

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

**DIVERSIDADE DE PEIXES RESIDENTES EM CABECEIRAS DE RIOS. UMA
ABORDAGEM CROMOSSÔMICA EM TRÊS DIFERENTES BIOMAS
AQUÁTICOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL.**

Marcelo Ricardo Vicari

SÃO CARLOS-SP

2006

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

**DIVERSIDADE DE PEIXES RESIDENTES EM CABECEIRAS DE RIOS. UMA
ABORDAGEM CROMOSSÔMICA EM TRÊS DIFERENTES BIOMAS
AQUÁTICOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL.**

Marcelo Ricardo Vicari

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

SÃO CARLOS-SP

2006

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

V628dp

Vicari, Marcelo Ricardo.

Diversidade de peixes residentes em cabeceiras de rios.
Uma abordagem cromossômica em três diferentes biomas
aquáticos da Região Sul do Brasil / Marcelo Ricardo Vicari. -
- São Carlos : UFSCar, 2006.
158 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2006.

1. Citogenética. 2. Citotaxonomia. 3. Evolução cariotípica.
4. Biogeografia. 5. Cromossomos sexuais. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo

Co-orientador

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Dedico este trabalho aos meus pais
Nadir Vicari e Maria da Piedade
Vicari pelo total apoio, amor e
confiança.

“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso, aprenderemos sempre”.

Paulo Freire

Agradecimentos

Neste momento, gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos a toda estrutura institucional e humana que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPG-GeV) pelo suporte e auxílio na realização deste estudo.

Ao prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo, amigo e orientador, profissional de valor inestimável, ético, extremamente competente e responsável. Agradeço pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por sua confiança, seus incentivos e gostaria de salientar a imensa admiração que tenho por sua pessoa, o Sr. foi um excelente orientador, muitíssimo obrigado.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, a quem muito estimo e devo por ter acreditado em meu trabalho e me lançar ao meio científico. Roberto, agradeço sua confiança, incentivo e as ótimas idéias na realização dos nossos trabalhos, mas acima de tudo agradeço em nome de nossa imensa amizade.

Aos meus pais, Nadir Vicari e Maria da Piedade Vicari, pessoas que muito amo. Pai/Mãe vocês sempre lutaram para dar o máximo de educação a nós, seus filhos. Nos momentos mais difíceis de nossas vidas vocês continuaram a apostar em nossa educação. Muito obrigado por mostrar o caminho.

Em adição, gostaria de agradecer a todas as pessoas e amigos que de alguma forma auxiliaram em minha formação profissional e social.

Ao prof. Orlando Moreira-Filho por sua intensa participação na realização deste trabalho. Orlando, gostaria de destacar seu incentivo em mim depositado e

dizer que é muito gratificafante trabalhar em conjunto com professores de altíssimo nível como o Sr., o Roberto e o Bertollo.

À minha namorada, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão nesta jornada.

Aos amigos do laboratório Débora, Elizangela, Wellington, Daniel Kantec, Ernani, Celeste, Rosângela, Marcelo, Daniel, Maressa e Gustavo pelos mais diversos auxílios, excelente convivência e amizade.

Aos grandes amigos Liano e Vladimir, que embora já tenham retornado as suas intuições, muito contribuíram na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular e seu coordenador, prof. Pedro Galetti, pelo companheirismo e auxílio durante este período.

Ao grande amigo de departamento Rogério Oliveira Souza pela amizade e pela ótima acolhida em sua casa.

Aos funcionários do Departamento de Genética Luís, Antônio, Jorge, Cláudio, Rodrigo e Tatiana pelos mais diversos auxílios na realização deste trabalho.

Às funcionárias da secretaria da Pós Graduação em Genética e Evolução Regeane, Greice e Rose, pelo bom atendimento e pela amizade.

À professora Mara da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos seus ensinamentos, paciência e ótima amizade.

Ao grande amigo, Miguel Airton Carvalho, funcionário do laboratório de citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pessoa que muito me ajudou em toda graduação e pós-graduação, “Miguelito” muito obrigado!

Aos amigos do laboratório de citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa João, Leila, Milena, Darcielle, Helena, Américo, Carol, Elisandra e Cíntia pelos bons momentos nesta instituição.

Aos amigos da cidade de Ponta Grossa Claide, Kátia, Kelly e Cristiano, pelos bons momentos juntos e por sempre me acolher de maneira muito agradável.

Aos meus irmãos Sílvio, Silvana, Marcio, Marcos e Rita Paula que sempre deram apoio, incentivo aos estudos e torceram por meu sucesso.

Aos meus sobrinhos Lucas, Matheus, Arthur, Jéssica, Júnior, Tiago e Gabriel, o tio ama vocês todos.

Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e Paranaturismo pelas autorizações de captura de peixes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida, a qual muito auxiliou a realização deste trabalho (Processo 03/13019-0).

Resumo

O estudo apresentou uma análise citogenética de espécies de peixes de pequeno porte coletadas nas cabeceiras das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi. Algumas espécies tiveram uma análise citogenética populacional comparativa entre essas diferentes bacias, enquanto em outras foram abordados problemas específicos inerentes apenas à uma população. Foram abordados aspectos de citogenética, citotaxonomia, biogeografia e de biologia evolutiva das populações de *Corydoras paleatus*, *Corydoras ehrhardti*, *Apareiodon* sp., *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma facetum*, complexo *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax janeiroensis* e *Characidium* sp. cf. *C. gomesi*. Foram apresentados e discutidos (a) a ocorrência simpátrica de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* para a Lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi (b) um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em uma espécie não descrita do gênero *Apareiodon* do rio Verde, bacia do rio Tibagi (c) o conservadorismo cariotípico apresentado para as espécies e populações de Perciformes, *G. brasiliensis* e *C. facetum*, das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi, aliado à uma hipótese de dispersão das espécies de peixes entre essas bacias (d) a análise citogenética comparativa do complexo de espécies *A. scabripinnis* para as bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi, todas mostrando cariótipos similares com $2n=50$ cromossomos, porém não idênticos, aliada a um novo citótipo simpátrico apresentando $2n=48$ cromossomos somente na população da bacia do rio Jaguariaíva (e) a localização, composição e natureza dos domínios heterocromáticos presentes no cariótipo de *A. janeiroensis* da bacia do rio Ribeira e; (f) uma possível condição sinapomórfica para as espécies de *Characidium* que apresentam sistema de cromossomos sexuais heteromórficos.

Foi também discutido o possível intercâmbio de faunas nas regiões de cabeceiras dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi na região do arco de Ponta Grossa, ao lado de uma ictiofauna aparentemente mais endêmica para a bacia do rio Jaguariaíva. Assim, esse estudo procurou associar dados citogenéticos, questões de biogeografia e biologia evolutiva das espécies de peixes presentes nas cabeceiras destes três rios paranaenses.

Abstract

This study presented cytogenetic analysis of small fishes species collected in the headwaters of Jaguariaíva, Ribeira and, Tibagi rivers. Some of these species have had a comparative cytogenetic population analysis among different basins, while in the others were observed inherent specific problems only in one population. In this work we boarded cytogenetic, cytotoxonomy, biogeographic and evolutive biology aspects of these populations: *Corydoras paleatus*, *Corydoras ehrhardti*, *Apareiodon* sp., *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma facetum*, *Astyanax scabripinnis* species complex, *Astyanax janeiroensis*, and *Characidium* sp. cf. *C. gomesi*. Here we discussed and presented (a) the sympatric occurrence of *C. paleatus* and *C. ehrhardti* from Dourada lagoon, Tibagi basin; (b) a ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* in the Verde river, Tibagi basin (c) the karyotypic conservatism visualized in species and populations of Perciformes, *G. brasiliensis* and *C. facetum*, in the Jaguariaíva, Ribeira and Tibagi basins, showing the dispersion of fish species hypotheses among these basins; (d) a comparative cytogenetic analysis of *A. scabripinnis* species complex, among Jaguariaíva, Ribeira, and Tibagi basins, all of them shared karyotypes with $2n=50$ chromosomes but minors differences among them were observed, and we also showed a sympatric cytotype with $2n=48$ chromosomes only in the Jaguariaíva basin; (e) the composition, location and nature of heterochromatic sites present in the *A. janeiroensis* karyotype of Ribeira basin and; (f) a possible sinapomorphic condition in the *Characidium* species with heteromorphic sex chromosome system. We also discussed the possible faunas interchange in the headwaters regions of Ribeira de Iguape and Tibagi rivers in the

Ponta Grossa arc region, beside to the supposed endemic ictiofaune of Jaguariaíva basin. Thus, this study associated cytogenetic data, biogeographic aspects, and evolutive biology of fishes species located in the headwaters of three Paraná State rivers.

Lista de Figuras

3. Material e Métodos

- Figura 1.** Mapa do Brasil indicando as áreas de importância para estudos de diversidade de peixes, com destaque para a parte leste do estado do Paraná, indicando as áreas em estudo: (a) rio Ribeira, (b) rio Jaguariaíva, (c) rio Tibagi..... **19**

4.1 Gênero *Corydoras* da bacia do rio Tibagi

- Figura 1.** Mapa da América do Sul mostrando a região de coleta em detalhe. Os rios costeiros são separados na figura dos rios continentais por uma linha imaginária cinza. O local do alto rio Tibagi (Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil), onde foram coletados espécimes de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* está destacado por um ponto preto..... **38**

- Figura 2.** Cariótipos, cromossomos e espécimes de *Corydoras ehrhardti* (A, C, B, G) e *Corydoras paleatus* (D, F, E, H), respectivamente. Em (A, D) estão sendo evidenciados os cariótipos corados por Giemsa. (C, F) apresentam o padrão da distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C. As caixas (B, E) destacam os cromossomos portadores das RONS corados pelo nitrato de prata. Em (G, H) são apresentados os espécimes de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. Barras: 10 µm (cariótipos) e 10 mm (espécimes)..... **39**

- Figura 3.** *Corydoras ehrhardti* (A) e *Corydoras paleatus* (B): cromossomos mitóticos submetidos à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S. As setas indicam a localização das regiões organizadoras de nucléolo nas duas espécies..... **40**

4.2 *Apareiodon* sp. da bacia do rio Tibagi

- Figura 1.** Mapa da América do Sul, com destaque para o estado do Paraná (Brasil). Em (a) está representada a bacia do rio Tibagi (em cinza) e região de Ponta Grossa (PG). Em (b) um espécime fêmea cariotipado de *Apareiodon* sp. (voucher No. 3447)..... **52**

- Figura 2.** Cariótipos de *Apareiodon* sp. macho, do rio Verde, em coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra representa 5 μ m..... **53**
- Figura 3.** Cariótipos de *Apareiodon* sp fêmea, do rio Verde, em coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra representa 5 μ m..... **54**
- Figura 4.** Metáfases de *Apareiodon* sp. evidenciando (A) os cromossomos portadores das Ag-RONs; (B) os sítios de rDNA18S, mostrando sua variação de tamanho entre sítios homólogos; (C) os sinais positivos CMA₃-fluorescentes e; (D) os sítios de rDNA 5S (setas). A variação de tamanho entre os sítios homólogos de rDNA 18S de outra metáfase são mostradas em B. A associação dos cromossomos portadores de Ag-RONs é indicada pela cabeça de seta em C. A barra representa 5 μ m..... **55**
- Figura 5.** Diferenciação hipotética do cromossomo W a partir de um cromossomo ancestral semelhante ao Z..... **56**

4.3 Ciclídeos das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi.

- Figura 1.** Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (A, B, E) e *Cichlasoma facetum* (F) com coloração convencional por Giemsa, e análise seqüencial da heterocromatina (C, D, G) e (H), respectivamente. Em destaque, o par cromossômico portador do sítio Ag-NOR positivo. (A, C) população do rio Jaguariaíva; (B, D) população do rio Socavão; (E, G) população do rio Verde. A barra representa 5 μ m..... **68**
- Figura 2.** Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (A, B, E) e de *Cichlasoma facetum* (F), corados com o fluorocromo cromomicina A₃ e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (C, D, G) e (H), respectivamente, mostrando um sítio GC positivo e AT negativo nos pares cromossômicos 6 de *G. brasiliensis* e 8 de *C. facetum*. (A, C) população do rio Jaguariaíva, (B, D) população do rio Socavão, (E, G) população do rio Verde. A barra representa 5 μ m.. **69**
- Figura 3.** Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (C, D, G) e de *Cichlasoma facetum* (F), mostrando a localização do rDNA 18S nos pares cromossômicos 6 e 8, respectivamente, e a localização do rDNA 5S no pares cromossômicos 10 (C, D, G) e 11 (H), respectivamente. (A, C) população do rio Jaguariaíva, (B, D) população do rio Socavão, (E, G) população do rio Verde. A barra representa 5 μ m..... **70**

Figura 4. Par cromossômico número 6 de *Geophagus brasiliensis*, mostrando a localização da NOR no braço curto e o seu polimorfismo de tamanho, sob diferentes metodologias de análise: (A) coloração convencional com Giemsa, evidenciando a constrição secundária bem evidente; (B) bandamento C, mostrando a localização da heterocromatina adjacente ao sítio da NOR, (C) sítio Ag-NOR positivo, (D) sítio DAPI negativo, (E) sítio cromomicina A₃ positivo e, (F) localização do rDNA 18S. A barra representa 5 µm..... **71**

4.4 *Astyanax* “complexo *scabripinnis*” das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi

Figura 1. Cariótipos do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*: (A, B) Cariótipo A do rio Verde; (C, D) Cariótipo B do rio Santo Antônio; (E, F) Cariótipo C do rio Santo Antônio. (A, C, E) coloração convencional por Giemsa e (B, D, F) bandamento C sequencial, respectivamente. A barra representa 10 µm..... **84**

Figura 2. Metáfases de *Astyanax paranae* (Cariótipo A) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 µm..... **85**

Figura 3. Metáfases de *Astyanax* sp. (Cariótipo B) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 µm..... **86**

Figura 4. Metáfases de *Astyanax* sp. (Cariótipo C) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 µm..... **87**

4.5 *Astyanax janeiroensis* da bacia do rio Ribeira

Figura 1. Cariótipo de *A. janeiroensis* da bacia do rio Ribeira. Em (A) coloração convencional por Giemsa; em (B) bandamento C

- seqüencial. A barra representa 5 μ m..... 102
- Figura 2.** Metáfases de *A. janeiroensis* da bacia do rio Ribeira, tratadas com nitrato de Prata, mostrando variação numérica das RONS: (a) 3 sítios de Ag-RONS (setas); (b) 5 sítios de Ag-RONS (setas). A barra representa 5 μ m..... 103
- Figura 3.** Cromossomos de *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira, submetidos à dupla FISH, com sondas de rDNA 18S e DNA repetitivo As51 e coloração com DAPI: (a) sítios de rDNA 18S (setas); (b) sítios de DNA repetitivo As51 (cabeça de setas); (c) dupla marcação rDNA 18S e DNA repetitivo As51, as setas indicam sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S; (d) coloração com DAPI mostrando as regiões DAPI negativas; as setas indicam as regiões DAPI negativas referentes aos sítios de rDNA 18S; as cabeças de setas indicam as regiões DAPI negativas referentes aos domínios As51/rDNA 18S; (e) sinais fluorescentes obtidos por sondagem de rDNA 18S; as setas indicam sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S; (f) sobreposição de sinais fluorescentes obtidos por sondagem com rDNA 18S e DNA repetitivo As51; as setas indicam os sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S. A barra representa 5 μ m..... 104
- Figura 4.** Cromossomos de *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira: (a) coloração por fluorocromo DAPI; as setas e cabeças de setas mostram os sítios DAPI negativos; (b) coloração pelo fluorocromo CMA₃, evidenciando regiões ricas em pares de bases GC, correspondentes às regiões DAPI negativas mostradas pelas setas em (a); (c) FISH com sonda de rDNA 5S, evidenciando sua localização em apenas um par de cromossomos (setas). A barra representa 5 μ m..... 106

4.6 *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* da bacia do rio Tibagi

- Figura 1.** Espécime de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna, subafluente do rio Tibagi, PR. 120
- Figura 2.** Cariótipos de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna. (a) cariótipo de macho com coloração convencional por

Giemsa; (b) bandamento C seqüencial; (c) cariótipo de fêmea com coloração convencional por Giemsa; (d) bandamento C seqüencial. A barra representa 5 µm.....

