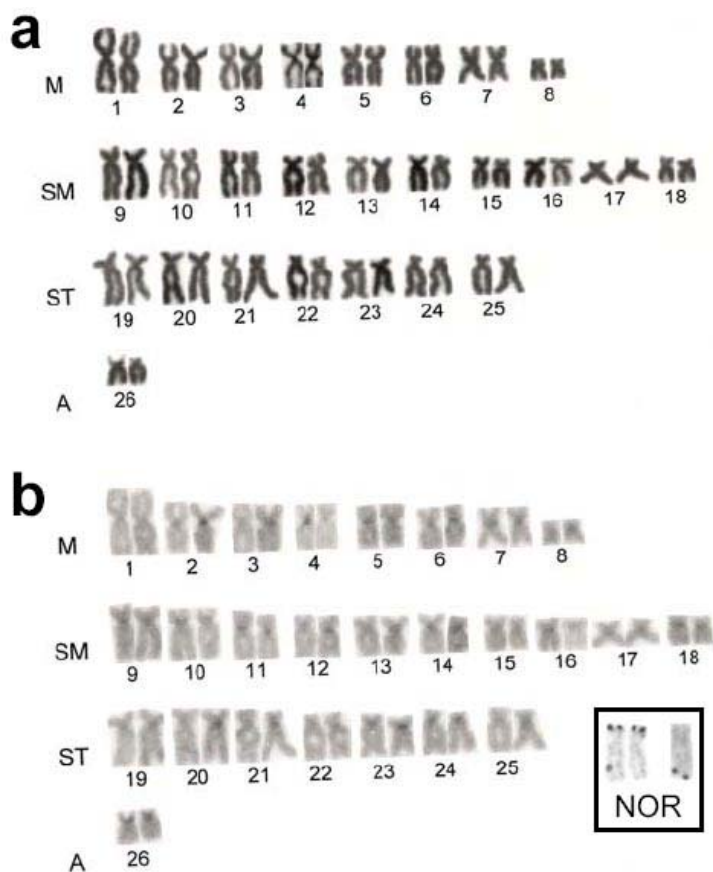


Figura 6 - Cariótipo de *Serrapinnus piaba*: (a) Coloração convencional, (d) Bandamento C, (box) coloração com nitrato de prata (Ag-NORs).

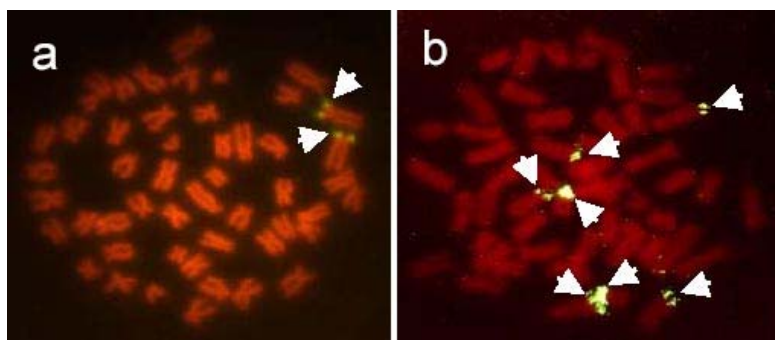


Figura 7 - Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de rDNA 18S. As setas indicam os sítios em: (a) *Serrapinnus heterodon* e (b) *S. piaba*.

#### 4.3. CAPÍTULO III

**Caracterização cariotípica de três espécies de Characidae da bacia do rio São Francisco (Teleostei, Characiformes)**

## **Caracterização cariotípica de três espécies de Characidae da bacia do rio São Francisco (Teleostei, Characiformes)**

Wellington Adriano Moreira Peres, Luiz Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira-Filho

### Resumo

Characidae é um dos grupos de peixes dominantes na região Neotropical e consiste de aproximadamente 30 subfamílias, altamente diversificadas e, provavelmente, não compreendendo um grupo monofilético. Paralelamente a essa diversidade de formas encontra-se uma ampla variedade citogenética. Nesse trabalho foram analisadas três espécies de Characidae provenientes da bacia do rio São Francisco (Três Marias, MG, Brasil). *Hasemania nana* apresentou  $2n=50$  com  $8M+42SM$ ; *Orthospinus franciscencis*  $2n=50$  com  $12M+30SM+2ST+6A$ ; e *Piabina argentea*  $2n=52$  com  $8M+14SM+16ST+10A$  e não foi observada diferença entre os sexos. A aplicação da técnica de bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos distribuídos preferencialmente na região centromérica. As Ag-NORs foram localizadas em somente um par cromossômico nas três espécies.

Palavras chave: *Hasemania nana*, *Orthospinus franciscencis*, *Piabina argentea*, Cariótipo.

## Introdução

No início do século passado, quando foi descrita grande parte das subfamílias de Characidae, os taxonomistas se baseavam mais nas similaridades globais entre as espécies, do que na origem de cada caráter. Assim, características não apomórficas foram tomadas para definir vários grupos. Tetragonopterinae, por exemplo, era considerada a mais especiosa e diversificada de todas as subfamílias (GÉRY 1977; BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). No entanto, pela carência de dados que suportariam sua origem monofilética (WEITZMAN; MALABARBA, 1998), foi recentemente proposto que a subfamília Tetragonopterinae seja representada apenas pelo gênero *Tetragonopterus* (REIS, 2003). Já os demais gêneros foram listados como “*Incertae Sedis*” em Characidae (LIMA et al., 2003) entre eles *Piabina* e *Hasemanina*.

O gênero *Piabina* é composto por peixes de pequeno porte (podendo atingir 70 mm) de corpo alongado, com dentes do pré-maxilar dispostos em três séries na região mediana, linha lateral completa e nadadeira anal curta com 20 a 24 raios (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). *P. argentea* é a única espécie do gênero encontrada na bacia do rio São Francisco. *Hasemanina* também é composta por peixes de pequeno porte e geralmente não ultrapassam 27 mm. A espécie *H. nana* é endêmica na bacia do rio São Francisco (LIMA et al., 2003).

Por outro lado, a subfamília Stethaprioninae, formada pelos gêneros *Brachychalcinus*, *Orthospinus*, *Poptela* e *Stethaprion* é considerada monofilética. O monofiletismo desse grupo é postulado com base na presença de um espinho pré-dorsal bem desenvolvido e ganchos modificados na nadadeira anal (REIS, 1989). Dentre esses gênero, *Orthospinus* é endêmico da bacia do São Francisco e inclui somente *O. franciscensis* (REIS, 1989).



Os estudos do cariótipo podem tornar-se uma fonte importante de informações para a taxonomia e para o entendimento das relações filogenéticas entre as espécies, uma vez que mostram grande diversidade (OLIVEIRA et al., 1988; AREFJEV 1990a; GALETTI JR.; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1994, entre outros).

Nesse trabalho foram analisadas citogeneticamente 3 espécies de Characidae, sendo utilizadas diferentes metodologias na tentativa de buscar marcadores cromossômicos que pudessem servir como um auxílio à taxonomia e a compreensão das relações filogenéticas desse grupo.

#### Material e Métodos

As espécies *Piabina argentea* (15 machos e 16 fêmeas), *Hasemania nana* (oito machos e nove fêmeas) e *Orthospinus franciscencis* (10 machos e 17 fêmeas) foram coletadas em uma pequena lagoa às margens do rio São Francisco (Três Marias, MG, Brasil). Os peixes foram identificados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, com os registros MZUSP 86912; MZUSP 86917 e MZUSP 86913, respectivamente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim, por meio de preparação direta, de acordo com Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). A análise da heterocromatina constitutiva (banda-C) e das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) seguiram as metodologias de Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com poucas adaptações. A mesma metáfase foi analisada seqüencialmente na coloração convencional com Giemsa, bandamento C e coloração com nitrato de prata.

Os cromossomos foram classificados como metacênticos (M), submetacêntricos (SM), subtlocêntricos ou acrocêntricos (A), de acordo com a razão dos braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964). Para a determinação do

número fundamental (NF) (número de braços dos cromossomos) foram considerados cromossomos M, SM e ST com 2 braços e A com 1 braço.

## Resultados

*Piabina argentea* apresentou um número diplóide modal de  $2n=52$  cromossomos em ambos machos e fêmeas, com  $8M+14SM+16ST+14A$  e  $NF=90$  (Figura 8a) e não foi observada diferença na morfologia dos cromossomos entre os sexos. A heterocromatina constitutiva foi observada em poucos cromossomos na região pericentromérica (Figura 8b). As Ag-NORs foram evidenciadas em posição telomérica do braço curto do par acrocêntrico 20, coincidindo com uma região heterocromática (Figura 8 - box).

*Hasenamia nana* apresentou um número diplóide modal de  $2n=50$  cromossomos em ambos os sexos, com  $8M+42SM$  e número fundamental,  $NF=100$  (Figura 9a). A heterocromatina constitutiva foi observada em poucos cromossomos na região pericentromérica (Figura 9b). As Ag-NORs foram observadas em posição terminal do braço curto do par submetacêntrico 7, adjacente a um segmento heterocromático (Figura 9 - box).

*Orthospinus franciscensis* apresentou um número diplóide modal de  $2n=50$  cromossomos, com  $12M+30SM+2ST+6A$  e  $NF=94$  (Figura 10a) e não foi observada diferença na morfologia dos cromossomos entre os sexos. A heterocromatina constitutiva foi observada em poucos cromossomos na região centromérica e na região distal do braço curto do pares submetacêntrico 20 e subtlocêntrico 22 (Figura 10b). As Ag-NORs também foram localizadas em posição distal no braço curto do par subtlocêntrico 22 (Figura 10 - box), coincidido com a região heterocromática detectada nesse par de cromossomos.

## Discussão

Foi evidenciado número diplóide  $2n=50$  cromossomos em *H. nana* e *O. franciscensis* e  $2n=52$  cromossomos em *P. argentea* concordando com estudos anteriores nessas espécies (AREFJEV, 1990b, citado como *H. marginata*; PFISTER; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1997; PORTELA; GALETTI JR.; BERTOLLO, 1988). No entanto, as constituições cariotípicas se mostraram divergentes, principalmente em *H. nana*. Nessa espécie, Arefjev (1990b), encontrou todas as quatro classes cromossômicas (12M+18SM+10ST+10A). Por outro lado, identificamos apenas cromossomos do tipo M/SM. Essa variação pode se explicada por duas hipóteses; em primeiro lugar podemos supor que se tratam de espécies distintas já que o referido trabalho não especifica o local de coleta. Em segundo lugar, poderíamos admitir a diferença de pelo menos 13 inversões pericêntricas de uma população para outra, o que é menos provável. Embora a constituição cariotípica observada para *O. franciscensis* e *P. argentea* diferiu daquela descrita por Pfister, Moreira-Filho e Bertollo, (1997) e por Portela, Galetti Jr. e Bertollo (1988), para essas espécies, as diferenças são mais sutis e podem ser atribuídas à dificuldade de se caracterizar com precisão a morfologia de alguns cromossomos, cujas razões de braços encontram muito próximas do limite das classes cromossômicas estabelecidas por Levan, Fredga e Sandberg, (1964).

O bandamento C tem sido amplamente utilizado em estudos citogenéticos em peixes (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1996; MARGARIDO; GALETTI JR., 1999; MANTOVANI et al., 2004; entre outros). Nesse trabalho descrevemos pela primeira vez a distribuição de banda C em *P. argentea* e *H. nana*. Nas três espécies analisadas foram observados blocos de banda C positivos principalmente em posição pericentromérica. Em *O. franciscensis* foi observado também marcações

terminais corroborando estudos anteriores (PFISTER; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1997). Mudanças na distribuição de heterocromatina parece ter desempenhado um papel importante na diversificação cromossômica dos peixes. As populações de *Astyanax scabripinnis*, por exemplo, podem ser caracterizadas pelo padrão de distribuição de heterocromatina apresentado por cada uma (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Algumas dessas populações apresentam grandes blocos nas regiões terminais dos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, o que entretanto não ocorre em outras populações dessa espécie (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996; MANTOVANI et al., 2000; SOUZA et al., 2001; MANTOVANI et al., 2004 entre outros).

O segmento Ag-NOR do par subtelocêntrico 22 de *O. franciscensis* e do par acrocêntrico 20 de *P. argentea* foram também heterocromáticos. Já em *H. nana* foi evidenciada heterocromatina adjacente a NOR no par submetacêntrico 7. Entre os peixes, uma correspondência entre Ag-NORs e sítios banda C positivos é relativamente comum (GALETTI JR.; RASH 1993; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996) a presença da heterocromatina na região de Ag-NORs poderia facilitar os rearranjos cromossômicos nestas regiões (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1984).

Algumas subfamílias de Characidae podem ser caracterizadas por apresentarem NOR simples, como Bryconinae (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1996; MARGARIDO; GALETTI JR., 1996) ou múltiplas como Serrasalminae (GALETTI JR.; SILVA; CERMINARO, 1985). Já outros grupos podem apresentar tanto NORs simples quanto múltiplas como verificado em *Astyanax*. Para esse gênero tem sido descrito Ag-NORs simples ou múltiplas com até 15 cromossomos marcados (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993), um dos maiores números já

descritos em Characidae. Assim, o número e a localização das Ag-NORs tem mostrado ampla variabilidade nesse grupo. As três espécies ora analisadas apresentaram um sistema de Ag-NOR simples. No entanto, a localização dos sítios das NORs pela coloração com nitrato de prata não pode ser considerada definitiva, uma vez que só identifica os sítios que estiveram funcionalmente ativos na interfase anterior (MILLER et al., 1976). Pfister, Moreira-Filho e Bertollo (1997) descreveram Ag-NORs simples em *O. franciscensis* o que corrobora com o atual estudo. Por outro lado, a população de *P. argentea* analisada por Portela, Galetti Jr. e Bertollo (1988) apresentou Ag-NORs múltiplas com três cromossomos marcados pelo nitrato de Prata, o que pode indicar a presença de outros sítios de NORs nessa espécie.

Reis 1989, considerou Stethaprioninae um grupo relacionado a Tetragonopterinae e a Serrasalminae. Entretanto, os dados citogenéticos descritos sugerem uma maior proximidade de Stethaprioninae com espécies anteriormente agrupadas em Tetragonopterinae. Nesses dois grupos podemos encontrar espécies com número diplóide  $2n=50$  cromossomos, Ag-NORs simples e a presença de um cromossomo metacêntrico bem maior que os demais do complemento (SCHEEL, 1973). Por outro lado, as espécies de Serrasalminae possuem número diplóide variando de  $2n=54$  a  $2n=64$ , Ag-NORs múltiplas e não apresentam o cromossomo metacêntrico marcador.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato (CODEVASF, Três Marias, MG) pelo auxílio na coleta dos espécimes e MsC. Flávio C. T. Lima, pela identificação taxonômica. Esse trabalho foi apoiado pela FAPESP (Proc. 03/03642-1) e CNPq.

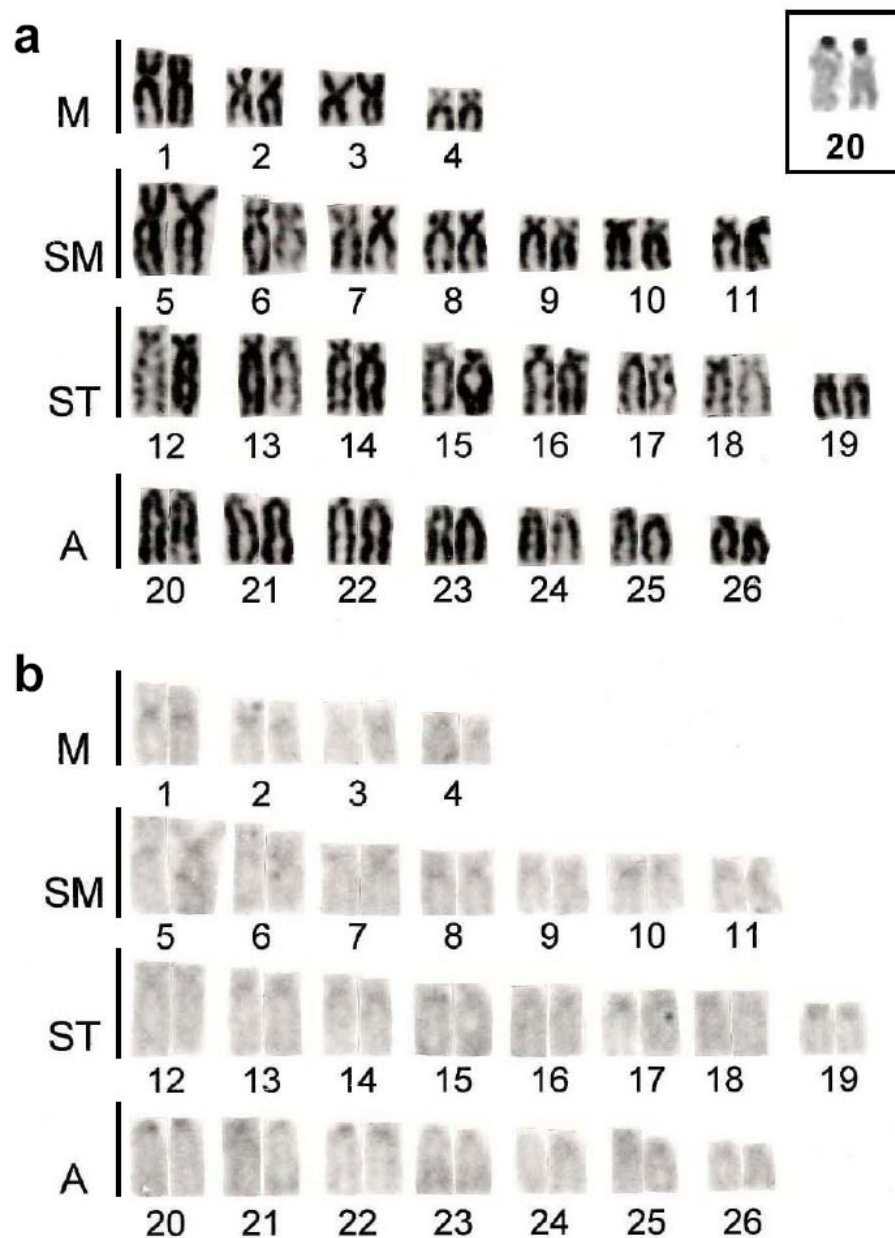


Figura 8 - Cariótipo seqüencial de *Piabina argentea*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.

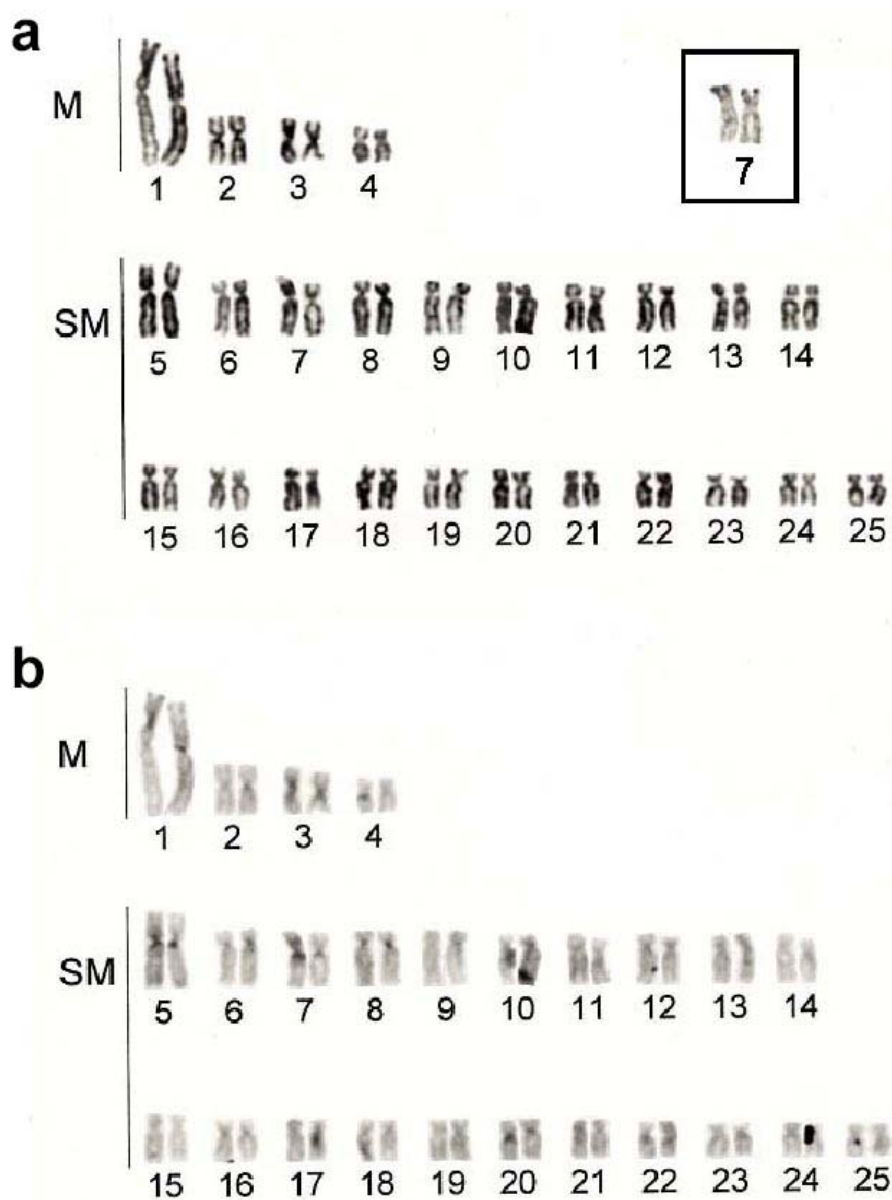
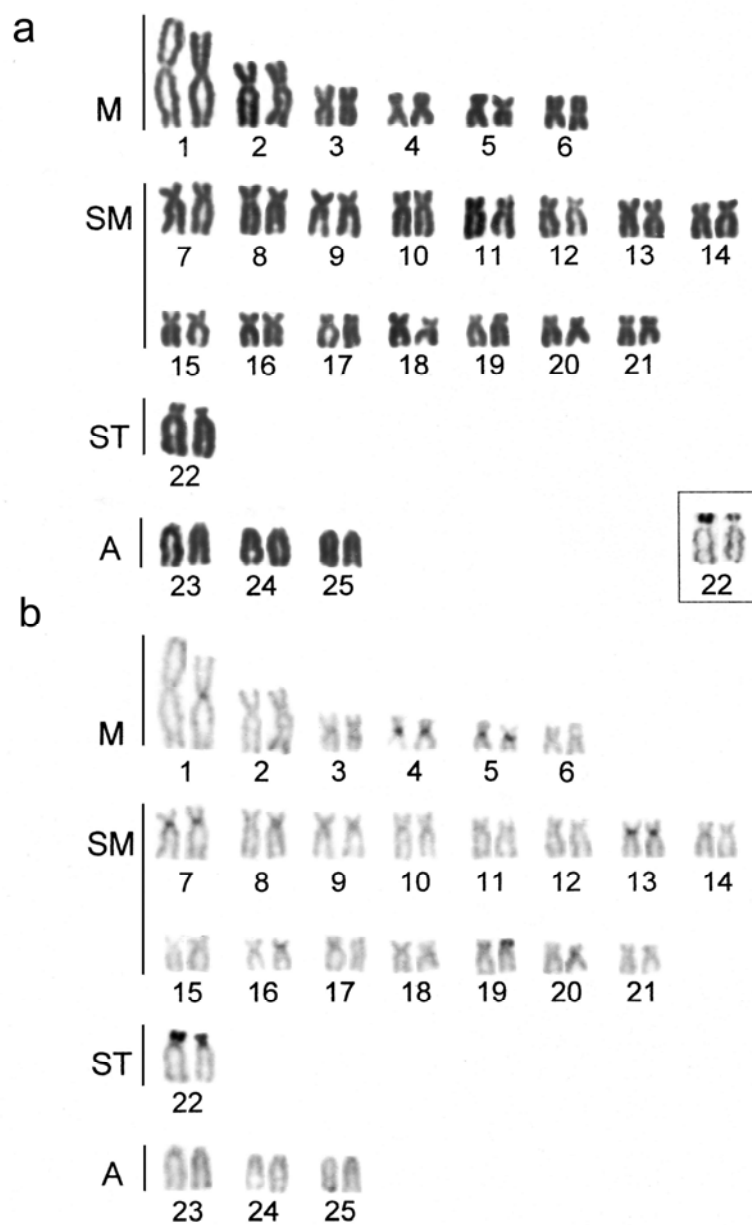


Figura 9 - Cariótipo seqüencial de *Hasemania nana*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.