121

Figura 3. Metáfases de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna. (a) coloração por nitrato de prata, as setas representam os sítios Ag-RONs ativos; (b) hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S em metáfase de fêmea, sendo identificado o cromossomo W e os sítios de rDNA 18S (setas); (c) hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S em metáfase de fêmea, sendo identificado o cromossomo W e os sítios de rDNA 5S (setas). A barra representa 5 µm.....

122

Figura 4. Mapa hidrográfico da América do Sul (a); A = sistema hidrográfico do rio Paraná, B = conjunto de rios costeiros que compõem a bacia do Leste, C = bacia do rio São Francisco e D = bacia Amazônica; em (b) detalhe parcial da margem leste do sul e sudeste do Brasil; a área em destaque mostra a região de abrangência de espécies de *Characidium* que até o presente momento apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, 1 ribeirão Grande (*C. sp. cf. alipioi* e *C. lauroi*), 2 córrego Paiol Grande (*C. gomesi* e *C. zebra*), 3 rio Pardo (*C. sp. cf. C. gomesi*), 4 rio da Quinta (*C. sp. cf. C. gomesi*), 5 córrego Quebra Perna (*C. sp. cf. C. gomesi*), 6 reserva Jataí (*C. zebra* e *C. lagsantensis*), 7 rio Passa Cinco (*C. zebra*), 8 rio Piracicaba (*C. zebra*), 9 Reserva Carlos Botelho (*C. pterosticum*) e 10 rio Machado (*C. zebra* e *C. gomesi*); em (c) idiograma sobre a hipótese proposta da diversificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Characidium*: 1 *C. sp. cf. alipioi* do ribeirão Grande, 2 *C. gomesi* do córrego Paiol Grande, 3 *C. sp. cf. C. gomesi* do rio Pardo, 4 *C. sp. cf. C. gomesi* do rio da Quinta, 5 *C. sp. cf. C. gomesi* do córrego Quebra Perna.....

123

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ECOSISTEMAS AQUÁTICOS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA E CAMPOS SULINOS	1
1.2 INFORMAÇÕES DETALHADAS SOBRE AS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PARANAPANEMA, TIBAGI E RIBEIRA APLICADAS A DISTRIBUIÇÃO DA ICTIOFAUNA	3
1.3 DIVERSIDADE CITOGENÉTICA EM PEIXES NEOTROPICAIS, COM ESPECIAL ENFOQUE ÀS ESPÉCIES RESIDENTES EM CABECEIRAS DE RIOS	8
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. MATERIAL E LOCAIS DE COLETA	19
3. 2. 1. <i>Obtenção de Cromossomos Mitóticos</i>	20
3. 2. 2. <i>Deteção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG</i>	22
3. 2. 3. <i>Deteção das Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs</i>	23
3. 2. 4. <i>Coloração pelo Fluorocromo G-C específico, Cromomicina A₃</i>	24
3. 2. 5. <i>Dupla Coloração pelos Fluorocromos Cromomicina A₃/DAPI</i>	24
3. 2. 6. <i>Hibridação fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e DNA repetitivo As51</i> ..	25
3. 2. 7. <i>Análises cariotípicas</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 GÊNERO <i>Corydoras</i> DA BACIA DO RIO TIBAGI.....	29
4.2 <i>Apareiodon</i> sp. DA BACIA DO RIO TIBAGI.....	42
4.3 CICLÍDEOS DAS BACIAS DOS RIOS JAGUARIAÍVA, RIBEIRA E TIBAGI	57
4.4 COMPLEXO “ <i>Astyanax scabripinnis</i> ” DAS BACIAS DOS RIOS JAGUARIAÍVA, RIBEIRA E TIBAGI.....	72
4.5 <i>Astyanax janeiroensis</i> DA BACIA DO RIO RIBEIRA.....	90
4.6 <i>Characidium</i> sp. cf. <i>C. gomesi</i> DA BACIA DO RIO TIBAGI.....	108
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ecossistemas aquáticos da Mata Atlântica Brasileira e Campos Sulinos

Os ecossistemas aquáticos da Mata Atlântica Brasileira possuem uma fauna de peixes rica e variada, intimamente associada à floresta que proporciona proteção e alimento (MENEZES et al., 1990; MENEZES, 1994). Com a devastação da floresta, hoje reduzida a apenas 2 a 2,5 % de sua extensão inicial, houve uma profunda alteração, reduzindo a fauna original a uma fração do que existia no passado. O traço mais marcante desta fauna é o seu grau de endemismo, resultante do processo de evolução histórica das espécies, em uma área geomorfológica isolada das outras áreas onde se localizam as demais bacias hidrográficas brasileiras.

Os ecossistemas aquáticos dos Campos Sulinos estão localizados nas formações campestres não savânicas, ocorrentes desde o sul de São Paulo, entre Angatuba e Itararé, passando pelo interior do Paraná e Santa Catarina, em meio à região da Floresta Ombrófila Mista (floresta com Araucária), até os campos do sul do Rio Grande do Sul (MENEZES, 1998). Esses ecossistemas fazem parte de grandes drenagens que atravessam variadas formações vegetais, inclusive de Mata Atlântica. Assim, a ictiofauna dos ecossistemas aquáticos do bioma Campos Sulinos é bastante heterogênea, pois compreende elementos de drenagens distintas quanto a geomorfologia (alto Paraná, alto Iguaçu, alto Uruguai, por exemplo), que se mantiveram historicamente isoladas de outras bacias hidrográficas (MENEZES, 1998).

A região de Floresta Ombrófila Densa possui alta percentagem de espécies de peixes endêmicas. BUCKUP (1991) relata que este fato deve-se à concentração de grande número de bacias hidrográficas independentes, aliada ao efeito isolador que as cadeias de montanhas que separam os diversos vales da região exercem sobre as várias populações de peixes. As características topográficas e fisionômicas proporcionam uma ampla gama de ambientes distintos, o que favorece a ocorrência de um grande número de espécies, cada uma das quais adaptadas a um subconjunto particular destes ambientes, o que eleva o número de espécies endêmicas na área. Por fim, a predominância de cursos d'água relativamente pequenos favorece a ocorrência de espécies de pequeno porte, com limitado potencial de dispersão espacial e tendências de fixação de divergências genéticas interpopulacionais.

No ano de 2000 o Ministério do Meio Ambiente lançou o relatório intitulado “*Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*”. Neste estudo foram feitas indicações de áreas prioritárias para peixes em grandes regiões aquáticas, consideradas unidades ecológicas/biogeográficas básicas, agregando comunidades que têm em comum a maioria das espécies, a mesma dinâmica e condições ambientais idênticas. Assim, foram indicadas 29 áreas prioritárias na Mata Atlântica, cinco nos Campos Sulinos, e uma parcialmente incluída nos dois biomas. No sul, três áreas foram diagnosticadas de alta importância biológica (cabeceiras do rio Iguaçu-PR; cabeceiras do rio Ribeira-PR, SP; e várzea do rio Paraná-MS, PR). As cabeceiras do rio Paranapanema, parcialmente incluídas tanto na Mata Atlântica como nos Campos Sulinos, foram diagnosticadas como prioritárias para inventário da ictiofauna (Figura 1).

Vale ressaltar que de todas áreas prioritárias indicadas, oito foram consideradas insuficientemente conhecidas, mas de provável importância biológica. Mesmo nas áreas designadas para outras categorias, o conhecimento ainda é incipiente, sobretudo nas regiões de cabeceiras de rios e riachos, onde é elevado o grau de endemismo. Esses dados, aliados à grande fragilidade dos ecossistemas e ao grau de ameaça existente, justificam a indicação dessas áreas como de alta prioridade para conservação.

1.2 Informações detalhadas sobre as bacias hidrográficas do Paranapanema, Tibagi e Ribeira aplicadas a distribuição da ictiofauna

Na América do Sul, as grandes áreas de endemismo de peixes identificadas são profundamente influenciadas pela distribuição resultante do avanço decorrente da elevação de 100m do nível do mar que ocorreu durante o fim do Mioceno (HUBERT & RENNO, 2006; RIBEIRO, 2006). RIBEIRO (2006) descreve que “as drenagens costeiras do leste do Brasil correspondem a áreas de grande significado biogeográfico, apresentando um alto grau de endemismo em sua fauna de peixes. Padrões filogenéticos sugerem uma relação próxima entre os rios que correm para o Atlântico e os adjacentes das terras altas do escudo cristalino. Entretanto, pouco tem sido dito sobre a dinâmica dos processos geológicos relacionados aos eventos cladogenéticos entre estas áreas. Padrões de distribuição e filogenéticos sugerem uma íntima associação com a história geológica da margem continental passiva da América do Sul, desde o Cretáceo aos dias atuais. Soerguimentos macrodômicos, rifteamento, movimentos verticais entre blocos falhados e o recuo erosivo da

margem leste sul-americana são considerados como as principais forças geológicas atuando sobre a distribuição da ictiofauna de água doce nestas áreas. A atividade tectônica associada à ruptura do Gondwana e separação da América do Sul e África criou seis megadomos que são responsáveis por configurar a maior parte do atual curso das principais bacias hidrográficas do escudo cristalino. Com exceção das bacias localizadas às margens de tais megadomos, estes rios desenvolveram longos e sinuosos circuitos sobre o antigo escudo cristalino brasileiro antes de desaguardem no então recentemente aberto Oceano Atlântico. Eventos cladogenéticos iniciais entre drenagens de terras altas do escudo cristalino e tributários do Atlântico podem estar associados com processos vicariantes desta fase inicial, e alguns táxons antigos, basais, grupos-irmão de táxons muito inclusivos e de ampla distribuição são encontrados nestas bacias hidrográficas. Mais tarde, a denudação erosiva generalizada resultou em um ajuste isostático da margem leste da plataforma. Tal ajuste, concomitantemente a reativações de antigas zonas de falha, resultou em movimentos verticais entre blocos falhados, dando origem, no sudeste do Brasil, a bacias tafrogênicas. Tais bacias, como a de Taubaté, São Paulo, Curitiba e Volta Redonda, entre outras, capturaram drenagens e fauna de terras altas adjacentes. Os peixes fósseis da Formação Tremembé (Eoceno-Oligoceno da Bacia de Taubaté) exemplificam este processo. Outros sistemas tafrogênicos de idade Terciária foram também identificados em outros segmentos da margem continental Atlântica, como na Província Borborema, no NE do Brasil, com marcada influência sobre o padrão de drenagem. Ao mesmo tempo, o recuo erosivo da margem leste da plataforma capturou sucessivamente rios de planalto, os quais se tornaram tributários atlânticos, evoluindo associados aos principais sistemas de falha. A natureza continuada destes processos explica os padrões filogenéticos e de distribuição miscigenados

entre os tributários atlânticos e as terras altas do escudo cristalino adjacente, especialmente na margem sudeste do continente, representados por sucessivos, cada vez menos inclusivos, grupos irmãos, associados a eventos cladogenéticos desde o final do Cretáceo ao presente”.

O rio Paranapanema é um importante afluente da bacia do Paraná. Suas nascentes estão localizadas na serra de Paranapiacaba, a menos de 100Km da costa Atlântica, numa latitude de 24°51' sul e longitude 48°10' oeste, a cerca de 900 m acima do nível do mar. Faz a maior parte da fronteira entre os estados do Paraná e São Paulo, desaguando no rio Paraná após percorrer 929Km. Seus principais tributários são os rios Itararé, Pardo, Tibagi e Pirapó (ZILESLE & ARDIZZONE, 1979). Sua bacia de drenagem estende-se por três grandes unidades do relevo brasileiro: o Planalto Atlântico, a Depressão Periférica e o Planalto Arenítico Basáltico Ocidental (AB`SABER, 1970). A Serra de Paranapiacaba, onde situa sua nascente, constitui o divisor de águas das bacias pequenas voltadas para a costa, do Ribeira de Iguape, do Paraíba do Sul e do Paraná (CASTRO et al., 2003).

Um estudo de levantamento ictiofaunístico do rio Paranapanema revelou espécies pertencentes a seis ordens, 16 famílias, 37 gêneros e 52 espécies. Das espécies coletadas, aproximadamente 36% pertencem à ordem Siluriformes, 36% a Characiformes, 11% a Gymnotiformes, 10% a Perciformes, 4% a Cyprinodontiformes e 2% a Symbranchiformes. Neste mesmo estudo os pesquisadores constataram a presença de apenas 0,5% de indivíduos com mais de 15 cm de comprimento padrão, o que demonstra, inequivocamente, a absoluta dominância de peixes de pequeno porte na ictiofauna dos riachos amostrados, reforçando a hipótese de CASTRO (1999) de que a predominância de peixes de pequeno porte é o único

padrão geral de valor diagnóstico registrado até o momento para a ictiofauna de riachos sul-americanos (CASTRO et al., 2003).

O rio Itararé é o principal tributário do alto rio Paranapanema (Km 0,0) em sua margem sul. Seus principais rios de cabeceiras são representados pelos rios Jaguaricatu e Jaguariaíva, compreendendo uma bacia hidrográfica de 5.329 Km² (MAACK, 1968). Essas regiões de cabeceiras do rio Paranapanema, parcialmente incluídas tanto na Mata Atlântica como nos Campos Sulinos, foram diagnosticadas como prioritárias para inventário da ictiofauna e consideradas insuficientemente conhecidas, mas de importância biológica. O rio Jaguariaíva está localizado na região denominada de Norte Pioneiro, a qual nos últimos anos vem sofrendo grande expansão populacional e agroindustrial. Recentemente foi construída a usina hidroelétrica Pesqueiro, no município de Jaguariaíva-PR, nas proximidades do Parque Estadual do Cerrado. Este foi recentemente criado para preservar umas das últimas manchas de cerrado existente no estado, que nos últimos anos vem sofrendo grande impacto das ações antrópicas.

O rio Tibagi é um afluente do rio Paranapanema o qual, por sua vez, deságua no rio Paraná em seu trecho superior, acima de Sete Quedas, pertencendo à sub-região zoogeográfica do Alto Paraná. A ictiofauna do sistema do rio Tibagi só recentemente começou a ser conhecida (BENNEMANN et al., 1995; 2000) e algumas espécies novas já puderam ser descritas como *Schizodon intermedius* (GARAVELLO & BRITSKI, 1993) e uma espécie de *Rhamdiopsis*, exclusiva desse sistema (BOCKMANN et al., 1995), reforçando a hipótese de endemismo para a bacia do Alto Paraná, anteriormente proposto por outros autores (KULLANDER, 1983; VARI, 1991, SHIBATTA, 1993). Segundo SHIBATTA & ORSI (1996), o rio

Tibagi possui 22 famílias, 68 gêneros e 96 espécies de peixes, com predomínio para os Characiformes. Estes resultados, contudo, se referem especialmente às capturas mais intensas realizadas no curso médio e baixo do rio Tibagi, sendo as regiões próximas à cabeceira deste rio ainda pouco exploradas neste sentido. Este rio banha quarenta e oito municípios paranaenses e é o principal responsável pelo fornecimento de água para aproximadamente 14% da população desse estado.