**Figura 10 - Cariótipo seqüencial de *Orthospinus franciscensis*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.**



#### 4.4. CAPÍTULO IV

**Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae)**

## **Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**

Wellington Adriano Moreira Peres e Orlando Moreira Filho

### Resumo

O gênero *Astyanax* é encontrado em praticamente todos os ambientes de água doce da região Neotropical e apresentam similaridades morfológicas que dificultam a identificação taxonômica. Por outro lado, tem sido observada ampla variedade quanto às características citogenéticas, o que constitui uma importante ferramenta no auxílio a taxonomia. Nesse trabalho foram analisadas as espécies *Astyanax lacustris*, *A. scabripinnis* e *A. altiparanae*. O número diplóide  $2n=50$  foi compartilhado pelas três espécies. No entanto, para cada uma das três, foi observada uma fórmula cariotípica distinta. A distribuição e tamanho dos blocos de heterocromatina também foram característicos para cada espécie. *A. lacustris* e *A. altiparanae* não apresentaram diferenças quanto à localização das NORs, as quais foram evidenciadas em apenas um par de cromossomos tanto pela técnica coloração com prata quanto pela FISH com sonda de rDNA 18S. *A. scabripinnis* também apresentou Ag-NOR simples. Entretanto, foram evidenciados cinco cromossomos portadores de sítios de rDNA 18S. A evolução da macroestrutura cariotípica dessas espécies segue um padrão geral para o gênero *Astyanax*. O predomínio do número diplóide  $2n=50$  com diferentes formas cariotípicas demonstra o papel das inversões pericêntricas na evolução cariotípica desse grupo.

Palavras chave: Characidae, cariótipo, FISH, 18S, 5S

## Introdução

O gênero *Astyanax* é um dos táxons de peixes de água doce mais amplamente distribuído nas Américas. Sua distribuição vai desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (BRITSKI, 1972) sendo dominante na América do Sul (GÉRY, 1977). Para Eigenmann (1921), esse gênero possui 74 espécies e subespécies. Já Garutti e Britsky (2000) consideraram aproximadamente 100 espécies nominais. Além do número impreciso é provável que muitas espécies ainda estejam para serem descritas, pois a similaridade morfológica e as definições taxonômicas pouco detalhadas dificultam sua identificação (MELO, 2001).

Um conjunto de pelo menos 15 espécies de *Astyanax* apresentam uma mancha umeral negra, horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos. Esse conjunto de espécies foi definido por Garutti (1998), como grupo *bimaculatus*, por ser o padrão de coloração mais comumente referido para *A. bimaculatus* (LINNAEUS, 1758). No entanto, o nome *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758) por enquanto só poderá ser aplicado a exemplares do Suriname, provável localidade tipo (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Recentemente, uma espécie desse grupo de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná, anteriormente identificada como *A. bimaculatus*, foi renomeada passando a se chamar *A. altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000). A espécie do grupo *bimaculatus* do rio São Francisco, *A. lacustris*, embora tenha o mesmo padrão de colorido de *A. altiparanae* no flanco, dela difere por outros caracteres, tais como alturas aproximadamente iguais das porções acima e abaixo da linha horizontal que passa pela fenda bucal, dentes grandes com penta- e hexacúspides e menor número de dentes pequenos no dentário (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Por sua vez, *Astyanax scabripinnis* também parece não representar uma unidade taxonômica e tem sido referido como um complexo de espécies por apresentar distintos padrões morfológicos e citogenéticos entre populações de diferentes bacias hidrográficas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

Estudos citogenéticos têm demonstrado que o gênero *Astyanax* possui ampla variabilidade cariotípica entre as espécies, incluindo variação no número diplóide, de  $2n=36$  em *A. schubarti* (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983) a  $2n=50$ , na maioria das espécies analisadas, variação quanto ao número e posicionamento das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e da heterocromatina constitutiva (SOUZA; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1995; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; DANIEL-SILVA, 2001; SOUZA et al., 2001; PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001; MANTOVANI et al., 2004). Há também ocorrência de cromossomos B com diferentes morfologias, freqüências, tamanhos e números (MOREIRA-FILHO et al., 2001) e casos de triploidia natural (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983; FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994; MAISTRO et al., 1994).

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente espécimes de *A. lacustris*, *A. altiparanae* e *A. scabripinnis*, buscando marcadores cromossômicos que auxiliem nos estudos das relações entre essas espécies.

## Material e Métodos

Foram analisados 32 indivíduos, 17 machos e 15 fêmeas, de *A. lacustris* e 24 indivíduos, 13 machos e 11 fêmeas, de *A. scabripinnis* provenientes do rio São Francisco (Três Marias-MG, Brasil) e sete indivíduos, três machos e quatro fêmeas, de *A. altiparanae* do córrego Monjolinho (São Carlos-SP, Brasil). Os peixes foram

identificados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, MZUSP 86918, 86914 e 86919, respectivamente.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim por meio da técnica de preparação direta de acordo com Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho, (1978). A análise da heterocromatina constitutiva (banda C) e das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) seguiram as metodologias descritas por Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com poucas adaptações. A mesma metáfase foi analisada seqüencialmente na coloração convencional em Geimsa, banda C e coloração com nitrato de prata (Ag-NORs). A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foram mapeadas usando hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL, STRAUME, GRAY, 1986), com sondas obtidas de *Prochilodus lineatus* (HATANAKA; GALETTI JR., 2004) e *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JR., 2001), respectivamente.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), de acordo com a razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico. Para a determinação do número fundamental (NF) (número de braço dos cromossomos) foram considerados cromossomos M, SM e ST com 2 braços e A com 1 braço.

## Resultados

*A. lacustris* apresentou número diplóide de  $2n=50$  cromossomos correspondendo a  $8M+20SM+16ST+6A$ ,  $NF=94$  (Figura 11a) com heterocromatina constitutiva distribuída em posição centromérica e pericentromérica equidistante ao centrômero em alguns cromossomos do complemento (Figura 11b). As Ag-NORs (Figura 11 box) e o os sítios de rDNA 18S (Figura 14a), foram localizadas no par

cromossômico 15, subtelocêntrico, em quase a totalidade do braço curto. O sítio ribossomal 5S foi localizado na região pericentromérica do par metacêntrico número dois (Figura 14d).

*A. altiparanae* apresentou  $2n=50$  cromossomos, correspondendo a  $8M+20SM+12ST+10A$ ,  $NF=90$  (Figura 12a). Nessa espécie foram observados pequenos blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas e pericentromérica equidistante ao centrômero de alguns cromossomos e no braço curto do par subtelocêntrico 15 (Figura 12b). As Ag-NORs (Figura 12 - box) e os rDNA 18S (Figura 14b) foram localizados na região terminal do braço curto do par cromossômico 15 e o sítio ribossomal 5S foi localizado na região pericentromérica do terceiro par de cromossomos metacêntricos (Figura 14e).

*A. scabripinnis* apresentou número diplóide de  $2n=50$  cromossomos correspondendo a  $12M+24SM+8ST+6A$ ,  $NF=94$  (Figura 13a). Foi observado em alguns poucos cromossomos heterocromatina na região pericentromérica (Figura 13b). As Ag-NORs também foram evidenciadas no par 22 (Figura 13 box), coincidente com a heterocromatina. Além do par 22, a FISH evidenciou mais 3 cromossomos portadores de rDNA 18S (Figura 14c). Foram localizados na região terminal do braço longo de um par subtelocêntrico e do braço curto de um único cromossomo acrocêntrico. O sítio ribossomal 5S foi localizado na região pericentromérica de um par metacêntrico e de um subtelocêntrico (Figura 14f).

## Discussão

O número diplóide  $2n=50$ , observado nas três espécies, é predominante entre os *Astyanax* e parece representar uma condição plesiomórfica para esse gênero. Embora a constituição cariotípica observada para *A. lacustris* diferiu daquela descrita por Paganelli (1990), para essa espécie ( $6M+26SM+12ST+6A$ ), tal diferença pode

ser atribuída à dificuldade de se caracterizar com precisão a morfologia de alguns cromossomos, cujas razões de braços encontram-se muito próximas do limite das classes cromossômicas estabelecidas por Levan, Fredga e Sandberg, (1964). Por sua vez, as populações de *A. scabripinnis* e *A. altiparanae* tem mostrado uma ampla variabilidade cariotípica. Em *A. scabripinnis* tem sido descrito variações estruturais e numéricas (para uma revisão ver KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), além da presença de cromossomos supranumerários (para uma revisão ver MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004). Já em *A. altiparanae* observa-se somente variações estruturais (JIN; TOLEDO, 1975; MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983; PAGANELLI, 1990; ALBERDI; FENOCCHIO, 1997; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2001, esses citados como *A. bimaculatus*; PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001; DANIEL-SILVA, 2001), sendo o número diplóide  $2n=50$  conservado.

De fato, o gênero *Astyanax* apresenta ampla variabilidade cariotípica, prevalecendo o número  $2n=50$  cromossomos, o que evidencia o papel das inversões pericêntricas na evolução cariotípica deste gênero. Outro padrão predominante em *Astyanax* é o de cromossomos com dois braços (M, SM e ST), comparativamente ao número de cromossomos com um único braço (A), o que é refletido nos altos valores dos números fundamentais ( $n^\circ$  de braços) desse grupo de peixes. A quantidade de cromossomos de dois braços no gênero *Astyanax* varia de 28% em *A. scabripinnis* (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993) a 96% em *A. fasciatus* (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1983), constituindo aproximadamente 76% dos cromossomos dos cariótipos descritos para esse táxon. Portela, Galetti Jr. e Bertollo (1988) sugerem que o cariótipo ancestral de Characidae poderia ser constituído por

50 cromossomos M-SM, semelhante ao encontrado em *Moenkhausia intermedia* e *M. costae*.

A heterocromatina pode também estar envolvida na diferenciação cromossômica do gênero *Astyanax* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; MANTOVANI et al., 2000). O padrão geral de distribuição de banda C foi muito semelhante entre *A. lacustris* e *A. altiparanae*, observada principalmente na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos. No entanto, é possível observar blocos heterocromáticos maiores nas regiões centroméricas de *A. lacustris*, comparativamente ao que ocorre em *A. altiparanae*. Além disso, o braço curto do par subtelocêntrico número 15, portador da NOR, apresenta-se heterocromático em *A. altiparanae*, o que não ocorre em *A. lacustris*, representando um caráter facilmente identificável para a distinção dessas espécies. A ocorrência de blocos banda C positivos na região distal de alguns cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos é uma característica comumente encontrada nas populações de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996; MANTOVANI et al., 2000; SOUZA et al., 2001; MANTOVANI et al., 2004). Entretanto, a população de *A. scabripinnis* ora analisada apresentou somente fracas marcações pericentroméricas, reforçando o papel da heterocromatina na diferenciação cromossômica dessa espécie.

Em *A. lacustris* e *A. altiparane*, as Ag-NORs, assim como os sítios de rDNA 18S, situam-se no braço curto do par subtelocêntrico número 15, caracterizando um sistema de NORs simples. Entretanto, Almeida-Toledo et al., (2002) através da FISH com sonda de rDNA, encontram dois sítios de rDNA 28S, nessas duas espécies. Ag-NORs múltiplas também tem sido relatadas em diferentes populações de *A. altiparanae* (ALBERDI; FENOCCHIO, 1997; PACHECO; GIULIANO-CAETANO;



DIAS, 2001). A ocorrência de NORs múltiplas corresponde à uma característica comum para *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; ROCONSTANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993, entre outros). Na população ora analisada foram evidenciados cinco cromossomos portadores de rDNA 18S. Por outro lado, somente o par 22 foi Ag-NOR positivo sugerindo que os demais sítios sejam regiões inativas, já que a técnica de coloração pela prata detecta somente os genes funcionais da interfase anterior a mitose (MILLER et al., 1976). O segmento Ag-NOR de *A. scabripinnis* e de *A. altiparanae* apresentaram heterocromatina evidenciada pela técnica de bandamento C o que indica uma associação entre o sítio Ag-NOR com heterocromatina o que é comum entre os peixes (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1984; GALETTI JR.; RASH, 1993; GALETTI JR.; MESTRINER; MONACO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR, 1996).

Os sítios de rDNA 5S foram observados na mesma posição em *A. lacustris* e *A. altiparanae*, situados na região pericentromérica, mas em pares diferentes. A presença de um *locus* 5S pericentromérico em um par metacêntrico médio tem sido referida como conservada no gênero *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004). De fato, essa característica foi compartilhada pelas três espécies ora analisadas. Por outro lado, esse gênero tem apresentado variação quanto ao número e a localização dos *loci* 5S (FERRO et al., 2001; KAVALCO et al., 2004). Seis espécies de *Astyanax* de diferentes bacias hidrográficas apresentaram um locus de rDNA 18S sintênico com 5S em um par metacêntrico médio (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002). No entanto, tal característica não foi observada nas espécies ora analisadas, uma vez que os sítios de rDNA 18S não foram evidenciados em nenhum cromossomo metacêntrico.

Os resultados obtidos mostram que as duas espécies *A. lacustris* e *A. altiparanae*, são estreitamente relacionadas, pondo em evidencia sua proximidade evolutiva. Assim, similaridades cromossômicas reforçam a pertença dessas duas espécies ao grupo *bimaculatus* conforme proposto por Garruti, (1998). Por outro lado, *A. scabripinnis* apresentou diferenciações que novamente reforçam a diversidade presente nesse grupo de espécies.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato (CODEVASF, Três Marias, MG) pelo auxílio na coleta dos espécimes e MsC. Flávio C. T. Lima, pela identificação taxonômica. Esse trabalho foi apoiado pela FAPESP (Proc. 03/03642-1) e CNPq.

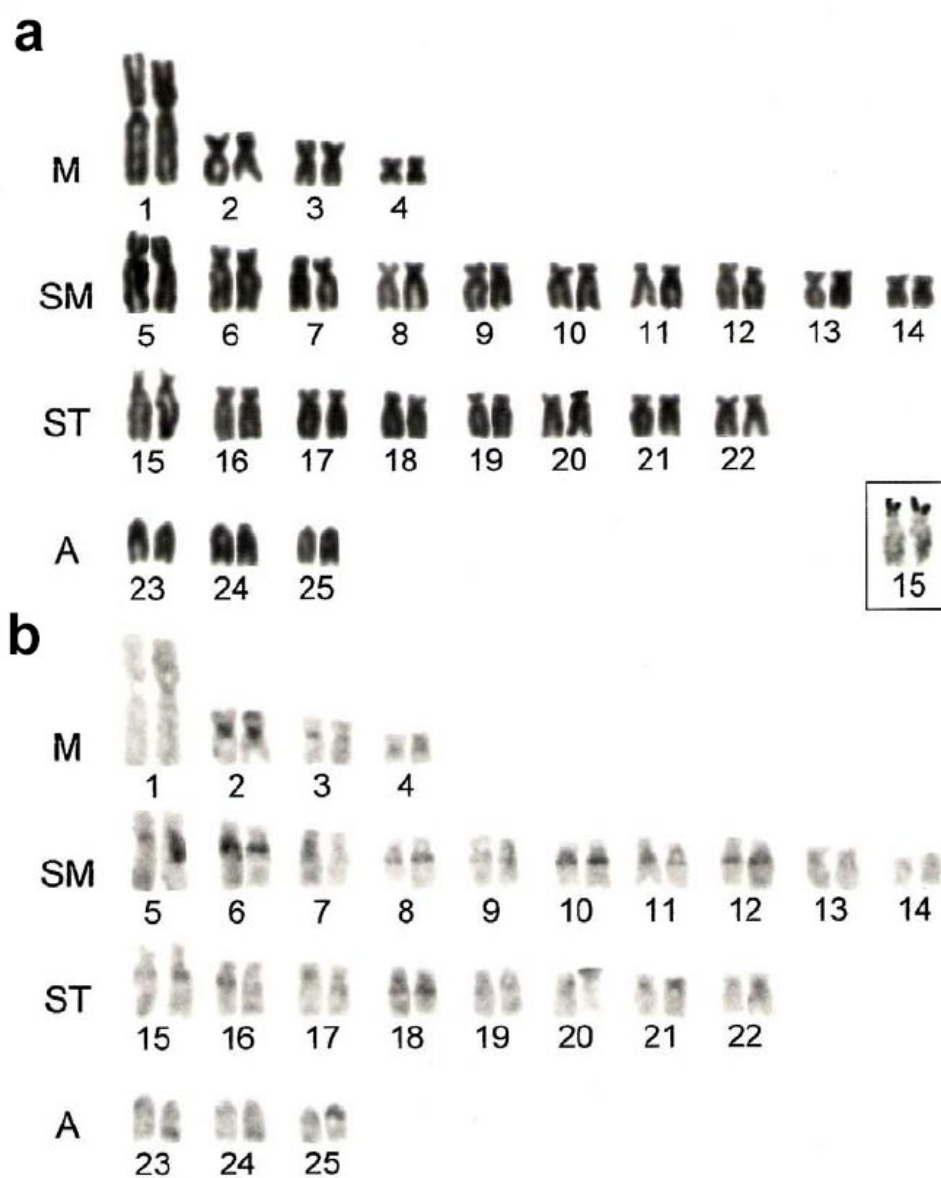


Figura 11 - Cariótipo seqüencial de *Astyanax lacustris*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.

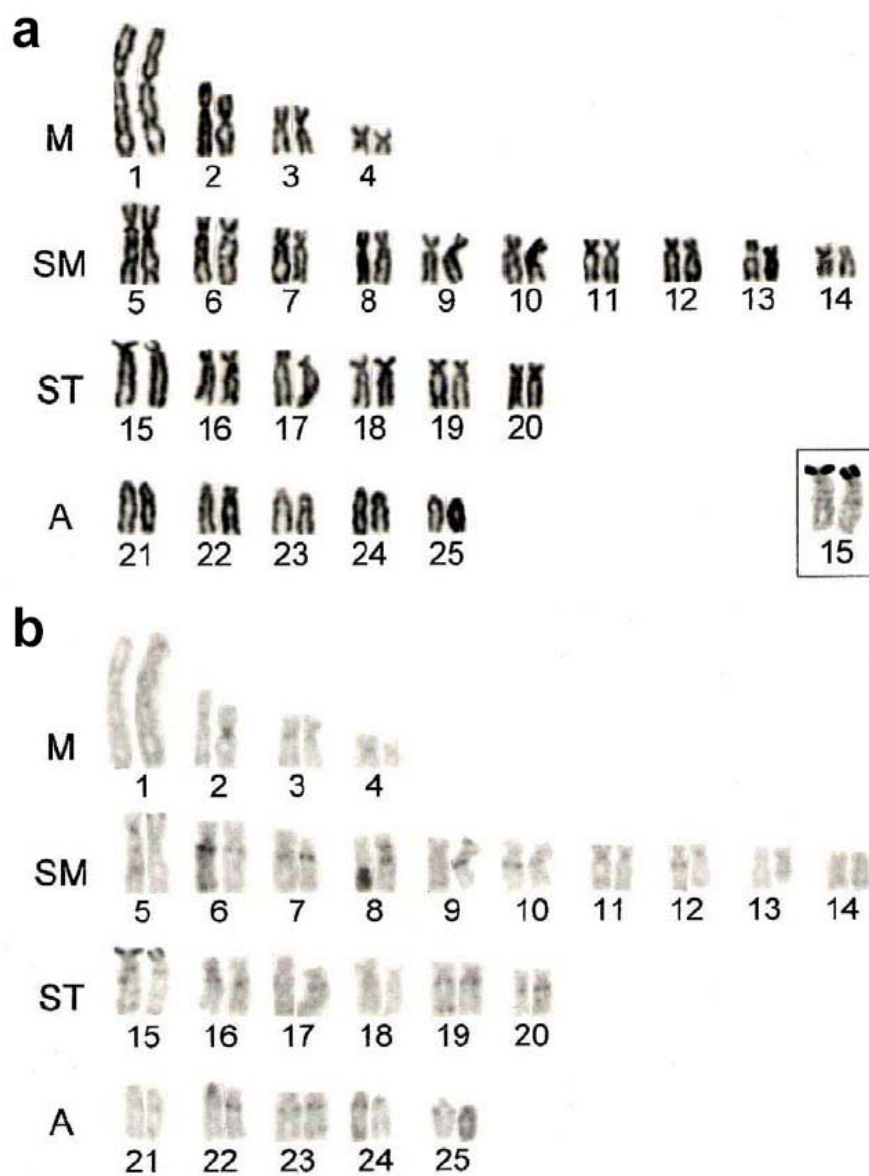


Figura 12 - Cariótipo seqüencial de *Astyanax altiparanae*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.