O rio Ribeira é um componente da bacia do Leste nos estados do Paraná e São Paulo. Possui área de 30.474 Km² (23° 45'S / 46° 45'W e 25° 30'S / 50° W), sendo delimitada ao norte e leste pelas bacias dos rios Tietê e Paranapanema, e ao sul, pela bacia do rio Iguaçu. Sua formação geológica é recente, ocorrendo somente a partir do Neo-Cretáceo e princípio do Terciário (MAACK, 1968), contrastando com os rios da bacia do Paraná, geologicamente mais antigos. As cabeceiras do rio Ribeira situam-se na vertente litorânea da Serra de Paranapiacaba, subunidade da Serra do Mar, em área de planalto.

Outro aspecto importante dessa bacia é que ela está inteiramente inserida em uma das maiores áreas remanescentes de Mata Atlântica da região sul e sudeste do Brasil, área esta que, somente no Estado de São Paulo, possui 10 Unidades de Conservação, distribuídas entre Parques e Estações Ecológicas. Além disso, no que se refere ao Estado do Paraná, o rio Ribeira situa-se em uma área que vem passando por um grande processo de desenvolvimento sócio-econômico. Uma das principais características da fauna de peixes do rio Ribeira de Iguape, como também de todas as outras bacias hidrográficas localizadas nas regiões da Floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica, é o seu elevado grau de endemismo, resultado de processos históricos de isolamento. BIZERRIL (1994) estudando o conjunto das bacias costeiras localizadas entre a foz do rio São Francisco e o extremo sul do

estado de Santa Catarina, sugere que o endemismo da fauna de peixes desta área seja superior a 70%. Entretanto, as escassas informações sobre a composição faunística, distribuição e ecologia dos peixes da Mata Atlântica estão dispersas e, muitas vezes baseadas em identificações imprecisas, o que dificulta sobremaneira estudos sobre a distribuição, diversidade e taxa de endemismo das espécies.

1.3 Diversidade citogenética em peixes neotropicais, com especial enfoque às espécies residentes em cabeceiras de rios

Os peixes representam o grupo mais diversificado entre os vertebrados. Mostram uma posição basal na filogenia desse grupo e constitui, desta forma, um dos grupos de organismos mais interessantes para estudos da variabilidade genética e de evolução (NELSON, 1984). Dados citogenéticos disponíveis para cerca de 700 espécies de peixes Neotropicais de água doce já permitem visualizar algumas tendências da evolução cariotípica nesse grupo, considerando número e fórmula cromossômica, sistemas de cromossomos sexuais, cromossomos B, regiões organizadoras de nucléolos, padrões de heterocromatina constitutiva e bandamentos diversos, incluindo análises recentes com hibridação cromossômica *in situ* (OLIVEIRA et al., 1988; MOREIRA-FILHO et al., 1993; GALETTI Jr. et al., 1994; ALMEIDA-TOLEDO, 1998; GALETTI Jr., et al., 1998, entre outros).

As duas ordens mais representativas em número de espécies na região Neotropical são os Characiformes e Siluriformes. Espécies pertencentes a estas ordens mostram uma ampla variabilidade cariotípica, onde se observam grupos com cariótipos bem heterogêneos, ao lado de outros bem mais conservativos na estrutura

cariotípica (ARTONI et al., 2000). Os Characiformes, de modo geral, exibem dois padrões de diversificação cromossômica. No primeiro, grupos, famílias como Erythrinidae ou gêneros como *Astyanax* mostram grande variabilidade quanto ao número e estrutura cromossômica e, no segundo grupo, famílias como Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae e Hemiodontidae mostram pequena variação numérica e estrutural no cariótipo (BERTOLLO et al., 1986; GALETTI Jr. et al., 1994).

Dentre os Characiformes, o gênero *Astyanax* integra uma assembléia de peixes neotropicais, anteriormente alocados na subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977) e que, recentemente, foram colocados como gêneros *insertae sedis*, por não apresentarem evidências consistentes para o monofiletismo (LIMA et al., 2003). Sendo assim, é um grupo de especial interesse em estudos evolutivos e citogenéticos, representado por um grande número de espécies amplamente distribuída pela América do Sul e Central (BRITSKI et al., 1984).

A espécie *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *insertae sedis*) apresenta várias características interessantes para estudos cromossômicos e evolutivos. Entre elas está o grande número de subespécies (FOWLER, 1948), sua distribuição e ocorrência nas cabeceiras de pequenos tributários de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, plasticidade fenotípica (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MAISTRO et al., 1998; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998a; MAISTRO et al., 2000a, MAISTRO et al., 2001), e alto nível de diversidade cromossômica (SOUZA et al., 1995; MAISTRO et al., 1998; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998b; MAISTRO et al., 2000a, MAISTRO et al., 2001). Vários relatos têm demonstrado uma ampla diversidade cromossômica para o número diplóide, morfologia

cromossômica, padrão de bandamento C, Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), ocorrência de micro e macro cromossomos B e triploidia natural em populações desta espécie. De acordo com MOREIRA-FILHO & BERTOLLO (1991) este grupo, possivelmente, representa um complexo de espécies. Recentemente, BERTACO & LUCENA (2006) consideram que este complexo de espécies é representado por aproximadamente 15 espécies.

Análises citogenéticas em populações de *Astyanax fasciatus* de diferentes bacias hidrográficas também evidenciaram uma diversidade cromossômica, com variações no número diplóide ($2n=45-48$) e na morfologia cromossômica, podendo ser identificados citótipos distintos para um mesmo número cromossômico (DANIEL-SILVA, 1996; HERAS, 1998). Além de possíveis rearranjos cromossômicos, estudos recentes vem apontando que cruzamentos entre espécimes com $2n=46$ e $2n=48$ e seus descendentes, poderiam estar implicados nas variações observadas (PAZZA et al., 2006).

Em *Astyanax altiparanae* não foram observadas variações numéricas ($2n=50$). Entretanto, citótipos diferentes puderam ser detectados devido à variação na morfologia dos cromossomos, resultando em números fundamentais diferenciados. Ainda, populações do gênero *Astyanax*, freqüentemente mostram um intenso polimorfismo de tamanho e presença ou ausência de blocos heterocromáticos localizados no braço longo de vários pares acrocêntricos (JUSTI 1993; FAUAZ et al., 1994; DANIEL-SILVA, 1996; SOUZA et al., 1996; HERAS, 1998; MANTOVANI et al., 2000; SOUZA et al., 2001; MATOSO et al., 2002).

Outro grupo de especial interesse em citogenética é a família Crenuchidae. BUCKUP (1993a) relata cerca 80 espécies nominais, das quais 71 são consideradas

válidas e a existência de várias outras ainda não descritas. Dados citogenéticos neste grupo são descritos apenas para os gêneros *Characidium* e *Jobertina* (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; MAISTRO et al., 1998; CENTOFANTE et al., 2001, 2003). O gênero *Characidium* compreende peixes de pequeno tamanho, com um corpo alongado, boca pequena e uma nadadeira anal curta (BUCKUP, op cit.). A exemplo dos *Astyanax*, esse gênero *Characidium* também é amplamente distribuído pela região neotropical, com sua ocorrência restrita a pequenos tributários formando populações isoladas. Apresenta um cariótipo relativamente estável, mostrando um número diplóide $2n=50$ cromossomos de dois braços, usualmente meta-submetacêntricos. Contudo, embora a macroestrutura cariotípica seja relativamente conservada, a localização dos cístrons de rDNA, a ocorrência de cromossomos B e de sistemas de cromossomos sexuais com heterogametia feminina tem caracterizado divergências interpopulacionais nesse grupo (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO, 2006). O estudo comparativo entre as espécies simpátricas *C. gomesi* e *C. cf. zebra*, do córrego Paiol Grande na localidade de São Bento do Sapucaí – SP, mostrou que as duas espécies apresentam $2n=50$ cromossomos, sendo diferenciadas por um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *C. gomesi*.

Nesse grupo de peixes, sistemas de cromossomos sexuais com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW já foram descritos para as espécies *Characidium fasciatum* (MAISTRO et al., 1998 (= *C. cf. gomesi*, CENTOFANTE et al., 2003), *Characidium gomesi* (CENTOFANTE et al., 2001) e *Characidium cf. alipioi*. Nestas três espécies os cromossomos Z e W podem apresentar tamanho comparável entre si ou diferenciado (no caso o W de tamanho menor do que o Z).

No entanto, o cromossomo W sempre é identificado por se mostrar completamente heterocromático (CENTOFANTE et al., 2003).

A família Parodontidae (Characiformes) também tem apresentado características cromossômicas peculiares, que a torna um bom modelo para estudos citogenéticos e evolutivos. É composta por três gêneros: *Apareiodon*, *Parodon* e *Saccodon*, totalizando 37 espécies já descritas (PAVANELLI, 1999; PAVANELLI & BRITSKI, 2003). O gênero *Saccodon* apresenta uma distribuição restrita ao norte da América do Sul e parte do Panamá, enquanto *Apareiodon* e *Parodon* têm uma ampla distribuição pelo continente sul-americano, exceto nas bacias do Atlântico Sul, Patagônia e calha principal do rio Amazonas (PAVANELLI & BRITSKI, 2003). São diferenciados morfologicamente pelo padrão de coloração corpórea, presença de dentes mandibulares laterais em *Parodon* e pelo alto polimorfismo dentário em *Saccodon* (ROBERTS, 1974). Os caracteres considerados diagnósticos para o gênero *Apareiodon* são a ausência de dentes na mandíbula, o número de cúspides dos dentes pré-maxilares, a forma dos ossos operculares e o número de raios peitorais (ROBERTS, 1974; GARAVELLO, 1977). Alguns pesquisadores têm questionado a separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* por estes caracteres morfológicos. Ainda, os sutis caracteres diagnósticos nos gêneros de Parodontidae levam a descrições incompletas, ou mesmo errôneas, gerando problemas taxonômicos dentro da família (PAVANELLI & BRITSKI, 2003).

Os estudo citogenéticos nesta família são restritos a poucas espécies dos gêneros *Apareiodon* e *Parodon*. Embora todas as espécies estudadas mostrarem um número diplóide $2n=54$ cromossomos, dois sistemas de cromossomos sexuais distintos já tem sido descritos. A espécie *A. affinis* do alto Paraná apresenta um sistema de cromossomos sexuais múltiplos com heterogametia feminina

(ZZ/ZW₁W₂) (MOREIRA-FILHO et al., 1980; JESUS et al., 1999; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2000). Nas espécies *P. hilarri* e *Parodon* sp. ocorre um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE, et al., 2003). Por outro lado, são verificados polimorfismos cromossômicos estruturais em *A. affinis* do baixo Paraná (JORGE & MOREIRA-FILHO, 2000, 2004). As RONS não variam em número e sítio cromossômico na maioria das espécies estudadas dos *Apareiodon* (MOREIRA-FILHO et al., 1984; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000). Já no gênero *Parodon* esses sítios são, no geral, mais espécies-específicos (JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; VICENTE et al., 2001). Ainda, a ocorrência de cromossomos supernumerários é relatada para a espécie *A. piracicabae* (FALCÃO et al., 1984). Assim, apesar da aparente conservação cariotípica (2n=54 cromossomos) a família Parodontidae apresenta uma grande diversificação quando relacionada a outras características cromossômicas.

Em Siluriformes, vários estudos citogenéticos vêm sendo conduzidos nas subordens Gymnotoidei e Siluroidei. Entre os Gymnotoidei, verifica-se uma ampla diversidade cariotípica, com diferenças tanto na estrutura quanto no número cromossômico, como ocorre, por exemplo, nos gêneros *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO, 1978; ALMEIDA-TOLEDO et al., 1984; ALMEIDA-TOLEDO, 1998) e *Gymnotus* (FORESTI et al., 1984). Na subordem Siluroidei, a estrutura cariotípica apresenta-se, de uma maneira geral, mais conservada sendo que o número diplóide 2n=56±2 parece representar o número cromossômico basal do grupo (LE GRANDE, 1981). Contudo, mesmo nesta subordem existem exemplos de intensa diversificação cariotípica, como em Loricariidae, com número diplóide variando de 2n=44 a 80 (ANDREATA et al., 1994; ARTONI et al., 1998; ARTONI & BERTOLLO, 1999;

ALVES, 2002; ALVES et al., 2003). A família Callichthyidae e pertence à subordem Siluroidei e seus representantes apresentam acentuada diversidade cromossômica.

O gênero *Corydoras* (Callichthyidae) está amplamente distribuído pela América do Sul com cerca de 115 espécies reconhecidas (NIJSSEN & ISBRUCKER, 1986). Segundo OLIVEIRA et al. (1992) este gênero é composto por cinco grupos de espécies que apresentam similaridades cariotípicas e de conteúdo de DNA. Eventos vicariantes, como os que aconteceram na bacia costeira, são mecanismos que ajudam a explicar a alta diversidade interespecíficas neste grupo (WEITZMAN et al., 1988). Dados cariotípicos e de conteúdo de DNA sugerem um intenso processo de poliploidização na diversificação e história evolutiva desse gênero (OLIVEIRA et al., 1993). O número cromossômico diplóide varia de $2n=40$ a 86 demonstrando ser este um importante marcador citotaxonômico para esses peixes (OLIVEIRA et al., op cit.). Esses mesmos autores analisaram a constituição cariotípica de seis espécies nominais de *Corydoras* provenientes da região costeira do Sudeste do Brasil identificando dois grupos com estrutura cariotípica similares nessa região. Neste caso, somente as espécies alopátricas *C. paleatus* e *C. ehrhardti* apresentam $2n=44$ cromossomos e muita semelhança na macroestrutura cariotípica com diferenças mais consistentes em relação à localização e número das regiões organizadoras do nucléolo. OLIVEIRA et al. (op cit) destacam que a simpatria em *Corydoras*, verificada nesta zona litorânea, está relacionada sempre a espécies de grupos cariotípicos distintos em decorrência da possível evolução polifilética. Num estudo recente, com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial, englobando representantes de duas subfamílias de Callichthyidae, ou seja, Corydoradinae e Callichthyinae, foi verificado que enquanto muitos rearranjos cromossômicos ocorreram na evolução dos Corydoradinae, especialmente em *Corydoras*, o mesmo

não parece ter ocorrido na evolução dos Callichthyinae, que se mostram menos variáveis (SHIMABUKURO DIAS, 2003).

Perciformes é a ordem mais abundante entre os Teleostei. A água doce é o principal habitat de cerca de 14% destas espécies. Das 150 famílias de Perciformes, o cariótipo de representantes de apenas 50 famílias tem sido analisados. Das 420 espécies estudadas, 283 (67%) tem número diplóide de $2n=48$ cromossomos, 124 (30%) tem $2n<48$ e, 13 (3%) $2n>48$ (BRUM, 1995). O número cromossômico diplóide ($2n=48$ acrocêntricos) e o número fundamental ($NF=48$) parecem ser características basais para a ordem Perciformes (BRUM & GALETTI, 1997), especialmente no que se refere a grupos marinhos.

A respeito de peixes Perciformes, o cariótipo de 48 cromossomos de um braço é o mais freqüente entre os ciclídeos. Entretanto, este número diplóide pode variar de $2n=32$ para $2n=60$ cromossomos (FELDBERG et al., 2003). A distribuição bimodal dos números diplóides é evidente quando relacionada à distribuição geográfica das espécies. Ciclídeos africanos tem um número diplóide modal de $2n=44$ cromossomos, com uma variação de 32 para 48 cromossomos e NF (número fundamental) de 44 para 88. Já os ciclídeos neotropicais apresentam um número diplóide modal de $2n=48$ cromossomos, com uma variação de 38 para 60 cromossomos e NF variando de 44 para 118 (FELDBERG, et al., op cit).

Geophagus brasiliensis é uma das espécies de ciclídeos mais comuns no Sul e Sudeste do Brasil. É encontrada em uma grande diversidade de biomas aquáticos brasileiros e, em alguns casos, diferenças morfológicas entre populações são tão marcantes a ponto de sugerir a existência de diferentes espécies. De fato, BRUM et al. (1998) sugerem um provável complexo de espécies para este grupo.

Contudo, as análises citogenéticas em *Geophagus brasiliensis* demonstram um número diplóide conservador, de $2n=48$ cromossomos e $NF=54$ (BRUM et al. op cit.; LOUREIRO 1999) e $NF=56$ (BRUM et al., op cit). Esta espécie é caracterizada por apresentar RONS simples no par cromossômico subtelo/acrocêntrico 5 ou 6 (BRUM et al., 1998; LOUREIRO 1999). Variações no tamanho das Ag-RONS e no tamanho e formas dos cromossomos portadores também foram observadas. BRUM et al. (1998) descrevem uma situação polimórfica para as RONS na população da Lagoa Rodrigo de Freitas –RJ. De acordo com FELDBERG & BERTOLLO (1995a) a evolução cromossômica na família Cichlidae tem sido conservativa, com a maioria das espécies mostrando 48 cromossomos e inversões cromossômicas levando a variações no número fundamental. FELDBERG et al. (2003) consideram que o termo conservativo não é apropriado para descrever a real situação deste grupo, uma vez que, a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos é muito visível, levando a ampla variação do número fundamental desta família.

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Assim como ocorre para grande parte das bacias hidrográficas da América do Sul, muito pouco se sabe sobre a ictiofauna nas regiões da Floresta Ombrófila Densa, Mista e Campos Sulinos. A documentação da diversidade anterior à destruição destas áreas é incompleta, de modo que os dados disponíveis fornecem apenas uma pálida idéia acerca da diversidade de peixes. Na região de divisa entre os estados do Paraná e São Paulo ocorrem bacias hidrográficas na Floresta Ombrófila Densa, catalogada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) como de extrema importância biológica, como é o caso das nascentes do rio Ribeira de Iguape e regiões que fazem parte da transição de biomas, como, por exemplo, as nascentes do rio Paranapanema, com atenção especial à bacia do rio Jaguariaíva, que tem sua ictiofauna ainda não inventariada, apesar de sua importância biológica (MMA, 2000).

O estudo de peixes de pequeno porte em áreas pouco exploradas, como é o caso das cabeceiras de rios e riachos, as quais são caracterizadas por um endemismo provavelmente elevado, constitui uma ação prioritária no entendimento e identificação da ictiofauna ali residente, considerando também a relevância desses biomas em relação à conservação de estoques da variabilidade genética. Um estudo como este pode, portanto, fornecer subsídios para que os diferentes municípios, abrangidos pela área do projeto, possam direcionar ações e gestões de políticas de conservação ambiental.

Assim, foram objetivos do presente trabalho:

a) caracterizar, cariotipicamente, diferentes populações de espécies residentes nas cabeceiras dos rios Ribeira, Jaguariaíva e Tibagi.

b) identificar marcadores cromossômicos informativos para análises comparativas entre espécies e populações em estudo;

c) investigar os níveis de diversidade cromossômica nas áreas de Floresta Atlântica (rio Ribeira), de transição (rio Jaguariaíva) e de formação campestre (rio Tibagi);

d) utilizar os dados obtidos e de literatura, para o entendimento da evolução cariotípica, biodiversidade e distribuição de grupos da ictiofauna, em relação a áreas ecologicamente diversificadas de nosso sistema fluvial;

e) contribuir para um inventário de espécies residentes nas regiões de estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material e Locais de Coleta

Foram estudados exemplares de diferentes populações de espécies de peixes residentes, pertencentes às bacias dos rios Ribeira, Jaguariaíva e Tibagi, estado do Paraná, Brasil (Figura 1). Para cada população foram coletados e processados cerca de trinta exemplares, os quais foram submetidos à identificação taxonômica, do número diplóide modal e realização dos demais procedimentos citogenéticos.

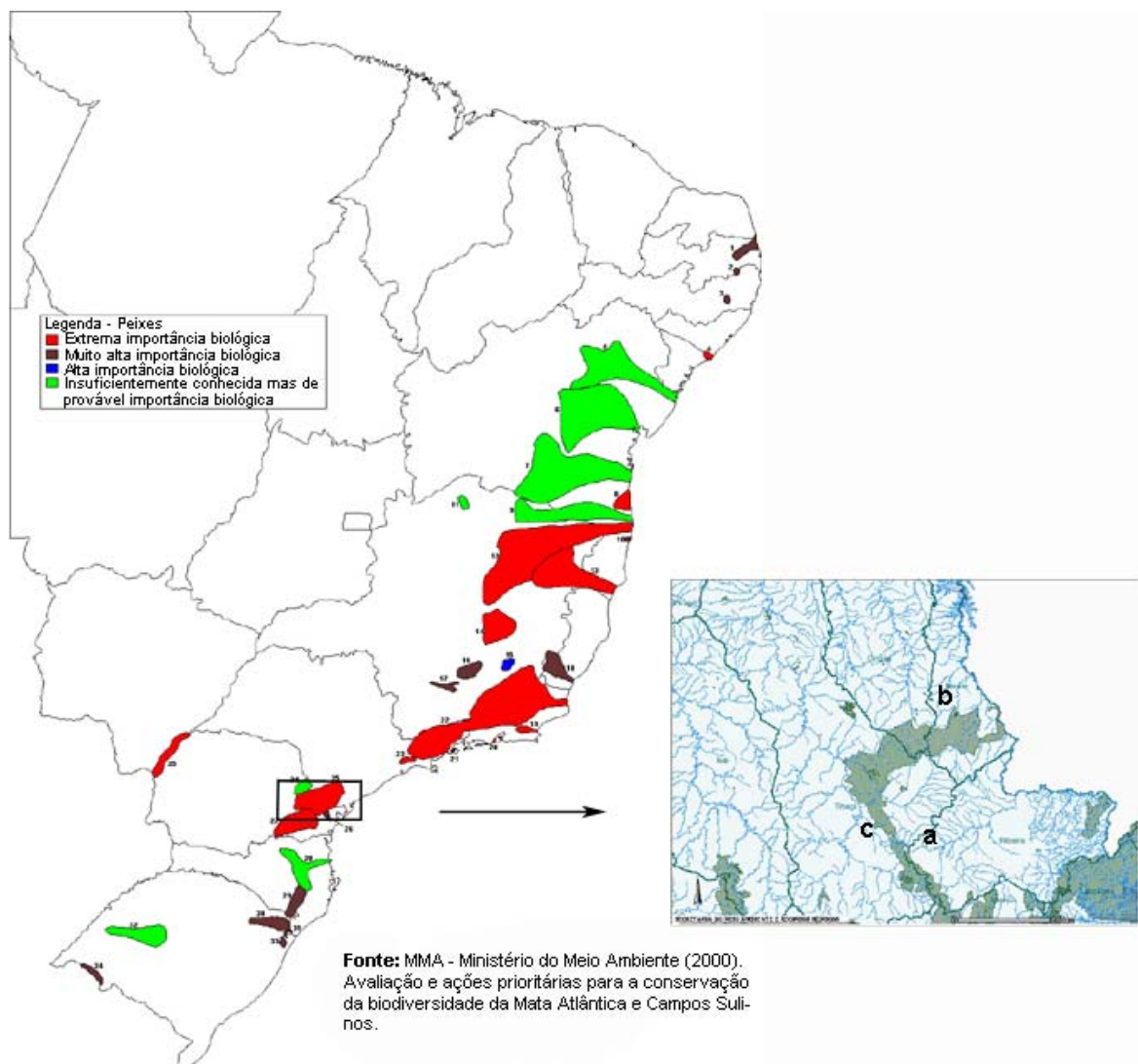


Figura 1: Mapa do Brasil indicando as áreas de importância para estudos de diversidade de peixes, com destaque para a parte leste do estado do Paraná, indicando as áreas em estudo: (a) rio Ribeira, (b) rio Jaguariaíva, (c) rio Tibagi.

3. 2. Métodos

Os exemplares foram coletados com tarrafas, redes de espera e varas de pesca e foram transportados vivos para o laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual de Ponta Grossa, campus de Uvaranas (PR), onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos. O material obtido foi analisado no Laboratório de Citogenética, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos.

3. 2. 1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos

A. Preparações Diretas (BERTOLLO et al., 1978)

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso.
2. Manter o peixe em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos.
3. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
4. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha.
5. Incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos.
6. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.

7. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes.

8. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm.

9. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm.

10. Repetir novamente o item 9.

11. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material.

12. Acondicionar em frascos do tipo Ependorff. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

13. Pingar 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina.

14. Deixar o material secar ao ar.

15. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

16. Lavar com água corrente e deixar secar ao ar.

B. Cultura Celular de Curta Duração (FENOCCHIO et. al, 1991)

1. Anestesiocar o animal colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.1%, sacrificando-o em seguida.

2. Retirar uma porção do rim anterior e colocar o material em uma cuba de vidro, contendo aproximadamente 5 ml de meio de cultura TC199 modificado (Interlab com Licença Flow Laboratories), suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (5mg de penicilina/litro; 10mg de estreptomicina/litro).

3. Dissociar os tecidos, com uma seringa sem agulha, até obter uma suspensão celular homogênea.

4. Incubar o material em uma estufa a 30°C, durante aproximadamente 6 horas.

5. Adicionar 2 gotas de solução de colchicina a 0,017%, 30 minutos antes do término da incubação.

6. Re-suspender o material com uma pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrífuga.

7. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm e eliminar o sobrenadante.

8. Acrescentar 10 ml de solução de KCl a 0,075M e levar a estufa a 36-37°C, durante 25-30 minutos.

9. Repetir os itens 6 a 16, conforme o método anterior (preparação direta).

3. 2. 2. Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG

(SUMNER, 1972, com pequenas modificações).

1. Tratar as lâminas contendo o material celular em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 10 minutos e lavar com água destilada.

2. Incubar a preparação em hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2$) a 5%, recém preparada e filtrada, a 28°C, durante 1 a 2 minutos.

3. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada.
4. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos.
5. Lavar bem, com água destilada e secar ao ar.
6. Corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

3. 2. 3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs

(HOWELL & BLACK, 1980).

1. Colocar, sobre as preparações cromossômicas, 3 gotas de solução de gelatina (1%) e 6 gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%). Misturar levemente com a ponta de uma lamínula, tomando cuidado para não riscar o material.
2. Cobrir a lâmina com uma lamínula (60x20mm) e manter em estufa a 60°C, o tempo necessário para que os cromossomos e núcleos assumam uma coloração amarelada e os nucléolos e as RONS uma coloração quase preta (em geral esse tempo varia entre 3 a 5 minutos).
3. Remover a lamínula com um jato de água destilada.
4. Secar ao ar.
5. Corar o material com solução de Giemsa a 1%, durante 1 minuto.
6. Lavar em água corrente e secar ao ar.

3. 2. 4. Coloração pelo Fluorocromo G-C específico, Cromomicina A₃

(SCHWEIZER, 1980).

1. Colocar cerca de 150 μ l da solução de Distamicina 0,3mg/ml sobre o material, cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos. Escorrer a lamínula e lavar em água corrente, deixando secar por poucos minutos.
2. Adicionar 150 μ l de solução de Cromomicina A₃ (1 mg/ml), cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro.
3. Escorrer a lamínula e lavar em água de torneira.
4. Deixar secar ao ar e montar com uma nova lamínula utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.
5. Manter a lâmina no escuro e examinar com microscopia de fluorescência após cerca de 30 dias.

3. 2. 5. Dupla Coloração pelos Fluorocromos Cromomicina A₃/DAPI

(SCHWEIZER, 1980).

1. Colocar cerca de 80 μ l de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora.
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine; lavar com água. e secar levemente.
3. Colocar cerca de 80 μ l de solução DAPI 0,2 μ g/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos.
4. Lavar a lâmina em tampão McIlvaine, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/McIlvaine; esperar 3 dias para analisar.

OBS: Opcionalmente, a lâmina poderá ser montada com DAPI/Antifading. Neste caso, no passo 3, deverá ser utilizado 80 µl de solução DAPI/Antifading (0,2 µg/ml) e retirado o excesso em papel filtro; a análise poderá ser feita após 15 minutos.

3. 2. 6. Hibridação fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e DNA repetitivo As51

A. Preparação das sondas

Foram empregados três tipos de sondas para a localização dessas seqüências nos cromossomos: (1) uma sonda de rDNA 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr., 2004); (2) uma sonda de rDNA 5S, obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999) e; (3) uma sonda de DNA repetitivo, isolada a partir de digestão enzimática do peixe *Astyanax scabripinnis*, previamente denominada As51 (MESTRINER et al., 2000).

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

B. Marcação das sondas

Dois métodos principais foram utilizados para a marcação das sondas por meio da reação de “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante: (1) marcação indireta empregando-se a adenina biotilada (14 dATP–biotin - Invitrogen), com posterior detecção pela avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada 490/520 nm - Sigma) e; (2) marcação direta, empregando-se ChromaTide Alexa Flúor 546 – 14 dUTP 550/570 nm - Molecular Probes. A solução de hibridação consistiu de 200 µl Formamida (50% de Formamida); 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µl de 20xSSC (concentração final 2xSSC); 80 µl de H₂O qsp., perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 1,5 µg de sonda (DNA marcado com biotina), no caso da hibridação simples, ou 1 µg de sonda 1 (DNA marcado com biotina) + 1 µg de sonda 2 (DNA marcado com ChromaTide Alexa Flúor 546), quando utilizada a hibridação simultânea com duas sondas (Double FISH). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para denaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

C. Preparação das lâminas

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37⁰C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida, foram tratadas com pepsina 0,005% em 10 mM de HCl, por 10 minutos a

37⁰ e lavadas em PBS à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com 90 µl de formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70⁰C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37⁰C, em câmara úmida contendo solução de formamida 60% em 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 50% em 2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42⁰C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60⁰C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão NFDM a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda marcada com biotina, foram colocados sobre as lâminas 90 µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/µl, permanecendo por 30 minutos a 37⁰C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. O sinal de hibridação foi intensificado colocando-se cerca de 90 µl de anti-avidina biotina-conjugada sobre as lâminas, por 30 minutos, seguindo-se três lavagens com solução de Tween 20, cinco minutos cada. Este ciclo será repetido por mais uma vez e complementado novamente pelo tratamento com avidina-FITC e posterior lavagem com Tween 20.

Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então corados com iodeto de propídio + antifade (100 µg/ml), ou opcionalmente com DAPI + antifade (0,2 µg/ml).

3. 2. 7. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro, estabelecendo-se o número diplóide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime) presente em cada espécie/população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus Bx40, usando-se filmes Imagelink (Kodak), regulados para ISO 25, revelados em Dektol (Kodak). As preparações com fluorocromos e hibridação *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx50. As imagens foram capturadas com utilização do software CoolSNAP-pro, Image Pro Plus, 4,1 (Media Cybernetics).