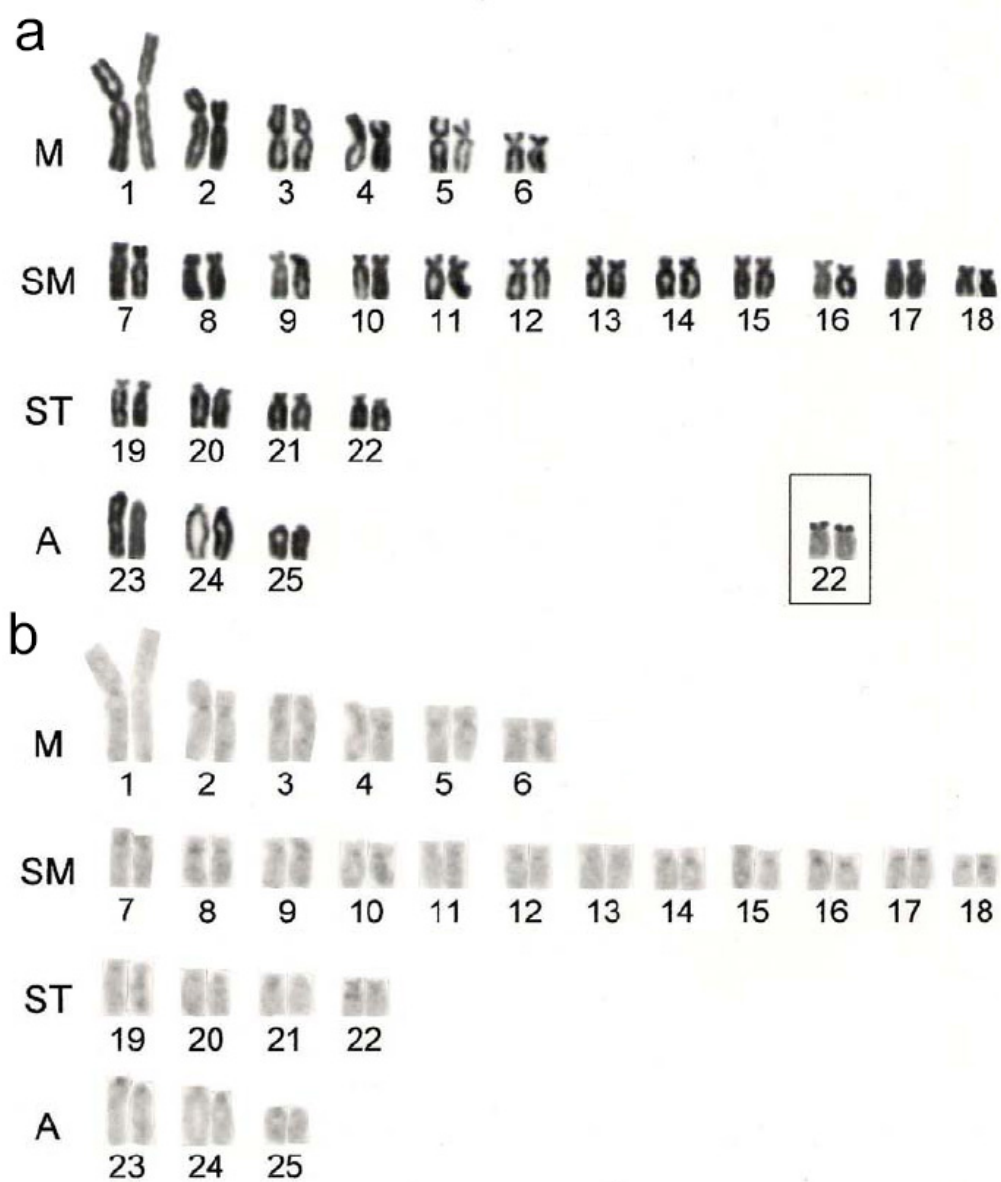


Figura 13 - Cariótipo seqüencial de *Astyanax scabripinnis*: (a) Coloração convencional, (b) Banda C, (box) Ag-NOR.

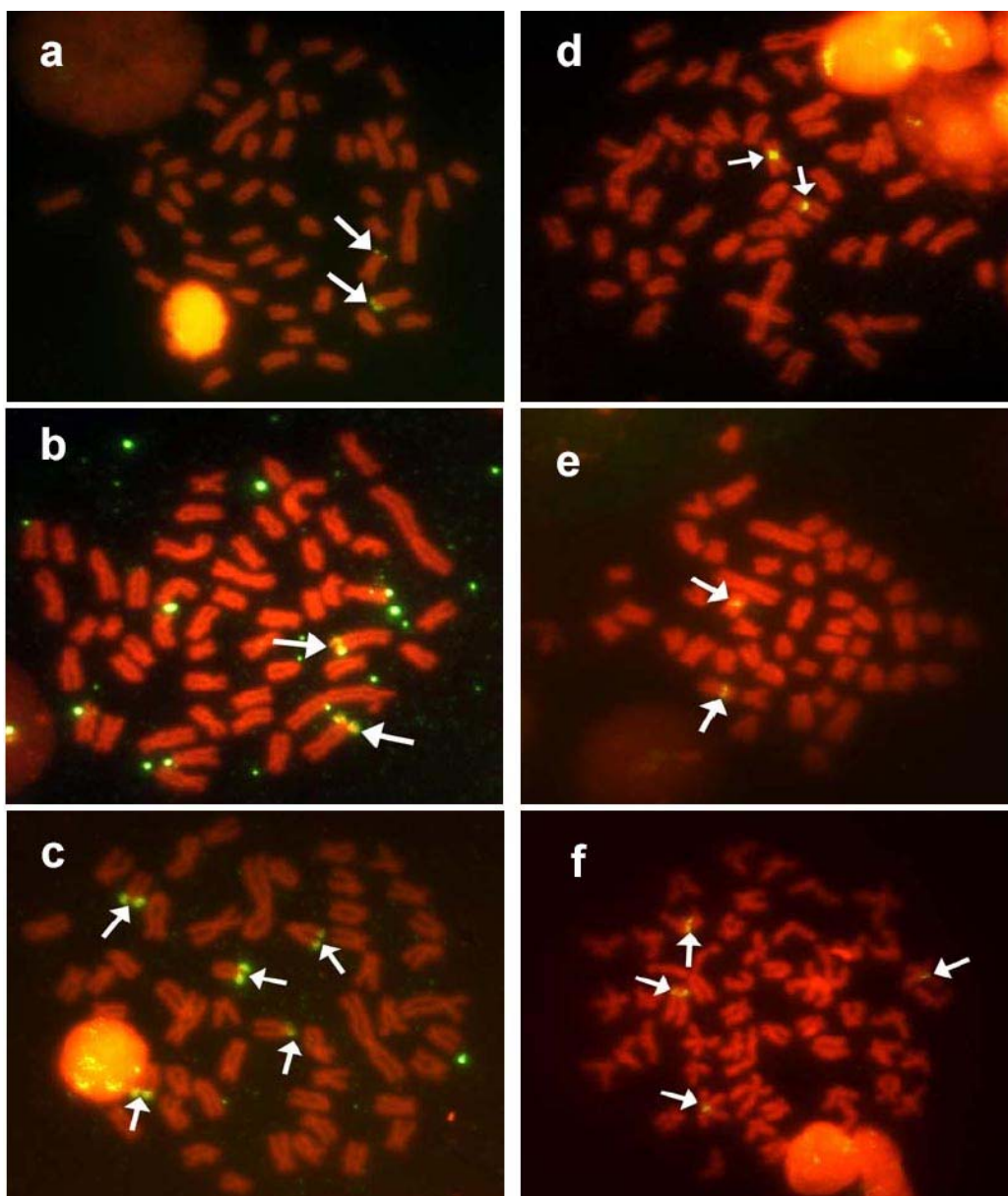


Figura 14 – Hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Localização dos sítios de rDNA 18S: (a) *Astyanax lacustris*, (b) *A. altiparanae*, (c) *A. scabripinnis*. Localização dos sítios de rDNA 5S: (d) *A. lacustris*, (e) *A. altiparanae*, (f) *A. scabripinnis*.

#### 4.5. CAPÍTULO V

**Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em nove espécies da família Characidae (Teleostei, Characiformes)**

## **Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em nove espécies da família Characidae (Teleostei, Characiformes)**

Wellington Adriano Moreira Peres, Luiz Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira Filho

### Resumo

A família Characidae, uma das maiores e mais diversificadas da região neotropical, certamente não constitui um grupo monofilético. Os dados citogenéticos para esse grupo também mostram ampla variabilidade. Nesse sentido, a citogenética pode fornecer informações importantes para uma melhor compreensão das relações entre as espécies dessa família. Nesse trabalho foram usadas sondas de rDNA 18S e 5S para as análises citogenéticas em células de diferentes espécies de Characidae provenientes da bacia do rio São Francisco (*Astyanax lacustris*, *A. scabripinnis*, *Hasemania nana*, *Piabina argentea*, *Orthospinus franciscensis*, *Serrapinnus heterodon*, *S. piaba* e *Myleus micans*) e da bacia do Alto Paraná (*A. altiparanae*). Foram identificados sistemas de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) simples e múltiplas, com até 10 marcações. Essas espécies também apresentaram diferentes números de sítios de 5S, variando de um a quatro *loci*. A técnica utilizada com FISH com sondas de rDNA 5S e 18S mostrou-se uma ótima ferramenta para a identificação e caracterização citogenética dessas espécies.

Palavras chave: Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH), rDNA 18S, rDNA 5S, Characidae.



## Introdução

Nos organismos eucariontes os genes ribossomais são organizados em duas famílias multigênicas distintas, uma constituída pelo rDNA 45S e outra pelo rDNA 5S. As unidades de repetição do rDNA 45S são separadas por espaçadores externos não-transcritos e são compostas pelos genes 18S, 5,8S e 28S os quais constituem as regiões organizadoras de nucléolo (NORs). As NORs que estiveram ativas são comumente detectadas pela coloração com nitrato de prata (Ag-NORs) mas, podem ser detectadas por outros tipos de coloração diferencial como fluorocromos GC específicos, cromomicina A<sub>3</sub> e mitramicina MM e através de hibridação *in situ* com sondas de rDNA 45S. Geralmente a coloração com os fluorocromos GC específicos detecta as NORs independentemente de suas atividades (SCHMID, 1980). No entanto, o estudo das NORs com fluorocromos não pode ser considerado como definitivo, pois podem evidenciar regiões heterocromáticas ricas em GC não associadas às NORs (SOUZA et al., 2001) ou mesmo não marcar alguns sítios de rDNA 18S (MANDRIOLI et al., 2001; SOUZA et al., 2001).

O gene ribossomal 5S é uma seqüência menor que não participa da formação do nucléolo. A unidade de repetição do rDNA 5S é uma seqüência de 120pb associada a espaçadores não transcritos (LONG; DAWID, 1980) bastante variáveis o que possibilita um grande dinamismo a esses genes (WILLIAMS; STROBECK, 1985). Ao contrário dos genes 45S, os cístrons 5S só podem ser localizados através da FISH com sonda de rDNA. Por esse motivo, a localização dos sítios 5S foi determinada para um número relativamente menor de espécies quando comparado ao número de espécies para as quais se conhece a localização das Ag-NORs. Os genes ribossomais 45S e 5S se mantiveram bastante conservados durante a

evolução dos peixes, o que permite a hibridação de uma seqüência extraída de uma espécie em muitas outras.

Tendo em vista que a caracterização das seqüências de rDNA pode contribuir para um melhor entendimento da evolução cromossômica dos Characidae, sondas de rDNA 18S e 5S foram usadas para identificar o número e localização dessas seqüências em nove espécies desse grupo.

#### Material e Métodos

Foram analisadas as espécies *Myleus micans*, *Astyanax lacustris*, *A. scabripinnis*, *Hasemania nana*, *Piabina argentea*, *Orthospinus franciscensis*, *Serrapinnus piaba* e *S. heterodon* coletadas em uma pequena lagoa às margens do rio São Francisco (Três Marias, MG, Brasil) e *Astyanax altiparanae* coletado no Córrego Monjolinho, bacia do Alto Paraná, (São Carlos, SP, Brasil).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do por meio da técnica de preparação direta de acordo com Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foram mapeadas usando hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de acordo com Pinkel, Straume e Gray (1986), com sondas obtidas de *Prochilodus lineatus* (HATANAKA; GALETTI JR., 2004) e *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JR., 2001), respectivamente.

## Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 15 e 16, respectivamente e na tabela 1.

Tabela 1: número diplóide, fórmula cariotípica e número dos sítios de rDNA 18S e 5S das 9 espécies analisadas.

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	N° de sítios 18S		N° de sítios 5S	
			Terminal	Intersticial	Terminal	Intersticial
<i>A. altiparanae</i>	50	8M+20SM+12ST+10A	2ST	0	0	2M
<i>A. lacustris</i>	50	8M+20SM+16ST+6A	2ST	0	0	2M
<i>A. scabripinnis</i>	50	12M+24SM+8ST+6A	4 SM; 1 A	0	0	2M; 2ST
<i>H. nana</i>	50	8M+42SM	5 SM	0	-	-
<i>P. argentea</i>	52	8M+14SM+16ST+14A	4 ST; 6 A	0	2 SM; 2A	0
<i>O. franciscensis</i>	50	12M+30SM+2ST+6A	2 ST	0	2 SM	2 M
<i>S. heterodon</i>		17M+20SM+14ST+1A				
	52	16M+20SM+14ST+2A	2 ST	0	2 A	2 M
		15M+20SM+14ST+3A				
<i>S. piaba</i>	52	16M+20SM+14ST+2A	2 M; 2 SM; 0 1 ST; 2 A	0	0	4 M; 4 SM*
<i>M. micans</i>	58	26M+18SM+8ST+6A	2ST; 3A	2M	0	2M

\* em posições pericentromérica e intersticial num mesmo par de homólogos; 2n: número diplóide; M: metacêntrico; SM: submetacêntrico; ST: subtlocêntrico; A: acrocêntrico.

## Discussão

A hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S vem se mostrando uma ferramenta bastante utilizada, na detecção das NORs ao longo do complemento cromossômico, pois podem identificá-las independente de ter sido ativas ou não na interfase anterior. Assim, é relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios de NORs que os identificados pela técnica de coloração pela prata como

observado, por exemplo em *Hoplias malabaricus* (BORN; BERTOLLO, 2000), *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), *Prochilodus lineatus* (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2003). Das espécies estudadas *A. scabripinnis*, *H. nana*, *P. argentea*, *S. piaba* e *M. micans* apresentaram NORs múltiplas.

Espécies do gênero *Astyanax* apresentam ampla variação quanto ao número e localização das NORs. Na população de *A. altiparanae* e *A. lacustris*, por exemplo, foi evidenciado apenas um par cromossômico portador do sítio 18S. Já na população de *A. scabripinnis* foram evidenciados cinco cromossomos, o que confirma a ampla variedade encontrada nesse gênero. De fato, um dos maiores números de Ag-NORs descritos para Characidae foi observado em uma população de *A. scabripinnis* (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993). No mesmo sentido, as duas espécies do gênero *Serrapinnus*, também apresentaram variação quanto ao número de sítios de rDNA 18S, ou seja, dois cromossomos portadores em *S. heterodom* e sete, em *S. piaba*.

A presença de um único par de clusters de rDNA 18S tem sido referida como uma condição ancestral compartilhada por diferentes grupos de peixes. O aumento no número desses sítios pode estar relacionado a eventos de dispersão de heterocromatina como proposto por Schweizer e Loidl, 1987, uma vez que as NORs, em peixes geralmente estão associadas a regiões heterocromáticas. Também, tem sido proposto a transposição das NORs associadas a elementos móveis (ALMEIDA-TOLEDO, 2002). A natureza repetitiva das NORs, além da associação com heterocromatina, pode também facilitar a ocorrência de crossing-over desigual ocasionando diferenças de tamanho dos sítios entre homólogos (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1984; GALETTI JR.; RASH 1993; GALETTI JR.; MESTRINER, MONACO, 1995; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996)

como observado em *A. lacustris*, *O. franciscensis*, *P. argentea* e *M. micans* além de alterar o número de sítios.

Nas espécies *A. scabripinnis*, *H. nana* e *S. piaba* e *M. micans*, todas portadoras de múltiplas NORs, não foi possível identificar um número par de sítios de rDNA 18S, ou seja, identificar todos os homólogos portadores desse sítio. Tal característica também pode resultar de crossing-overs desiguais pois, em alguns casos, a recombinação pode levar à perda de grande parte, ou mesmo da totalidade dos genes de um sítio em um dos homólogos (LUPSKI, 1998). Além do mais, mesmo quando a deleção não é total, a pequena quantidade de repetições do gene 18S pode dificultar a detecção pela FISH. Todas as espécies ora analisadas apresentaram os sítios de rDNA 45S na região terminal dos cromossomos e somente *M. micans* apresentou um cluster pericentromérico em um par metacêntrico. Entretanto, esse par não foi evidenciado pelo nitrato de Prata (PERES; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2005a), sugerindo ser uma região inativa.

No presente estudo foram também analisados, pela primeira vez, o número e a localização dos sítios de rDNA 5S em *O. franciscensis*, *P. argentea*, *S. heterodon* e *S. piaba*, além de uma re-análise em *Myleus micans*, *Astynax lacustris*, *A. scabripinnis* e *A. altiparanae*. *Hasemanina nana* foi a única espécie onde a localização desses sítios não foi possível. A presença de dois *loci* intersticiais de rDNA 5S foi referida como conservada entre os Characiformes e possivelmente mantida por alguma vantagem seletiva (MARTINS; GALETTI JR., 2001). No entanto, dados posteriores, principalmente na família Characidae, vêm demonstrando ampla variabilidade envolvendo o número e localização desses sítios (FERRO et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; KAVALCO et al., 2004; MANTOVANI et al., 2005). Nas espécies ora analisadas observaram-se dois *loci* em *A. altiparanae*, *A. lacustris* e

*M. micans*; quatro *loci* em *A. scabripinnis*, *P. argentea*, *O. franciscensis*, e *S. heterodon* e oito *loci* em *S. piaba* os quais se localizaram em três pares de cromossomos homólogos. As posições ocupadas por esses sítios, também são diversas podendo ser pericentromérica, intersticial ou terminal. Desse modo a localização e a posição dos sítios de rDNA 5S em Characidae tem se demonstrado tão variáveis quanto os sítios de rDNA 18S.

A presença de um *locus* pericentromérico de rDNA 5S, em um cromossomo metacêntrico médio, tem sido referida como conservada no gênero *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004). De fato, essa característica foi compartilhada pelas três espécies do gênero ora analisadas. No entanto, não é uma característica diagnóstica para *Astyanax*, já que se estende a espécies de outros grupos não relacionados, como *O. franciscensis*, *S. heterodon*, *S. piaba* e *M. micans*. Na realidade, variações quanto ao número e a localização dos *loci* de rDNA 5S parecem ser comuns entre os *Astyanax*, ocorrendo de dois a oito *loci*, tanto em posição terminal quanto intersticial (FERRO et al., 2001; KAVALCO et al., 2004; presente estudo). Por outro lado, já foi descrita para seis espécies de *Astyanax* a presença de *locus* de rDNA 45S sintênico com *locus* de rDNA 5S, em um par metacêntrico médio (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002). Tal característica não foi observada em nenhuma das espécies ora estudadas de *Astyanax*, uma vez que os sítios de rDNA 18S não foram evidenciados em cromossomos metacêntricos.

A distribuição dos sítios de rDNA 5S e 18S pode ser uma ótima ferramenta para a caracterização citogenética de espécies. As espécies *S. heterodon* e *S. piaba*, por exemplo, possuem a mesma organização cariotípica, sendo difícil separá-las pelo cariótipo convencional (PERES; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2005b). No entanto, pela localização dos sítios de rDNA 5S e 18S, podem ser facilmente

identificadas, pois *S. heterodon* apresentou sistema de NORs simples e quatro *loci* de rDNA 5S, em oposição a *S. piaba* que apresentou NORs múltiplas (7 *loci*), além de 8 *loci* de rDNA 5S. Em adição, foi possível observar mais algumas particularidades quanto a essas duas espécies, ou seja, em *S. heterodon* os dois cromossomos metacêntricos portadores do 5S não possuem o mesmo tamanho, sendo que o maior tem quase o dobro do tamanho do menor. Já em *S. piaba* foi observada uma característica pouco comum envolvendo sítios de 5S, isto é, a presença de mais de um *locus* em um mesmo cromossomo. É possível que uma inversão paracêntrica tenha deslocado parte do sítio de rDNA 5S para outra região do cromossomo, como proposto para *Upsilonodus* sp (KAVALCO et al., 2004).

Os dados disponíveis vem demonstrando uma ampla variação quanto ao número, a localização e a posição desse dos sítios de rDNA 18S e 5S no genoma dos peixes. No entanto, é possível que esta variabilidade seja mais marcante entre algumas famílias, como é o caso de Characidae, comparativamente a outras como Anostomidae e Bryconinae, as quais, coincidentemente, também evidenciam uma maior homogeneidade cariotípica, apresentando essencialmente cromossomos de dois braços.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Yoshimi Sato (CODEVASF, Três Marias, MG) pelo auxílio na coleta dos espécimes e MsC. Flávio C. T. Lima, pela identificação taxonômica. Esse trabalho foi apoiado pela FAPESP (Proc. 03/03642-1) e CNPq.

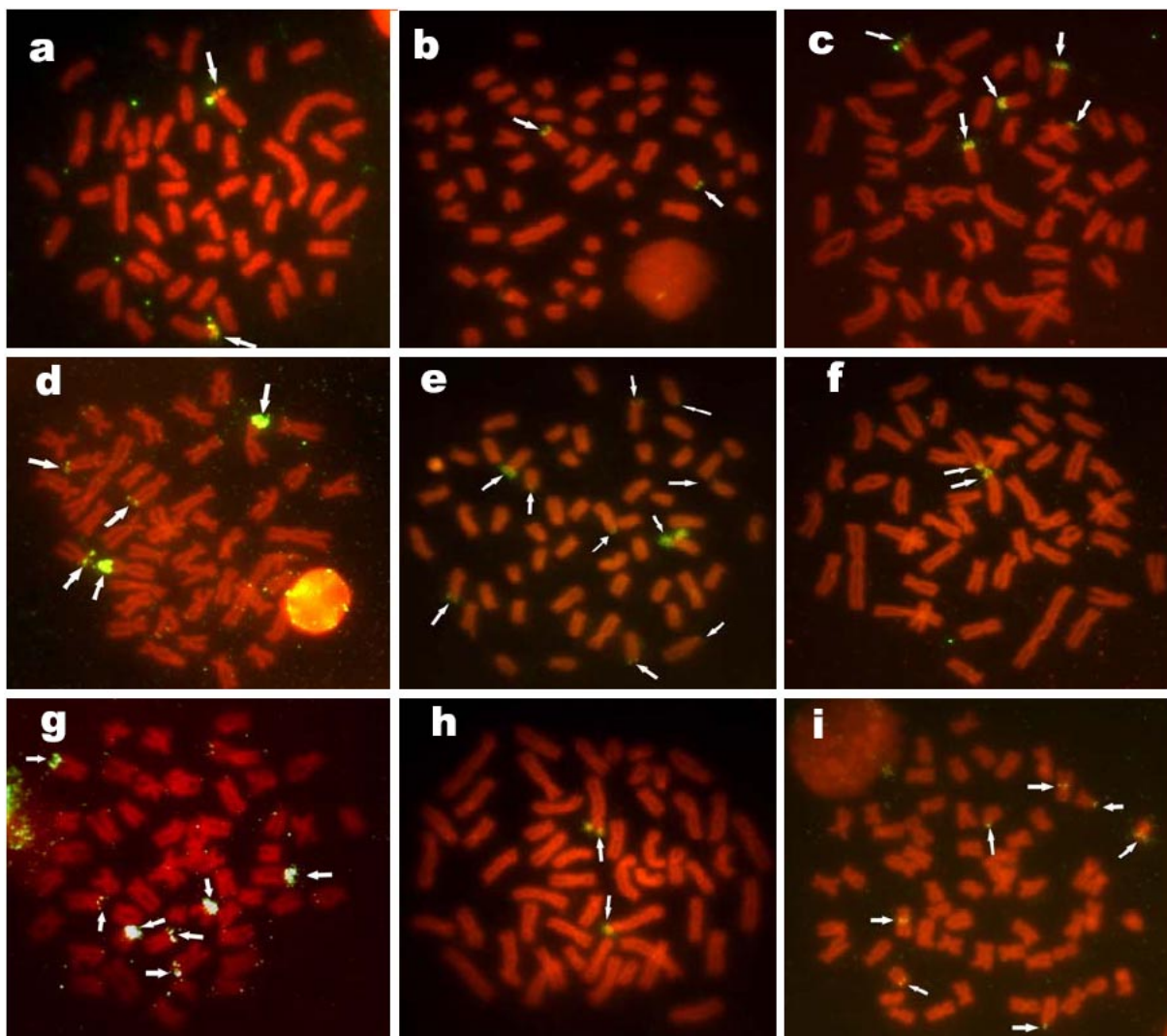


Figura 15 - Localização dos sítios de rDNA 18S indicados pelas setas em: (a) *A. altiparanae*; (b) *A. lacustris*; (c) *A. scabripinnis*; (d) *H. nana*; (e) *P. argentea*; (f) *O. franciscensis*; (g) *S. piaba*; (h) *S. heterodon*; (i) *M. micans*.