As cópias foram feitas em papel Kodabromide F₃, impressão em papel de qualidade fotográfica e revelação digital. Os cromossomos foram recortados e organizados em pares de homólogos para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de LEVAN et al. (1964) e organizados em classes e ordem decrescente de tamanho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Gênero *Corydoras* da bacia do rio Tibagi

CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *Corydoras* (PISCES, SILURIFORMES, CHALLICHTYIDAE) DO SUL DO BRASIL

ARTONI, R.F.; TERÊNCIO, M.L.; VICARI, M.R.; MATIELLO, M.C.A.; CESTARI, M.M. & BERTOLLO, L.A.C. 2006. Cytogenetics of two sympatric *Corydoras* species (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) of southern Brazil. **Braz. J. Biol.**, 66(1b): 29-41, 2006

Resumo

Dados cariotípicos são apresentados para duas espécies simpátricas de *Corydoras* da Lagoa Dourada, *C. ehrhadti* e *C. paleatus*, pertencentes à bacia do alto rio Tibagi (Ponta Grossa, Paraná, Brasil). O mesmo número diplóide e fórmula cariotípica foram observados em ambas espécies. Grande similaridade foi verificada também para a distribuição da heterocromatina constitutiva e atividade das regiões organizadoras de nucléolos. O emprego da hibridação *in situ* com sonda fluorescente de DNAr 18S possibilitou diferenciar as espécies através da localização dos sítios ribossomais.

Introdução

O gênero *Corydoras* (Callichthyidae) está amplamente distribuído pela América do Sul com cerca de 142 espécies reconhecidas (REIS, 1998). Segundo OLIVEIRA et al. (1992) este gênero é composto por cinco grupos naturais de espécies, cada um deles se caracterizando por similaridades cariotípicas e conteúdo de DNA. Eventos vicariantes, como os que aconteceram em bacias costeiras, são mecanismos que ajudam a explicar a alta diversidade interespecíficas neste grupo (WEITZMAN et al., 1988).

Dados cariotípicos e de conteúdo de DNA sugerem um intenso processo de poliploidização na diversificação e história evolutiva desse gênero, entre outros rearranjos cromossômicos (OLIVEIRA et al., 1993a, b). O número cromossômico diplóide varia de $2n=40$ em *C. nattereri* (OLIVEIRA et al., 1990) a $2n=134$ em *C. aeneus* (TURNER et al., 1992), enquanto o conteúdo de DNA nuclear varia entre 1.04 ± 0.09 pg em *C. cf. simulatus* a 8.75 ± 1.50 pg em *C. metae* (OLIVEIRA et al., 1992).

No presente estudo, investigamos a estrutura cariotípica de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* em uma zona de simpatria, destacando suas semelhanças, bem como algumas diferenças cromossômicas que possibilitam diagnosticar as espécies em questão.

Material e Métodos

Duas espécies de *Corydoras*, *C. ehrhardti* (9 machos e 10 fêmeas) e *C. paleatus* (12 machos e 8 fêmeas), da bacia do alto rio Tibagi (Lagoa Dourada, Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil, $50^{\circ}03'W$, $25^{\circ}14'S$) foram estudadas citogeneticamente (Figuras 1 e 2 G, H).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO et al, 1978). A heterocromatina constitutiva foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972) e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foram evidenciadas com o emprego do Nitrato de Prata (HOWELL & BLACK, 1980).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para mapear o rDNA nos cromossomos, seguindo o protocolo descrito por PINKEL et al. (1986). Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S, obtida por PCR a partir do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr., 2004). A sonda foi marcada com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). Os cromossomos metafásicos foram tratados com RNase (40µg/ml em 2xSSC) a 37°C por 1 hora e pepsina (0,005% em 10mM HCl) a 37°C por 10 minutos, sendo desnaturados em formamida/2xSSC 70% por 5 minutos. A solução de hibridização consistiu de formamida 50%, 2xSSC, sulfato dextran (10%) e sonda desnaturada. Depois da hibridização “over night” a 37°C, as lâminas foram lavadas em formamida 50% a 42°C por 20 minutos e 0,1xSSC a 60°C por 15 minutos. O sinal de hibridização foi detectado usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotilado. Os cromossomos foram contracolorados com iodeto de propídio (50µg/ml) e analisados em microscópio de epifluorescência, Olympus BX50. As figuras foram capturadas utilizando-se o software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), em ordem decrescente de tamanho, de acordo com a relação de braços (LEVAN et al., 1964). O número de braços cromossômicos (NF) foi determinado considerando os cromossomos m/sm portadores de dois braços.

Resultados

As duas espécies de *Corydoras*, *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, apresentaram o mesmo número diplóide ($2n=44$) e o mesmo número fundamental ($NF=88$), com fórmula cariotípica composta de 9 pares cromossômicos metacêntricos e 24 submetacêntricos (Tabela I). O primeiro par de cromossomos metacêntricos destaca-se por apresentar tamanho bem maior que os demais metacêntricos. Não foi constatada a ocorrência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (Figura 2 A, D).

A heterocromatina constitutiva está distribuída em grandes blocos na região pericentromérica, presentes em cromossomos comparáveis entre as duas espécies, marcadamente no par número 2 metacêntrico e nos pares 10 e 13 submetacêntricos (Figura 2 C, F). As regiões organizadoras de nucléolo, evidenciadas pelo nitrato de prata (Ag-RONs), foram evidentes em um único par metacêntrico, em posição terminal no braço longo, tanto em *C. ehrhardti* como em *C. paleatus* (Figura 2 B, E).

A hibridação fluorescente *in situ* confirmou a presença de rDNA 18S coincidentemente às Ag-RONs. Contudo, a espécie *C. paleatus* apresentou um pequeno cromossomo submetacêntrico, com um sítio adicional no braço longo (Figura 3). Foi também verificada uma diferença de tamanho dos cístrons ribossomais do par metacêntrico médio entre as duas espécies, onde *C. paleatus* apresenta cístrons visivelmente maiores.

Discussão

Segundo OLIVEIRA et al. (1992), o gênero *Corydoras* é composto por cinco grupos de espécies que se diferenciam por características cariotípicas e de conteúdo de DNA. *C. paleatus* e *C. ehrhardti* pertencem a um mesmo grupo, presente na

região costeira do sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al. 1993a). A simpatria de diferentes espécies de *Corydoras*, quando presente nesta zona litorânea, sempre aponta para espécies de grupos cariotípicos distintos, em decorrência da possível evolução polifilética (OLIVEIRA et al., *op. cit.*).

Neste trabalho é descrita a primeira ocorrência simpátrica de duas espécies de *Corydoras* pertencentes a um mesmo grupo cariotípico. A Lagoa Dourada, onde foram coletados os exemplares ora estudados, faz parte da bacia hidrográfica do rio Tibagi, no segundo planalto paranaense no interior do continente. Assim, as condições especiais de vicariância e distribuição das espécies litorâneas, proposta por WEITZMAN et al. (1988), parece se aplicar, no caso do gênero *Corydoras*, apenas para a região costeira. No interior do continente a distribuição atual das espécies desse gênero deve representar eventos históricos de biogeografia e especiação mais complexos, mesmo porque *C. ehrhardti* não realiza migração, enquanto *C. paleatus* migra a curtas distâncias (WINEMILLER, 1989; BURGESS, 1989).

A análise cariotípica de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* revela grande semelhança na macroestrutura cariotípica (18M + 26SM), com outras populações dessas espécies. Pequenas alterações nas fórmulas cariotípicas devem ser provavelmente decorrentes de ajustes de pareamento dos cromossomos, não interferindo na conclusão de que estas espécies devem fazer parte de um ramo monofilético, com ancestral comum no gênero.

A distribuição da heterocromatina constitutiva é um poderoso marcador em nível populacional para essas espécies. *C. paleatus* e *C. ehrhardti* apresentam bandas pericentroméricas fortemente heterocromáticas em cromossomos homeólogos. Contudo, é interessante destacar que em outras populações de *C.*

paleatus estas bandas são bastante variáveis. Assim, numa população da região de Curitiba (Paraná, Brasil), a heterocromatina apresentou-se em pequenos blocos, mais uniformemente distribuída entre os cromossomos do complemento cariotípico, enquanto que na população proveniente do rio Grande (Rio Grande do Sul, Brasil), a heterocromatina apresentou-se em grandes blocos restritos a um número menor de cromossomos (OLIVEIRA et al., 1993a).

Contrariamente ao esperado, a população de *C. paleatus* da Lagoa Dourada apresentou um cariótipo similar ao da população de *C. paleatus* do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 1993a), diferenciando-se então da população de Curitiba da qual, em termos geográficos, encontra-se mais proximamente situada. Apesar da população de *C. paleatus* da Lagoa Dourada possuir maior similaridade com a população do rio Grande do Sul, diferenças cariotípicas menores são verificadas, provavelmente em decorrência da fixação de rearranjos cromossômicos em populações isoladas, a exemplo do que ocorre em outras espécies de peixes neotropicais, como em *Hoplias malabaricus* (BERTOLLO et al., 2000) e *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991).

Em *C. ehrhardti* a banda C também é informativa quanto a diferenciações populacionais. Diferenças evidentes foram encontradas no que se refere ao primeiro par submetacêntrico, que aparece com grandes blocos heterocromáticos na população aqui analisada, enquanto que a população de Jaraguá do Sul (Santa Catarina, Brasil) não apresenta marcação alguma neste par cromossômico (OLIVEIRA et al., 1993a).

Outras diferenças populacionais consistentes podem ser destacadas em relação à presença e atividade das regiões organizadoras dos nucléolos (RONs). OLIVEIRA et al. (*op. cit.*) detectaram Ag-RONs variando de um a dois pares em *C.*

ehrharti e de um a três pares em *C. paleatus*. No presente estudo as Ag-RONs foram evidentes em apenas um par metacêntrico, na região terminal do braço longo, tanto em *C. ehrhardti* como em *C. paleatus* (Figura 2 B, E). Uma grande heterogeneidade tem sido observada entre os peixes no que se refere ao número e tamanhos das RONS. Especificamente entre os Siluriformes, tem sido constatados grupos que apresentam espécies com RONS simples (um par somente), como é o caso de Pimelodidae (DIAS & FORESTI, 1993; FENOCCHIO, 1993; FENOCCHIO & BERTOLLO, 1992a), Ageneiosidae (FENOCCHIO & BERTOLLO, 1992b) e Doradidae (FENOCCHIO et al., 1993), ao lado de grupos que apresentam espécies com RONS simples ou múltiplas, como ocorre entre os Callichthyidae (OLIVEIRA et al., 1988; OLIVEIRA, 1991; PORTO & FELDBERG, 1992) e Loricariidae (ARTONI & BERTOLLO, 2001).

Em adição às Ag-RONs, *C. paleatus* evidenciou um sítio adicional de rDNA 18S em um cromossomo submetacêntrico, em oposição a *C. ehrhardti* onde este sítio não foi observado (Figura 3). Esta parece ser a diferença cariotípica mais diagnóstica entre *C. paleatus* e *C. ehrhardti* em simpatria no alto rio Tibagi. FISH com sondas de rDNA 18S tem auxiliado a detectar a presença de RONS inativas em cromossomos de peixes, tanto associadas a cromossomos sexuais (ARTONI & BERTOLLO, 2002) como em casos de múltiplos lócus silenciosos (CENTOFANTE et al., 2003).

A pouca divergência cariotípica entre as duas espécies ora analisadas evidencia o alto grau de proximidade entre as mesmas. Contudo, não foram encontrados indícios de que elas possam originar híbridos interespecíficos, mesmo sendo encontradas em simpatria. Assim sendo, é possível que o isolamento

reprodutivo entre *C. paleatus* e *C. ehrhardti* seja devido às suas diferenças gênicas, ou mesmo outros fatores biológicos, como o comportamento reprodutivo.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) e Paranaturismo, pela licença de captura de peixes no Parque Estadual de Vila Velha. A FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Referências

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

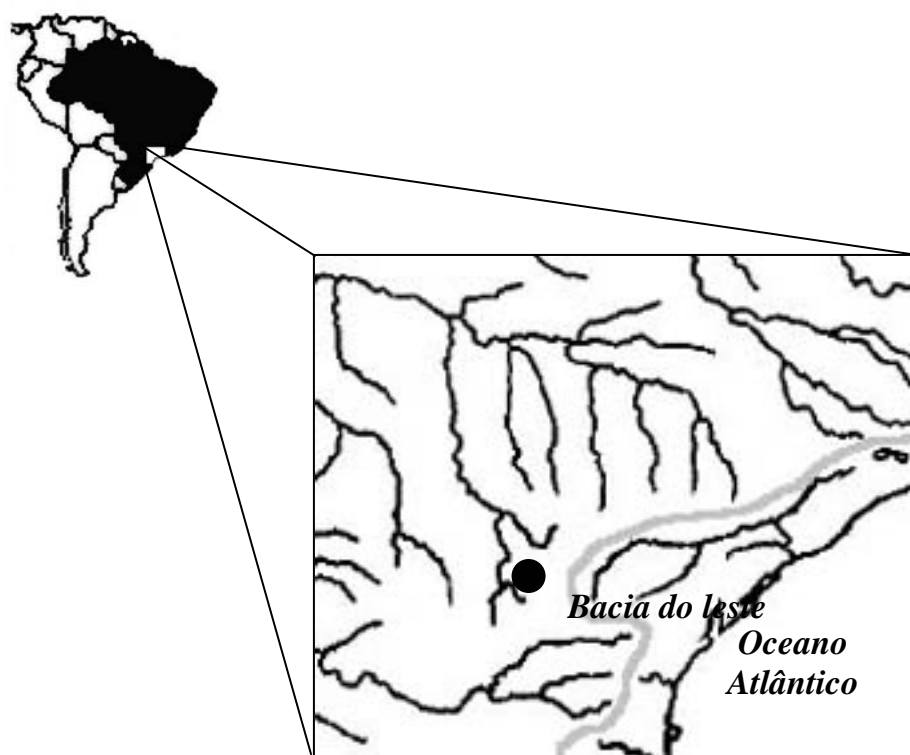


Figura 1. Mapa da América do Sul mostrando a região de coleta em detalhe. Os rios costeiros são separados na figura dos rios continentais por uma linha imaginária cinza. O local do alto rio Tibagi (Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil), onde foram coletados espécimes de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* está destacado por um ponto preto.

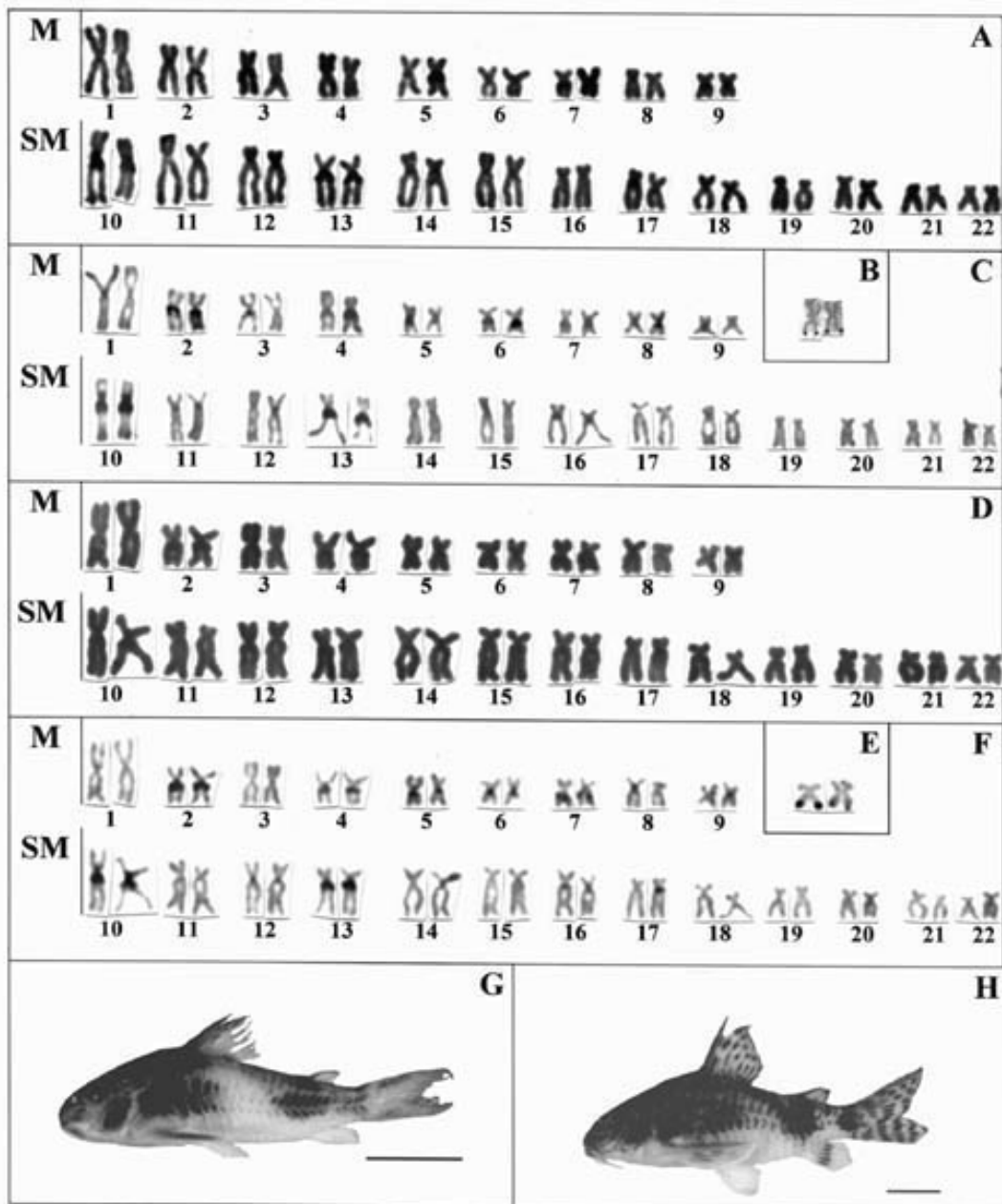


Figura 2. Cariótipos, cromossomos e espécime de *Corydoras ehrhardti* (A, C, B, G) e *Corydoras paleatus* (D, F, E, H), respectivamente. Em (A, D) estão sendo evidenciados os cariótipos corados por Giemsa. (C, F) apresentam o padrão da distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C. As caixas (B, E) destacam os cromossomos portadores das RONS corados pelo nitrato de prata. Em (G, H) são apresentados os espécimes de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. Barras: 10 μ m (cariótipos) e 10 mm (espécimes).

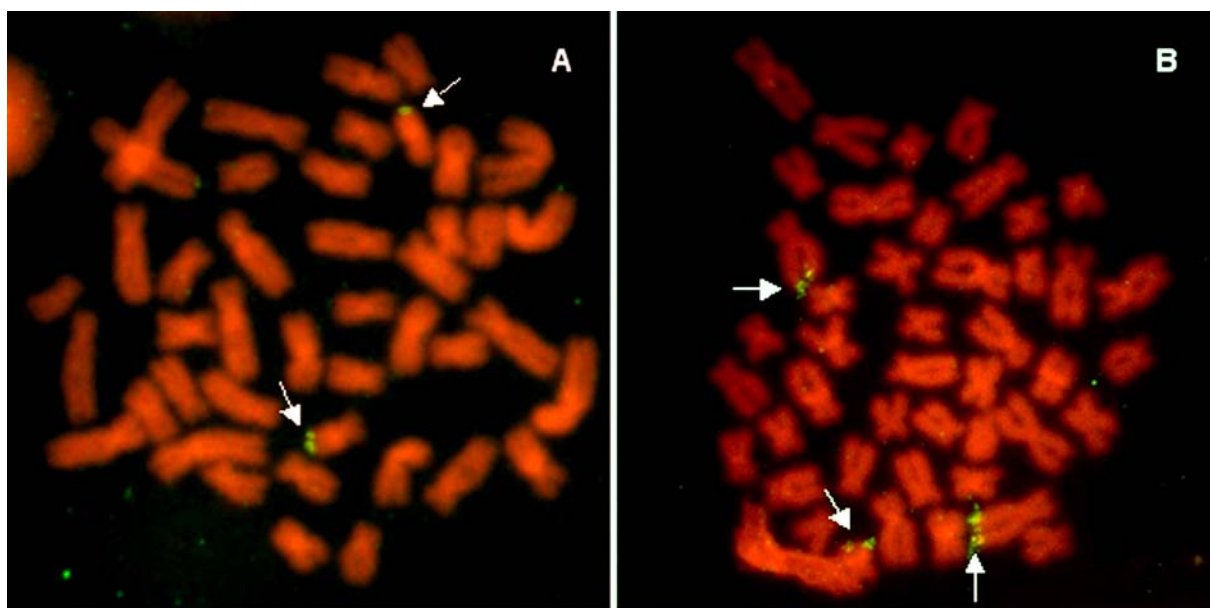


Figura 3. *Corydoras ehrhardti* (A) e *Corydoras paleatus* (B): cromossomos mitóticos submetidos à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S. As setas indicam a localização das regiões organizadoras de nucléolo nas duas espécies.

Tabela I. Dados cromossômicos obtidos para as espécies de *Corydoras* em condição de simpatria.

Espécies	Localidade	Número de espécimes m / f	2n	Cariótipo				NF	Crom. com Ag-NORs / 18S rDNA
				M	SM	ST	A		
<i>C. ehrhardti</i>	L. Dourada.								1 M /
	Ponta Grossa, PR, Brasil	9 / 10	44	18	26	0	0	88	1 M ; 1 SM
<i>C. paleatus</i>	L. Dourada.								1 M /
	Ponta Grossa, PR, Brasil	12 / 8	44	18	26	0	0	88	1 M

m = macho, f = fêmea, 2n = número diplóide, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico, NF = número fundamental, Ag-NORs = regiões organizadoras de nucléolo, 18S rDNA = hibridação *in situ* fluorescente com rDNA 18S.

4.2 *Apareiodon* sp. da bacia do rio Tibagi

SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW EM UMA ESPÉCIE NÃO DESCRITA DO GÊNERO *Apareiodon* (CHARACIFORMES, PARODONTIDAE)

VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F. & BERTOLLO, L.A.C. 2006. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet Genome Res**, 114:163–168.

Resumo

Os cromossomos de uma espécie não descrita do gênero *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae) proveniente do rio Verde, cabeceira do rio Tibagi (Estado do Paraná, Brasil), foram investigados mediante coloração Giemsa convencional, bandamento C, Ag-NORs, CMA₃ e hibridação fluorescente *in situ* utilizando sondas de rDNA 18S e 5S. O número diplóide desta espécie é 2n=54 cromossomos, com cariótipos compostos por 48 cromossomos meta/submetacêntricos + 6 subtelocêntricos nos machos, e 47 cromossomos meta/submetacêntricos + 7 subtelocêntricos nas fêmeas. Esta diferenciação entre os sexos é devida a um sistema de cromossomos sexuais simples, uma característica citotaxonômica previamente observada na família Parodontidae apenas em alguns representantes do gênero *Parodon*. A presença de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos similares e/ou idênticos sugere que espécies do gênero *Parodon* e *Apareiodon* portadoras dos cromossomos sexuais ZZ/ZW heteromórficos constituam um grupo monofilético, uma hipótese a ser testada por uma filogenia molecular robusta na família.

Introdução

A família Parodontidae (Characiformes) é composta por apenas três gêneros: *Apareiodon*, *Parodon* e *Saccodon*, com 37 espécies válidas (PAVANELLI, 1999; PAVANELLI & BRITSKI, 2003). Os gêneros *Apareiodon* e *Parodon* têm uma ampla distribuição pelo continente sul-americano, já apresentando diversos estudos cromossômicos (MOREIRA-FILHO et al., 1985, 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000a, b; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2000; VICENTE et al., 2001). Por sua vez, o gênero *Saccodon* apresenta uma distribuição restrita ao norte da América do Sul e é o único onde ainda não se realizou nenhum estudo citogenético. Esses três gêneros são diferenciados por poucas características morfológicas PAVANELLI & BRITSKI (2003), os caracteres diagnósticos sutis para os peixes de parodontídeos podem levar a descrições incompletas, ou mesmo a um tratamento taxonômico incorreto.

Embora cromossomos sexuais heteromórficos não sejam geralmente encontrados na maioria dos peixes, dois sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos distintos foram já descritos na família Parodontidae: um sistema ZZ/ZW₁W₂ em *Apareiodon affinis* (MOREIRA-FILHO et al., 1980) e um sistema ZZ/ZW em *Parodon hilarri* (MOREIRA-FILHO et al., 1993) e *Parodon moreirai* (citado como *Parodon* sp. em CENTOFANTE et al., 2002).

No presente estudo, o cariótipo, características cromossômicas e o sistema de cromossomos sexuais heteromórfico ZZ/ZW, na até então formalmente não descrita espécie de *Apareiodon* foram analisados. A provável origem e evolução dos cromossomos sexuais heteromórficos foram brevemente hipotetizados na família Parodontidae.

Materiais e Métodos

Foram estudados 26 espécimes (15 fêmeas e 11 machos) de *Apareiodon* (Parodontidae), provenientes do rio Verde, município de Ponta Grossa, Estado do Paraná, Brasil (25°04'81"S; 50°04'63"W - Figura 1a). Exemplares testemunhos foram depositados no Museu do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPELIA) - Universidade Estadual de Maringá (Paraná), sob os lot (3443 e 3447), para descrição e identificação taxonômica. Provisoriamente, a espécie está sendo relatada como *Apareiodon* sp.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento "*in vivo*" com colchicina (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972) e as regiões ricas GC pela coloração com fluorocromo cromomicina A₃ (SCHMID, 1980).

As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas com emprego do nitrato de prata (Ag-NORs), de acordo com HOWELL & BLACK (1980) e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para localizar os sítios de rDNA 18S nos cromossomos. Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA, 2000). Uma sonda de rDNA 5S, similarmente obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999) foi utilizada para mapear os sítios de rDNA 5S nos cromossomos. Ambas as sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por "nick translation", seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). As metáfases cromossômicas foram tratadas de acordo com PINKEL et al. (1986) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As

imagens cromossômicas foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Cerca de trinta metáfases foram analisadas em cada espécime para determinar o $2n$ e a estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados de acordo com (LEVAN et al., 1964).

Resultados

Espécimes examinados de *Apareiodon* sp. possuem invariavelmente $2n=54$ cromossomos e o número fundamental $NF=108$, para ambos os sexos. No entanto, os machos apresentaram 48 cromossomos meta/submetacêntricos (m/sm) e 6 subtelo-cêntricos (st), e as fêmeas mostraram 47 m/sm e 7 cromossomos st. Assim, o cariótipo de fêmeas diferiu do cariótipo de machos pela ausência de um elemento do par cromossômico 21 m e pela presença de um grande elemento cromossômico st (Figuras 2 e 3).

A heterocromatina constitutiva foi constatada na região centromérica/pericentromérica de todos cromossomos, na região telomérica de vários pares autossômicos e, em todo braço curto do par 11 (Figura 2 B, 3B). O cromossomo Z também mostrou o segmento distal do braço mais curto heterocromático. No cariótipo de machos, um bloco heterocromático mais conspícuo é visível na região pericentromérica dos cromossomos Z (Figura 2 B) em comparação àquele único cromossomo Z do cariótipo de fêmea (Figura 3 B). Do contrário, o cromossomo W, apresentou o braço curto totalmente eucromático enquanto o braço maior foi quase totalmente heterocromático, com um pequeno segmento intersticial eucromático (Figura 3 B).

As Ag-RONs e os sítios de rDNA 18S positivos foram localizadas na posição terminal do braço longo do par subtelocêntrico nº. 25. Um heteromorfismo de tamanho deste sítio foi freqüentemente observado, independentemente do sexo dos animais (Figura 4 A, B).

Os sítios de rDNA 5S foram localizados no braço curto, mais aproximadamente ao centrômero, de um par de cromossomos submetacêntricos não identificado (Figura 4 d). CMA₃-fluorescente revelou sinais positivos em dois pares cromossômicos distintos: um coincidente com o sítio Ag-RON/18S rDNA positivo, enquanto o outro corresponde provavelmente ao sítio de rDNA 5S (Figura 4 C).

Discussão

Embora a maioria das espécies da família Parodontidae apresente o número diplóide $2n=54$ constante e uma aparente conservação na estrutura cariotípica, polimorfismos cromossômicos estruturais já foram encontrados em *A. affinis* (JORGE & MOREIRA-FILHO, 2000, 2004), ocorrência de cromossomo supranumerário em *A. piracicabae* (FALCÃO et al., 1984) e cromossomos sexuais com heterogametia feminina em *P. hilarii* (MOREIRA-FILHO, et al., 1993), *P. moreirai* (INGENITO & BUCKUP, 2005), citado como *Parodon* sp. (CENTOFANTE et al., 2002), e em *A. affinis* (MOREIRA-FILHO et al., 1980).

Apareiodon sp. manteve o mesmo $2n=54$, mas evidenciou um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo Z é um pequeno m, e o cromossomo W é um grande st sendo um dos maiores cromossomos do complemento (Figuras 2 e 3).

Apareiodon sp. é uma espécie morfológicamente semelhante à *A. ibitiensis*. Entretanto, nenhum heteromorfismo de cromossomos sexuais foi relatado nesta espécie (MOREIRA-FILHO et al., 1984; 1985; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000a). Por outro lado, uma outra espécie de *Apareiodon* com um sistema de cromossomos sexuais (*A. Affinis*) é caracterizado por um sistema de cromossomos sexuais múltiplo, do tipo ZZ/ZW₁W₂, onde os machos apresentam 2n=54 cromossomos e as fêmeas 2n=55 cromossomos (MOREIRA-FILHO et al., 1980). Assim sendo, *Apareiodon* sp. apresenta características cromossômicas peculiares que o distingue de todas as demais formas de *Apareiodon*, o que reforça sua condição de um novo taxa nesse gênero.

A localização dos sítios de rDNA maior com Ag-RONs e sonda de rDNA 18S em região telomérica do braço longo de um grande par cromossômico st têm sido mostrado em todas espécies de *Apareiodon* já estudadas (MOREIRA-FILHO et al., 1984; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000a). Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS tem se mostrado como características espécies-específicas (JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; VICENTE et al., 2001). No que se refere ao rDNA 5S, os dados disponíveis indicam que sua localização nos cromossomos de *Apareiodon* sp., i.e, próximo a região centromérica de um par submetacêntrico, também pode ser verificada em outras espécies de peixes parodontídeos (CENTOFANTE et al., 2002). Do contrário, mais de quatro sítios com localizações variáveis podem ocorrer em algumas espécies do gênero *Parodon* (VICENTE et al., 2001). Há uma provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com a heterocromatina GC-rica em *Apareiodon* sp. Esta coincidência também foi verificada em *Parodon nasus* (citado como *P. tortuosus*), mas, neste caso, os sítios são ligados no par cromossômico 25 st do cariótipo: os sítios de rDNA 5S na região telomérica do braço

curto e o sítio 18S na região telomérica do braço longo (VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTTE et al., 2005).

A distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos de *Apareiodon* sp. foi similar ao padrão geral de distribuição observado no cariótipo de outras espécies de Parodontidae, bem como os blocos heterocromáticos conspícuos no braço longo do cromossomo W naquelas espécies com um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (MOREIRA-FILHO et al., 1984; MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS et al., 1999; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000a, b; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2004).

Os Parodontidae apresentam três estados de cariótipo quanto à presença ou ausência de cromossomos sexuais: (1) cariótipos sem um heteromorfismo aparente entre os sexos, onde se enquadra a grande maioria das espécies; (2) cariótipos com heterogametia feminina devida a um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW e (3) cariótipos com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW₁W₂. Nas três espécies com o sistema ZZ/ZW, *Parodon hilarri*, *P. moreirai*, citado como *Parodon* sp. e *Apareiodon* sp. o cromossomo W é maior que o cromossomo Z, com o braço longo quase completamente heterocromático, sugerindo uma amplificação da heterocromatina no cromossomo ancestral. De fato, em algumas espécies de peixes Neotropicais, a amplificação da heterocromatina surge como um modelo plausível para explicar a diferenciação dos cromossomos W ou Y (GALETTI Jr. & FORESTI, 1986; MOREIRA-FILHO et al., 1993; BORN & BERTOLLO, 2000; ARTONI et al. 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2001). Em peixes Poeciliidae, a amplificação de seqüências repetitivas ocorre nos cromossomos sexuais, como descrito para o cromossomo Y de *Xyphophorus maculatus* (NANDA et al., 2000). Duplicação gênica e/ou crossing-over desigual envolvendo seqüências de DNA repetitivas são alguns

processos conhecidos que podem alterar as quantidades de heterocromatinas nos cromossomos. Na espécie *Parodon hilarii* o cromossomo W é subtelocêntrico e o maior do complemento (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; VICENTE et al., 2003). Muito provavelmente, a diferenciação do cromossomo W em *Apareiodon* sp. ocorreu a partir da amplificação da heterocromatina presente próxima a região centromérica, no braço curto de um cromossomo ancestral similar ao cromossomo Z (par 21 no cariótipo), originando assim o braço longo do cromossomo W atual (Figura 5). Esta hipótese está de acordo com o modelo de origem do cromossomo W proposto nas espécies do gênero *Parodon* (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003), evidenciando uma provável origem comum para o sistema ZZ/ZW nestas espécies da família Parodontidae.

O sistema ZZ/ZW era, até recentemente, conhecido apenas para o gênero *Parodon* (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003). A ocorrência do mesmo sistema de cromossomos sexuais em *Apareiodon* sp. é uma novidade para a família Parodontidae. Contudo, concomitantemente aos nossos resultados, um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW também ocorre na espécie *Apareiodon vladii* (PAVANELLI, 2006) citado como *Apareidon* sp., no qual os cromossomos sexuais tiveram uma morfologia similar ao encontrado no presente estudo, e um provável mecanismo idêntico de diferenciação do cromossomo W (ROSA et al., 2006). Assim, o sistema ZZ/ZW pode não ser um estado homoplásico para *Parodon* e *Apareiodon*, e sim uma sinapomorfia. Uma provável origem em comum para estes sistemas de cromossomos sexuais na família Parodontidae é uma hipótese plausível a ser testada por uma filogenia molecular robusta no grupo e mapeamento dos dados citotaxonômicos em Parodontidae.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA nº 02017.000686/00-21), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós somos gratos também ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela assistência de campo e laboratório.

Referências

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

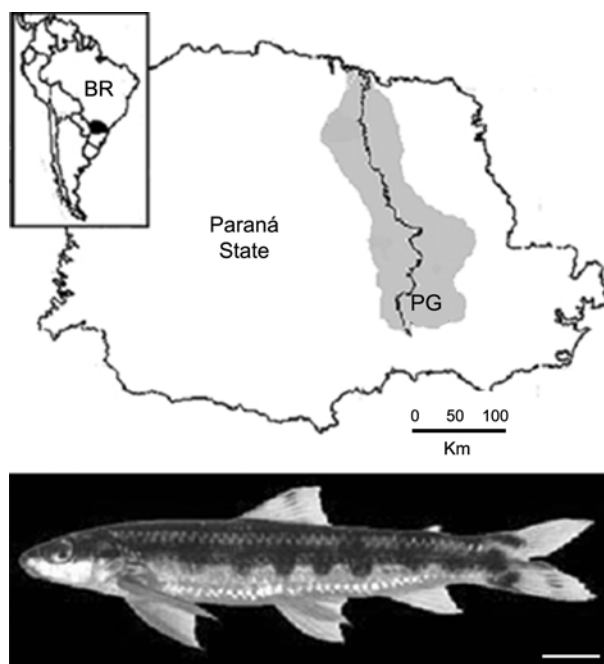


Figura 1. Mapa da América do Sul, com destaque para o estado do Paraná (Brasil). Em (a) está representada a bacia do rio Tibagi (em cinza) e região de Ponta Grossa (PG). Em (b) um espécime fêmea cariotipado de *Apareiodon* sp. (voucher No. 3447). Barra = 2 cm.

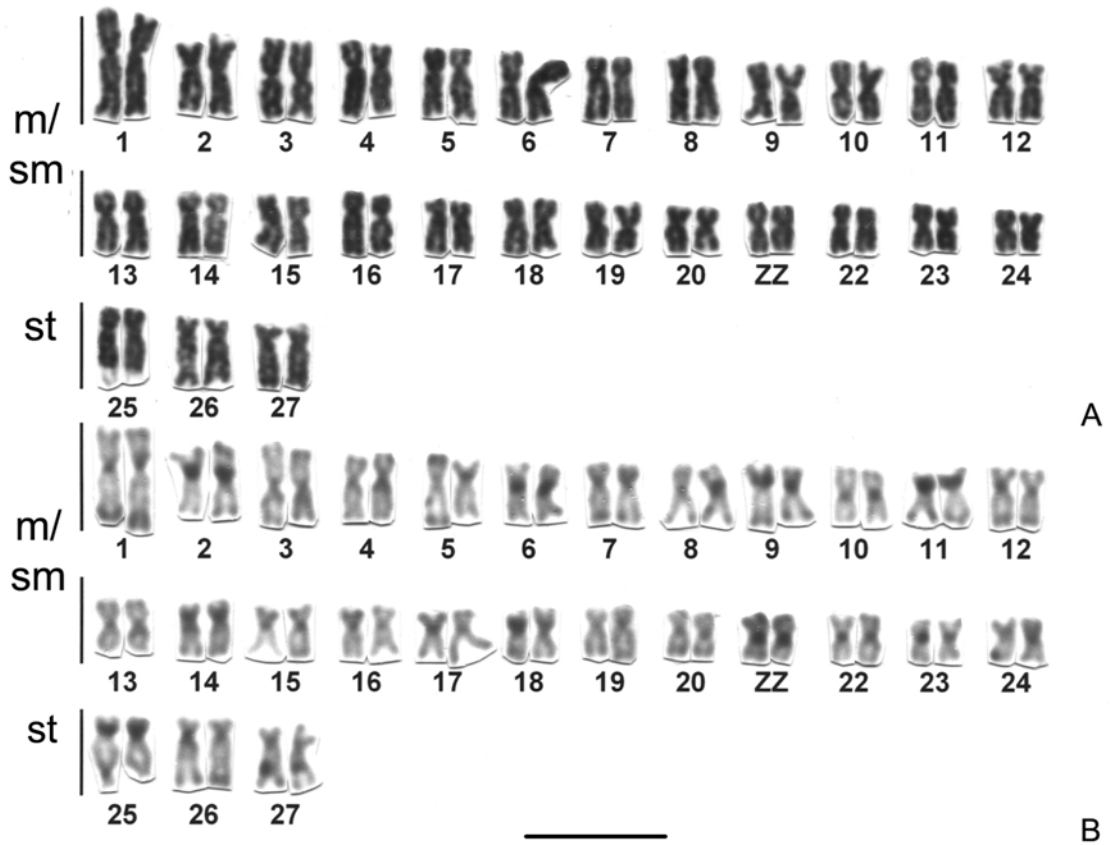


Figura 2. Cariótipos de *Apareiodon* sp. macho, do rio Verde, em coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra representa 5 µm.

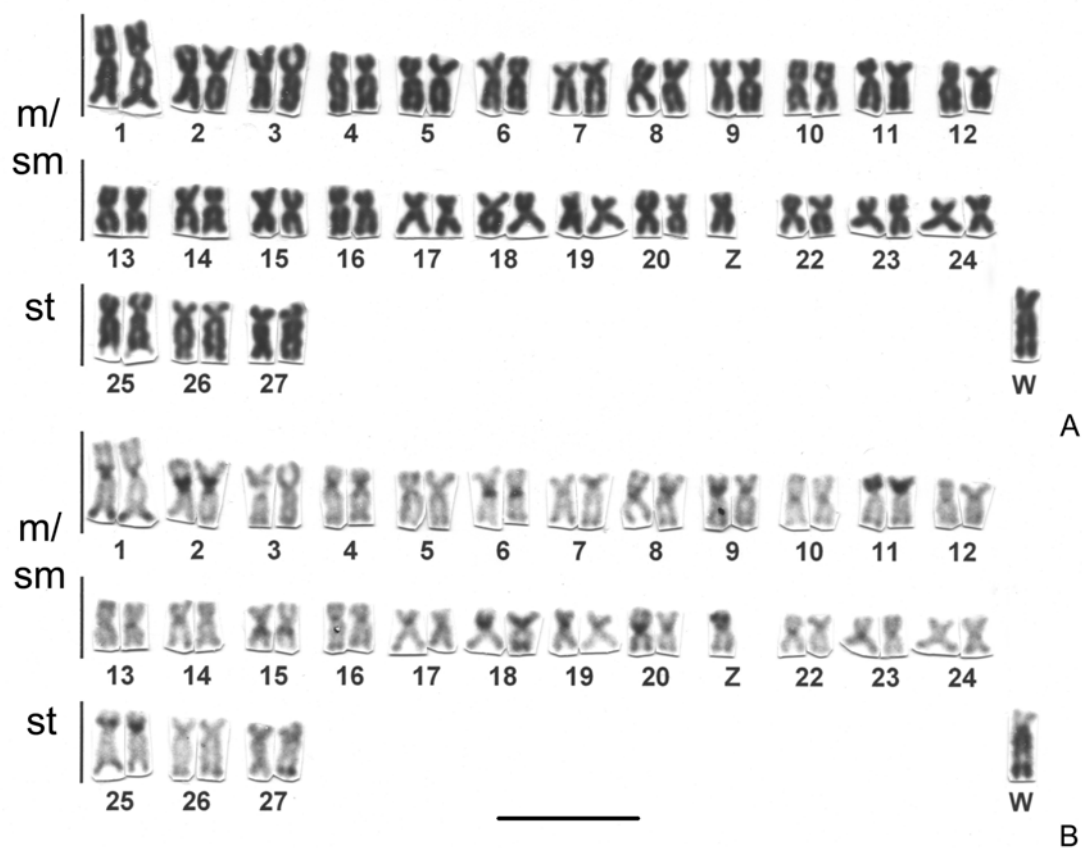


Figura 3. Cariótipos de *Apareiodon* sp fêmea, do rio Verde, em coloração convencional com Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra representa 5 µm.

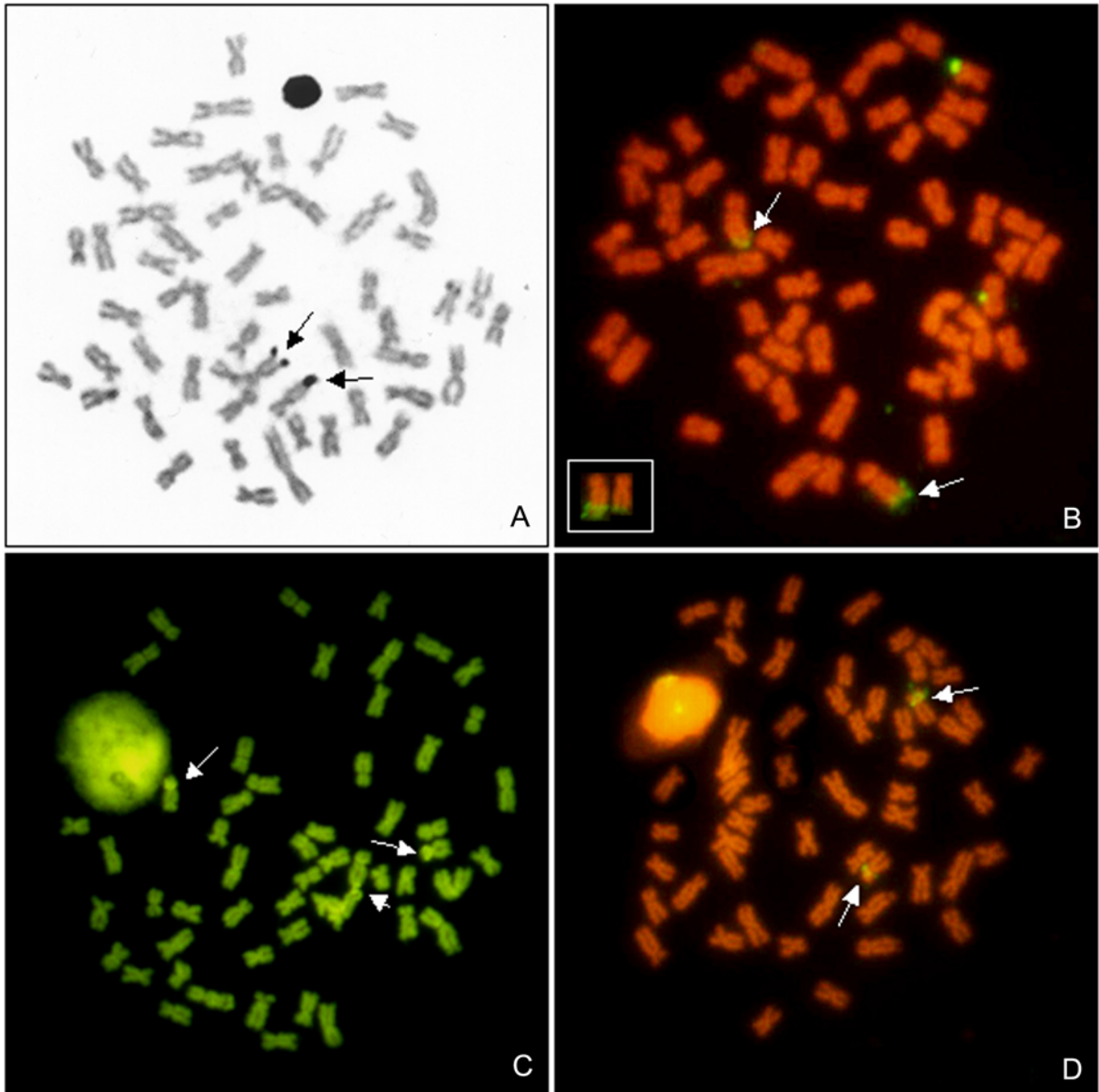


Figura 4. Metáfases de *Apareiodon* sp. evidenciando (A) os cromossomos portadores das Ag-RONs; (B) os sítios de rDNA18S, mostrando sua variação de tamanho entre sítios homólogos; (C) os sinais positivos CMA₃-fluorescentes e; (D) os sítios de rDNA 5S (setas). A variação de tamanho entre os sítios homólogos de rDNA 18S de outra metáfase são mostradas em B. A associação dos cromossomos portadores de Ag-RONs é indicada pela cabeça de seta em C. A barra representa 5 μ m.