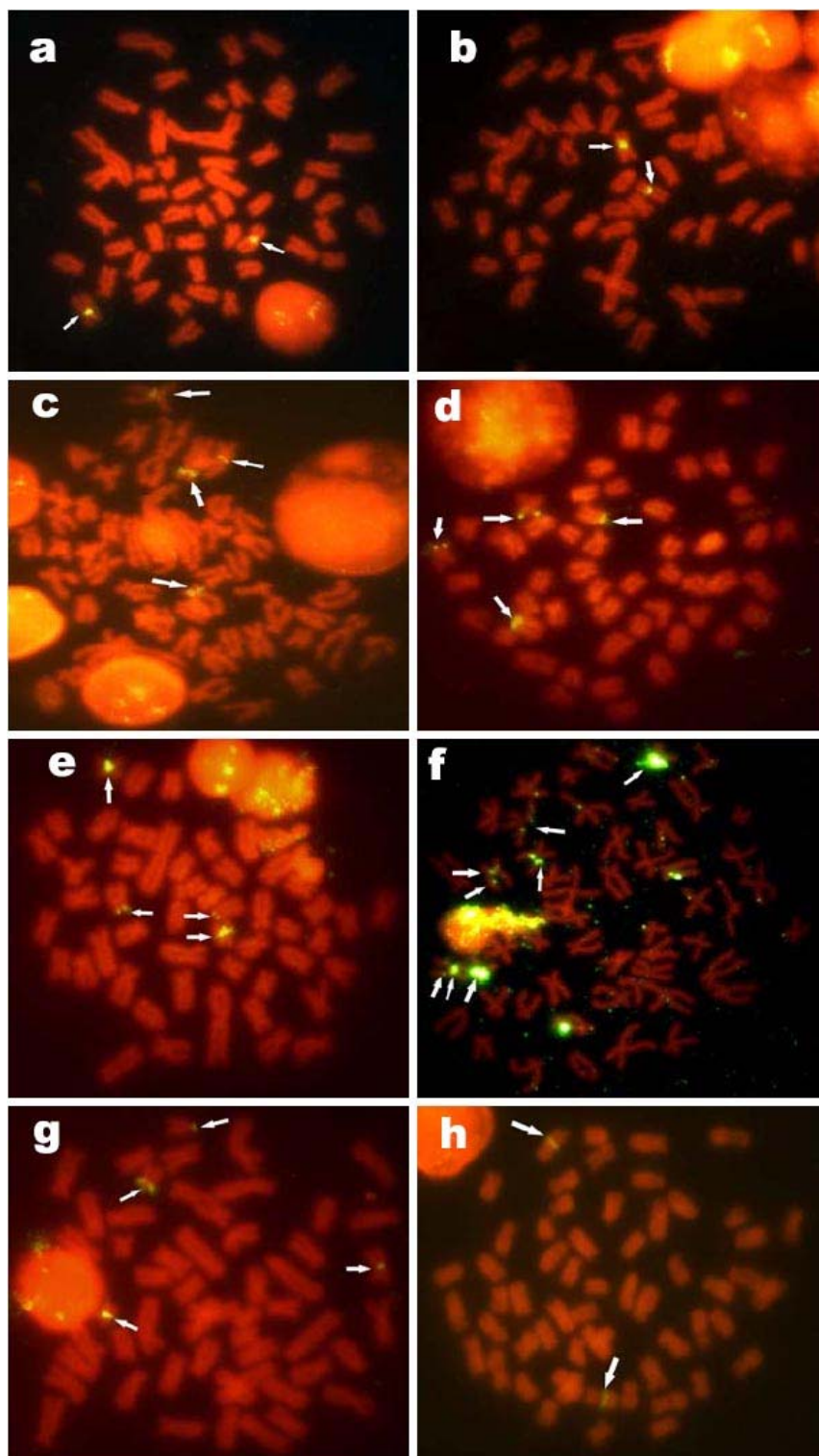


Figura 16 - FISH com sonda de rDNA 5S em:(a) *A. altiparanae*; (b) *A. lacustris*; (c) *A. scabripinnis*; (d) *P. argentea*; (e) *O. franciscensis*; (f) *S. piaba*; (g) *S. heterodon*; (h) *M. micans*.

## 5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A bacia do rio São Francisco é a quarta maior bacia do Brasil e possui cerca de 159 espécies de peixes, muita das quais caracterizadas pelo endemismo. Das nove espécies analisadas nesse trabalho, *Myleus micans*, *Orthospinus franciscencis*, *H. nana*, *A. lacustris* e *Serrapinnus piaba* são endêmicas dessa bacia.

A grande diversidade morfológica observada em Characidae é comparável à dos Ciclidae Africanos. Por outro lado, apresenta uma ampla diversidade cariotípica não verificada em nenhum outro grupo de peixe, o que torna a citogenética uma ferramenta poderosa no auxílio à taxonomia e à classificação das espécies dessa família. A diversificação cromossômica nessa família não apresenta um padrão evolutivo homogêneo como observado em Anostomidae, Prochilodontidae e Curimatidae, que possuem número diplóide conservado. Em Characidae são observadas tanto variações numéricas quanto estruturais. Nesse trabalho, por exemplo, foram observados três números diplóides diferentes,  $2n=50$ ,  $2n=52$  e  $2n=58$  e dez fórmulas cariotípicas distintas (Tabela 2). Cariótipos com 50 cromossomos foram predominantes. No entanto, todas as espécies com esse número diplóide apresentaram fórmulas cariotípicas distintas, o que evidencia a importância dos rearranjos não-Robertsonianos na diversificação dos cariótipos desses peixes. Possivelmente, muitos desses rearranjos puderam ser fixados por não reduzirem consideravelmente a fertilidade dos heterozigotos. Por outro lado, os rearranjos que causam semi-esterilidade na condição heterozigota necessitam de condições especiais como deriva genética, endocruzamento e distorção de segregação para serem fixados.

Tabela 2: Número diplóide, fórmula cariotípica, Ag-NORs e sítios de rDNA 18S e 5S das 9 espécies analisadas.

Subfamília	Espécie	2n	Fórmula cariotípica	Ag-NORs	18S	5S
Serrasalminae	<i>Myleus micans</i>	58	26M+18SM+8ST+6A	4	7	2
Gêneros	<i>Astyanax lacustris</i>	50	8M+20SM+16ST+6A	2	2	2
Incertae Sedis	<i>A. scabripinnis</i>	50	12M+24SM+8ST+6A	2	5	4
	<i>A. altiparanae</i>	50	8M+20SM+12ST+10A	2	2	2
	<i>Hasemania nana</i>	50	8M+42SM	2	5	-
	<i>Piabina argentea</i>	52	8M+14SM+16ST+14A	2	10	4
Stethaprioninae	<i>Orthospinus franciscensis</i>	50	12M+30SM+2ST+6A	2	2	4
Cheirodontinae	<i>Serrapinnus heterodon</i>	52	17M+20SM+14ST+1A,	2	2	4
		52	16M+20SM+14ST+2A			
		52	15M+20SM+14ST+3A			
	<i>S. piaba</i>	52	16M+20SM+14ST+2A	3	7	8

2n: número diplóide; Ag-NORs: número de regiões organizadoras de nucléolo evidenciadas com nitrato de prata; 18S: número de sítios de rDNA 18S localizados através da hibridação fluorescentes *in situ* (FISH); número de sítio de rDNA 5S localizados pela FISH.

As espécies *Serrapinnus heterodon* e *S. piaba* foram às únicas que apresentam fórmulas cariotípicas coincidentes. Entretanto, em *S. heterodon* foi evidenciado um polimorfismo estrutural com mais dois citótipos adicionais não verificados em *S. piaba*, o que reforça a importância das inversões na evolução de Characidae.

A presença de um maior número de cromossomos de dois braços, ou seja, metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foi uma característica comum às espécies analisadas. Esse fato, juntamente com o predomínio de cariótipos com 50 cromossomos, reforça a idéia do cariótipo ancestral de Characidae ser constituído por 50 cromossomos com dois braços, como o apresentado por *H. nana*.

A distribuição de heterocromatina evidenciada pela técnica de bandamento C tem sido uma ferramenta importante na caracterização e distinção de populações e/ou espécies. As espécies analisadas apresentaram distintos padrões de distribuição de bandas-C. No entanto, foram observados blocos centroméricos em todas as espécies. Também foram observados blocos terminais em alguns cromossomos geralmente associados com as Ag-NORs. A distribuição de banda-C mostrou-se especialmente importante na distinção das espécies *A. lacustris* e *A. altiparanae* e de *S. heterodon* e *S. piaba*, que apresentaram cariótipos bastante similares.

O número e a localização das Ag-NORs são bastante variáveis em Characidae. Entretanto, foram evidenciados Ag-NORs múltiplas somente em nas espécies *M. micans* e *H. nana*. Já a FISH, com sonda de rDNA 18S, evidenciou NORs múltiplas também em *A. scabripinnis* e *H. nana*, além de um número maior desse sítio em *M. micans* e *H. nana*.

O número e a localização dos sítios de rDNA 5S foram propostos serem conservados durante na evolução dos peixes. Entretanto, novos estudos demonstram diferentes números e localizações desses sítios, sugerindo que essas características possam quase tão variáveis quantos das NORs. Nesse trabalho foram observados de 1 a 4 sítios de rDNA 5S, localizados em posição intersticial ou terminal em cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. O mapeamento dos sítios de rDNA mostrou-se como uma ótima ferramenta para a distinção das espécies do gênero *Serrapinnus* analisadas, uma vez que a *S. heterodon* apresentou apenas um sítio e *S. piaba* quatro.

Os dados citogenéticos apresentados nesse trabalho representam uma importante contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do rio São Francisco,

já que foram analisadas quase 20% das espécies da família Characidae dessa bacia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERDI, A. J.; FENOCCHIO, A. S. Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. **Cytologia**, v. 62, p. 171-176, 1997.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. **Caryologia**, v. 49, p. 35-43, 1996.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 97, p. 229-233, 2002.

AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolus organizer of fish chromosomes. **Copeia**, v. 1986, p. 226-231, 1986.

AREFJEV, V. A. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia**, v. 43, p. 291-304, 1990a.

AREFJEV V. A. 1990b. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. **Caryologia**, v. 43, p. 305-319, 1990b.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the chromosome. **Heredity**, v. 89, p. 15-19, 2002.

BAIMAI, V. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some Dipteran Insects. **Zoological Studies**, v. 37, p. 75-88, 1998.

BEÇAK, W. et al. Close karyological kinship between the reptilian suborder Serpents and the class Aves. **Chromosoma**, v. 15, p. 606-617, 1964.

BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLARO, Z. I. A highly differentiated ZZ/ZW chromosome system in Characid fish, *Triportheus guenterti*. **Cytogenetics and Cell Genetic**. v. 60, p. 60-63, 1992.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetic**, v. 1, p. 103-120, 1978.

BOJSEN, B. H.; BARRIGA, R. Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. **Freshwater Biology**, v. 47 p. 2246-2260, 2002.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, v. 8, p. 111-118, 2000.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: COMISSÃO INTERESTADUAL DA BACIA PARANÁ-URUGUAY. **Poluição e piscicultura**: notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP: Instituto de Pesca, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificacao de peixes da região de Três Marias**: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, 1988. 115 p.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Description of a ZZ/ZW sex chromosome in *Thoracocharax* cf. *stellatus* (Teleostei, Characiformes, Gasteropelecidae). **Genetics and Molecular Biology** v. 25, p. 299-303, 2002.

CENTOFANTE, L. et al. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 14, p. 361-368, 2003.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon Basin. **Caryologia**, v. 55, p. 37-45, 2002.

CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P. M. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 15, p. 555 – 567, 1992a.

CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P. M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v. 1992, p. 108-112, 1992b.

COYNE, J. A.; AULARD, S.; BERRY, A. Lack of underdominance in a naturally occurring pericentric inversions in *Drosophila melanogaster* and its implications for chromosome evolution. **Genetics**, v. 129, p. 791-802, 1991.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. **Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes)**. 2001. 191f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

EIGENMANN C. H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, Cambridge. v. 23, p. 209-310, 1921.

FALCÃO, J. N.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. An additional chromosome in two fish species. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 7, p. 109-118, 1984.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, p. 157-163, 1994.

FERRO, D. A. M. et al. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55–62, 2001.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S. A. Supranumerary chromosome system C-banding pattern characterization and multiple Nucleolus Organizing Regions in *Moenkhausia sactafilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, p. 107-114, 1989.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v. 6, p. 205-404, 1950.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). **FishBase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. acesso em: 20 fev. 2005.

FUJIWARA, A. et al. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid Fishes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 463-471, 1998.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology**, v. 65, p. 53-56, 1998.

GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v. 47, p. 289-297, 1994.

GALETTI JR., P. M. et al. Karyotype similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus* and *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 4, p. 11-15, 1981.

GALETTI JR., P. M.; MESTRINER, C. A.; MONACO, P. J. Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual Nucleolar Organizing Region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chromosome Research**, v. 3, p. 285-290, 1995.

GALETTI, JR., P. M.; RASCH, E. M. Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* (Teleostei: Poeciliidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 4, p. 269-277, 1993b.

GALETTI JR., P. M.; RASCH, E. M. NOR variability in diploid and triploid forms of *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei, Poeciliidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 927-938, 1993a.

GALETTI, JR., P. M.; SILVA, E. B.; CERMINARO, R. T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 8, p. 479-484, 1985.

GARUTTI, V. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 85, p. 115-122, 1998.

GARUTTI, V.; BRITISKI, H. A. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Paraná e consideracoes sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 16. p. 65-88, 2000.

GERY, J. **Characoids of the world**. New Jersey. T.F.H Publications, 1977, 672p.

GOLD, J. R. et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 563-575, 1990.

GORNUNG, E. I. et al.. CMA3-banding pattern and fluorescence *in situ* hybridization with 18S rRNA genes in zebrafish chromosomes. **Chromosome Research**, v. 5, p. 40-46, 1997.

HATANAKA, T. E.; GALETTI JR., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae), **Genetica**, v.122, p. 239 – 244, 2004.

HEDRICK, P. W. The establishment of chromosome variants. **Evolution**, v. 35, p. 322-332, 1981.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JÉGU, M. *Serrasalminae* (Pacus and piranhas). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR. C. J. (Org.) **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 182-196.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of Parodon (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 11, p. 75-80, 2000.

JIN, S. M.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência e Cultura**, v. 27, p. 1122-1124, 1975.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos citogenéticos en *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) del río Paraná, Argentina. **Revista de Ictiologia**, v. 9, p. 21-24, 2001.

KAVALCO, K. F. et al. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 107-110, 2004.



KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, v. 54, p. 453-461, 2003.

LANDE, R. Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. **Evolution**, v. 33, p. 234-251, 1979.

LATINI, A. O.; PETRERE JR., M. Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fisheries Management and Ecology**, v. 11, p. 71-79.

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetics and Cell Genetic**, v. 26, p. 36-40, 1980.

LEVAN, A.; FREDGA, K. E.; SANDBERG, H. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LIMA, F. C. T. et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; S. O. Kullander; Ferraris JR. C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

LONG, E.O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

LUCENA, C. A. S. **Estudo monofilético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. 1996.158 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LUNDBERG, J. G. et al. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental water. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 87, p. 26-62, 2000.

LUPSK, J. R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in Genetics**, v. 14, p. 417-422, 1998.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte II. Discussion sobre la condicion monofilética de la subfamilia. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 11, p. 145-195, 1983.

MAISTRO, E. L. et al. Natural Triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and Simultaneous occurrence of Macro B-Chromosomes. **Caryologia**, v. 47, p. 233-239, 1994.

MALABARBA, L. R. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major Clades (Ostariophysi: Characidae). In: MALABARBA, L. R. et al. (Org.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 199-233.

- MALACRIDA, A. C. C. P. et al. Análise Cromossômica de *Astyanax* cf. *fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) coletados no Rio Claro-Tamarana/PR e Ribeirão dos Apertados/PR. In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 2000, Manaus. **Anais...** n8., 2000, Manaus, 2000: INPA, 2000. p. 25
- MANDRIOLI, M. et al. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). **Genética**, v. 110, p. 73-78, 2001.
- MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nuclear organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.
- MANTOVANI, M. et al. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 536-542, 2004.
- MANTOVANI, M.; ADEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 123, p. 211-216, 2005.
- MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR. Chromosome studies in fish of the genus Brycon (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**, v. 85, p. 219-228, 1996.
- MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera Brycon and Salminus (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 357-361, 1999.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish Leporinus: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910, 2001.
- MARTINS-SANTOS I. C.; JÚLIO JR. H. F.; SANTOS, S. J. Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná River. **Cytologia**, v. 59, p. 175-181, 1994.
- MCALLISTER, B. F. Sequence differentiation associated with an inversion on the Neo-X chromosome of *Drosophila americana*. **Genetics**, v. 165, p. 1317-1328, 2003.
- MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 1-46, 2001.
- MILLER, O. J. et al. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 73, p. 4531-4535, 1976.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic and morphometric differences in population of *Astyanax scabripinnis* (Pices, Characidae) from Maringa region, Pr, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 55-61, 1998.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, p. 564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O. et al. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, p. 59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 230-234, 2004.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of fish Order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, p. 59-66, 1968.

NAKAYAMA, C. M. et al. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, v. 2001, p. 866-869, 2001.

NAKAYAMA, C. M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, Serrasalminae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 30, p. 149-154, 2000.

NAKAYAMA, C. M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 114, p. 231-236, 2002.

NIRCHIO, M. et al. Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus* from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Caryologia**, v. 56, p. 405-411, 2003.

OGAWA, A.; MURATA, K.; MIZUNO, S. The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 95, p. 4415-4418, 1998.

OLIVEIRA, C. et al. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C. ; TOLEDO, L. F. A. ; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: SIMPÓSICO DE CITOGÉNÉTICA

E GENÉTICA DE PEIXES, 2000, Manaus. **Anais...** 8., 2000, Manaus, 2000: INPA, 2000. p. 24.

ORSE, M. L.; AGOSTINHO, A. A. Fish species introduction by accidental escape from aquaculture in the high Paraná River Basin. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 557-560, 1999.

ORTÍ, G. et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 169-182, 1996.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, v. 46, p. 75-100, 1997.

ORTÍZ-BARRIENTOS, D. et al. Recombination and the divergence of hybridizing species. **Genética**, v. 116, p. 167-178, 2002.

PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytotypes and multiples NORs in a *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v. 5, p. 109-114, 2001.

PAGANELLI, H. H. **Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**: Considerações citotaxonômicas e evolutivas. 1990. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.

PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *Exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 67, p. 397-402, 2002.

PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra Editorial, 1982, 292p.

PAIVA, M.P. **Peixes e pescas de águas interiores do Brasil**. Brasília: Editerra Editorial, 1983. 158p.

PARRA W. J. G. **Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalminae, Characidae) da Amazônia Central**. 2000. 156p. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2000.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic characterization of *Myleus micans* (Lütken, 1875) (Pisces, Characidae, Serrasalminae). **Caryologia**, 2005 (no prelo).

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Caracterização cariotípica em espécies do gênero *Serrapinnus* (Pisces, Characidae), com a descrição de um polimorfismo estrutural em *S. heterodon*. **Genética**, 2005 (no prelo).

PFISTER, S. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies in *Orthopinus franciscensis* ( Pisces, Characidae, Stethaprioninae) and some considerations about karyotype evolution of the group. **Cytobios**, v. 91, p. 97-101, 1997.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA. v. 83, p 2934-2938, 1996.

POMPEU, O. S. **Efeitos das estações seca e chuvosa e da ausência de cheias nas comunidades de peixes de três lagoas marginais do médio São Francisco**. 1997. 72p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI JR, P .M.; BERTOLLO, L. A, C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 307-313, 1988.

PORTELA-CASTRO, A. L. B. S.; JÚLIO, H. F.; NISHIYAMA, P. B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica**, v. 110, p. 277-283, 2000.

PORTO-FORESTI, F. et al. A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 51-54, 2004.

POST, A. Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen bei süsswasser Teleostein. **Zeitschrift fuer Zoologische Systematic and Evolutionforschung**, v. 3, p. 47-93, 1965.

Prefeitura de Três Marias. Disponível em: < <http://www.tresmarias-mg.com.br> > . Acesso em: 10 junho. 2005.

REIS, R. E. Subfamily Tetragonopterinae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; Ferraris JR., C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 212.

REIS, R. E. Systematic revision of the neotropical chracid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes). **Comunicações Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS, série Zoologia**. Porto Alegre, v. 2, p. 3-84, 1989.

ROBERTS, P. A. A positive correlation between crossing over within heterozygous pericentric inversions and reduced egg hatch of *Drosophila* females. **Genetics**, v. 56, p. 179-187, 1967.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supranumerary B Chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 601-615, 1993.

SCHAEFER, A. S. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba, L. R., et al. (Org.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p.375-394.

SCHEEL, J. J. **Fish chromosomes and their evolution**. Charlottenlund Danmarks: Danmarks Akvarium, 1973. Internal Report.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, p. 83-103, 1980.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosome Today**, v. 9, p. 61-74, 1987.

SOUZA, I. L. et al. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanx scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, v. 66, p. 85-91, 2001.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. **Cytobios**, v. 83, p. 273-281, 1995.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 405-410, 1996.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUNAGA, T.; VERANI, J. R. The fish communities of the lakes in the Rio Doce Valley, Northeast Brazil. **Verhandlungen der internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 24, p. 2563-2566.

TOLEDO-FILHO, A. S.; FORESTI, F.; RIBEIRO, A. F. Ictiogenética: Aspectos básicos e aplicados. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 320-327, 1978.

TURNER, B. J. et al. Extensive chromosomal divergence within a single river basin in the goodeid fish, *Ilyodon furcidens*. **Evolution**, v. 39, p. 122-134, 1985.

VARI, R. P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 378, p. 1-60, 1983.

VARI, R. P.; Malabarba, L. R. Neotropical ichthyology: An overview. In: Malabarba, L. R., et al., (Org.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 1-11.

WASKO, A. P. et al. A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. **Chromosome Science**, v. 5, p. 145-148, 2001.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae. In: Malabarba, L. R. et al. (Org.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 161-170.

WHITE, M. J. D. Models of speciation. **Science**, v. 159, p. 1065-1070, 1968.

WILLIAMS, S. M.; STROBECK, C. Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. **Journal of Theoretical Biology**, v. 116, p. 625–636, 1985.