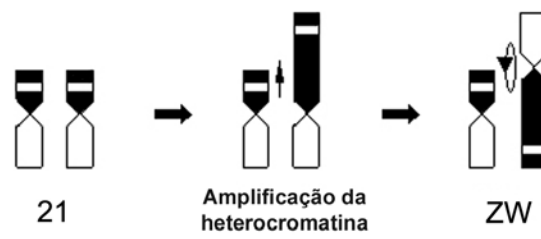


Figura 5. Diferenciação hipotética do cromossomo W a partir de um cromossomo ancestral semelhante ao Z.

4.3 Ciclídeos das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi.

CITOGENÉTICA BÁSICA E MOLECULAR EM CICHLIDAE DE ÁGUA DOCE (OSTEICHTHYES, PERCIFORMES). CONSERVADORISMO E DIVERGÊNCIA CARIOTÍPICA.

VICARI MR; ARTONI RF; MOREIRA-FILHO O & BERTOLLO LAC (2006) Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia**, 59 (3): 260-266.

Resumo

Os cromossomos de três populações de *Geophagus brasiliensis* e uma de *Cichlasoma facetum* das cabeceiras de três bacias hidrográficas paranaenses adjacentes foram investigadas utilizando diferentes técnicas de coloração (Bandamento C, Ag-RONs, DAPI e CMA₃) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S e 5S. O número diplóide das quatro populações foi $2n=48$ cromossomos, com cariótipos compostos de 3 pares de cromossomos submetacêntricos e 21 pares de subtelo/acrocêntricos em *G. brasiliensis* e 5 pares de submetacêntricos e 19 pares de subtelo/acrocêntricos em *C. facetum*, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais. As diferenças detectadas nos números fundamentais (NF) entre *G. brasiliensis* (NF=54) e *C. facetum* (NF=58) indicam que a inversão pericêntrica é o provável mecanismo que levaria a divergência citogenética entre essas espécies. A alta similaridade cariotípica entre as três populações de *G. brasiliensis* sugere uma estreita relação filogenética entre elas, apesar de um padrão diferenciado de bandamento C ser apresentado pela população do rio Jaguariaíva. Os dados sugerem que eventos de dispersão foram os responsáveis pela distribuição atual dos peixes nas bacias hidrográficas analisadas. A divergência no padrão de bandamento C provavelmente é resultado da restrição do fluxo gênico entre as populações durante sua história geológica/evolutiva.

Introdução

Perciformes é a ordem com o maior número de espécies entre os Teleostei, sendo a água doce o habitat de cerca de 14% destas espécies. De acordo com BRUM (1995), as análises cariotípicas de 420 representantes de 50 famílias de Perciformes evidenciam que 67% (283 espécies) tem número diplóide $2n=48$ cromossomos, 30% (124 espécies) tem $2n<48$ cromossomos e 3% (13 espécies) tem $2n>48$ cromossomos. Os caracteres $2n=48$ cromossomos acrocêntricos, assim como o conseqüente número fundamental (número de braços cromossômicos) $NF=48$, parecem ser características basais para a ordem Perciformes (BRUM & GALETTI Jr., 1997), especialmente no que se refere aos grupos marinhos.

Apesar do cariótipo com 48 cromossomos acrocêntricos ser o mais freqüente entre os ciclídeos, o número diplóide pode variar de $2n=32$ a $2n=60$ cromossomos (FELDBERG et al., 2003). A distribuição bimodal dos números diplóides é evidente quando relacionada à distribuição geográfica das espécies. Ciclídeos africanos tem um número diplóide modal de $2n=44$ cromossomos, com uma variação de 32 a 48 cromossomos e um NF entre 44 a 88. Já os ciclídeos neotropicais apresentam um número diplóide modal de $2n=48$ cromossomos, com uma variação de 38 a 60 cromossomos e NF variando de 44 a 118 (FELDBERG, et al., *op cit*).

Geophagus brasiliensis e *Cichlasoma facetum* são duas das espécies de ciclídeos de água doce mais comuns no Sul e Sudeste do Brasil. São encontradas em uma grande diversidade de biomas aquáticos brasileiros e, em alguns casos, diferenças morfológicas entre populações são tão marcantes a ponto de sugerir a existência de diferentes espécies. Assim sendo, no presente estudo foram

analisados os cariótipos de três populações de *G. brasiliensis* e de uma população de *C. facetum*, provenientes de regiões de cabeceiras de três importantes rios paranaenses (Tibagi, Ribeira e Paranapanema), as quais se encontram proximamente situadas, mas separadas por divisores de águas, procurando estabelecer possíveis relações evolutivas/biogeográficas entre as populações e espécies envolvidas.

Material e Métodos

Foram analisados 60 espécimes de *Geophagus brasiliensis*: 15 (8 machos e 7 fêmeas) do rio Jaguariaíva – subafluente do rio Paranapanema (24° 35' 42" S; 49° 25' 67" W); 22 (12 machos e 10 fêmeas) do rio Socavão – subafluente do rio Ribeira (24° 53' 31" S; 49° 35' 37" W); 23 (10 machos e 13 fêmeas) do rio Verde – subafluente do rio Tibagi (25°04'81" S; 50°04'63" W) e 16 espécimes de *Cichlasoma facetum* (8 machos e 8 fêmeas) provenientes da lagoa Tarumã (alto rio Tibagi), Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Brasil (25° 14' 09" S; 50° 00' 17" W) (Figura 1). Amostras Testemunho foram depositadas no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, PR (MZUEL 1735).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972) e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) com o emprego do Nitrato de Prata (HOWELL & BLACK, 1980), bem como por dupla coloração com emprego dos fluorocromos cromomicina A₃ + DAPI (SCHWEIZER, 1980), que são indicativos das regiões GC e AT ricas, respectivamente.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de rDNA nos cromossomos. Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr., 2004) e, uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999). As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). Os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por PINKEL et al. (1986) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados dentro de três grupos no cariótipo, i.e., submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da sua razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos cariótipos. O número de braços cromossômicos (número fundamental – NF) foi calculado levando-se em conta cromossomos st/a e sm com um e dois braços, respectivamente.

Resultados

Estrutura cariotípica

As amostras das três populações de *G. brasiliensis* (rios Jaguariaíva, Socavão e Verde), assim como *C. facetum* (lagoa Tarumã), apresentaram um cariótipo constituído por $2n=48$ cromossomos, tanto nos machos como nas fêmeas, sendo homomórficos, isto é, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. Em *G. brasiliensis* o número fundamental foi

NF=54, verificando-se a ocorrência de 3 pares de cromossomos submetacêntricos e 21 pares de cromossomos subtelo/acrocêntricos. Em *C. facetum* observou-se um NF=58, em virtude da ocorrência de 5 pares de cromossomos submetacêntricos e 19 pares de cromossomos subtelo/acrocêntricos (Figura 1).

Tanto em *G. brasiliensis* como em *C. facetum* foram evidenciadas bandas C positivas preferencialmente localizadas nas regiões centroméricas/pericentroméricas (Figura 1c, d, g, h). Entretanto, a população de *G. brasiliensis* do rio Jaguariaíva, apresentou uma quantidade maior de heterocromatina comparativamente às populações dos rios Sacovão e Verde, além de evidenciar vários cromossomos com segmentos heterocromáticos intersticiais (Figura 1 c, d, g). Em *C. facetum* praticamente todos os pares cromossômicos evidenciam regiões heterocromáticas bem evidentes.

Bandas Ag-NOR, CMA₃, DAPI e localização dos genes ribossomais 18S e 5S

As regiões organizadoras do nucléolo, evidenciadas pelo nitrato de prata (Ag-NORs) e pela hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S, foram localizadas na região telomérica do braço curto do par st/a número 6, nas três amostras de *G. brasiliensis* (Figuras 1a, b, e, and 3a, b, e) e na região telomérica do braço curto do par st/a número 8, em *C. facetum* (Figuras 1f e 3f). Por vezes, um polimorfismo de tamanho do sítio 18S foi observado nas populações de *G. brasiliensis*, sempre no estado heterozigoto (Figura 4). A dupla coloração CMA₃/DAPI, mostrou uma única banda CMA₃ positiva e DAPI negativa, concordante com o sítio da NOR (Figuras 2 e 4). O sítio de rDNA 5S foi localizado na região intersticial do braço longo do par st/a número 10 nas três amostras de *G.*

brasiliensis (Figura 3c, d, g) e na região intersticial do braço longo do par st/a número 11 em *C. facetum* (Figura 3h).

Discussão

A família Cichlidae possui cerca de 99 espécies nominais com cariótipos descritos, das quais 68 apresentam o número diplóide igual a 48 cromossomos, 27 apresentam menos que 48 cromossomos e apenas 4 apresentam mais que 48 cromossomos (BRUM & GALETTI Jr., 1997), sendo os dois valores extremos representados por $2n=32$ e $2n=60$ cromossomos, respectivamente (FELDBERG et al., 2003). Na realidade, $2n=48$ acrocêntricos e, conseqüentemente, $NF=48$ parecem ser características basais para a ordem Perciformes como um todo (GALETTI Jr. et al., 2000), especialmente no que se refere aos grupos marinhos. Assim, a presença de $2n=48$ nas populações de *G. brasiliensis* e *C. facetum*, ora estudadas, representa a manutenção de uma condição plesiomórfica nesses grupos, corroborando com algumas outras análises previamente realizadas (FELDBERG & BERTOLLO, 1985a; BRUM et al., 1998; FELDBERG et al., 2003). Por outro lado, as inversões pericêntricas são consideradas os principais rearranjos implicados na diversificação do $NF=48$ ancestral dos Perciformes (GALETTI Jr. et al., 2000; AFFONSO & GALETTI Jr., 2005), conforme evidenciado por FELDBERG & BERTOLLO (1985a), OLIVEIRA et al. (1988), SALAS & BOZA (1991), MARTINS et al. (1995), BRUM et al. (1998), AFFONSO & GALETTI Jr. (2005). Esse mesmo evento pode ser também explicativo para os diferentes números fundamentais encontrados na presente análise, onde as populações de *G. brasiliensis* possuem $NF=54$ (6 sm + 42 st/a) e *C.*

facetum NF=58 (10 sm + 38 st/a). Na realidade, a variação no número de braços tem sido um bom marcador cromossômico para várias espécies de ciclídeos.

Poucos são os estudos comparativos entre populações de Cichlidae no que se refere à heterocromatina, provavelmente pelo fato dos blocos heterocromáticos serem praticamente restritos à região pericentromérica dos cromossomos (KORNFIELD et al., 1979; OLIVEIRA & WRIGHT, 1998). No entanto, apesar das espécies/populações analisadas manterem esse mesmo padrão geral de distribuição da heterocromatina, é notório que *G. brasiliensis* do rio Jaguariaíva diferencia-se por apresentar vários pares cromossômicos com blocos heterocromáticos intersticiais conspícuos, o que não se verifica nas demais populações dessa espécie, assim como em *C. facetum*. Além disso, a quantidade de heterocromatina presente nos cromossomos de *G. brasiliensis* do rio Jaguariaíva é maior do que o montante observado nas populações dos rios Socavão e Verde, sendo que estas duas últimas mostram um padrão bem similar entre si. Coincidentemente, as populações dos rios Socavão e Verde estão mais proximamente situadas do que a população do rio Jaguariaíva, o que poderia justificar as diferenças constatadas considerando um provável isolamento geográfico maior entre essa última população e as demais.

O par cromossômico portador das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs, sítios de rDNA 18S e sítios cromomicina A₃ positivos) é coincidente nas três populações de *G. brasiliensis* (par 6, st/a) sendo, muito provavelmente, homeólogo ao par portador das NORs de *C. facetum* (par 8, st/a). Esses mesmos pares cromossômicos evidenciam uma região DAPI negativa coincidente com o sítio da NOR, reforçando sua constituição rica em pares de bases GC e, alternativamente, pobre em bases AT. Entre os peixes (PENDÁS et al., 1993; GALETTI Jr., 1998; ALMEIDA-TOLEDO, 1998; VICARI et al., 2003, 2005) e anfíbios (SCHMID, 1982), as

NORs apresentam-se geralmente como sítios positivos para os fluorocromos GC específicos, como a cromomicina e a mitramicina. Contudo, é também conhecido que regiões coradas pela cromomicina/mitramicina podem não corresponder a locos de rDNA, mas somente à heterocromatina GC-rica (MARTINEZ et al., 1991; ARTONI & BERTOLLO, 1999). No presente caso, tanto em *Geophagus* como em *Cichlasoma*, identifica-se um bloco heterocromático situado logo abaixo do sítio da NOR nos cromossomos 6 e 8, respectivamente (Figuras 1, 4), mostrando que os genes ribossomais não estão interespaçados pela heterocromatina, mas localizados adjacentes à ela, à semelhança do que ocorre com algumas outras espécies de peixes (ARTONI & BERTOLLO, 1999).

A família Cichlidae, com raras exceções, é caracterizada por apresentar NORs simples (um único par), localizadas em cromossomos relativamente grandes (FELDBERG et al., 2003), correspondendo a um provável simplesiomorfismo para esse grupo (FELDBERG & BERTOLLO, 1985b). HSU et al. (1975), já consideravam NORs simples como um estado mais primitivo da distribuição do rDNA no cariótipo, comparativamente a NORs múltiplas. Por sua vez, ao lado da ocorrência de NORs simples, é também freqüente a ocorrência de um heteromorfismo de tamanho entre os sítios homólogos de NORs (FELDBERG & BERTOLLO, 1985b; BRUM et al., 1998; presente trabalho), o que pode ser devido a permutas desiguais durante a meiose e/ou trocas entre cromátides irmãs, envolvendo as seqüências repetidas dessas regiões. Esse heteromorfismo pôde ser claramente constatado nas três populações de *G. brasiliensis* estudadas, onde um dos sítios da NOR mostra-se duplicado em relação ao seu homólogo.

Os cromossomos portadores de rDNA 5S em *G. brasiliensis* e *C. facetum*, respectivamente par 10 st/a e par 11 st/a, são também provavelmente homeólogos,

mostrando sítios intersticiais no braço longo, e portanto não sintênicos aos sítios de rDNA 18S. Entre os Percifomes, ainda são poucos os estudos sobre a localização do rDNA 5S. Em *Oreochromis niloticus* (Tilapiine) os sítios de rDNA 5S foram localizados em mais de um par cromossômico (MARTINS et al., 2000, 2002). Duas classes de rDNA 5S distribuídos em três pares cromossômicos, a presença de pseudogenes e genes invertidos foram observados no genoma de *O. niloticus* (MARTINS et al., 2002). Uma situação não usual, onde os genes ribossomais 5S se sobrepõem a uma região cromossômica A₃ positiva, foram detectadas em algumas espécies de Perciformes (DEIANA et al., 2000; AFFONSO & GALETTI Jr., 2005). Em *Centropyge aurantonotus* 18 sítios de rDNA 5S foram detectados, muitos deles podendo corresponder a pseudogenes inativos (AFFONSO & GALETTI Jr., *op. cit.*).

G. brasiliensis, assim como *C. facetum*, mantém várias características consideradas plesiomórficas para os Percifomes, como o número diplóide $2n=48$, predominância de cromossomos st/a no cariótipo, número e localização das NORs e rDNA 5S. O alto conservadorismo cariotípico entre as três populações de *G. brasiliensis* estudadas, tanto em relação à macroestrutura do cariótipo como aos padrões de bandamentos analisados, reforça a proposta que eventos de vicariância, provavelmente por capturas de cabeceiras, podem ter sido responsáveis pela distribuição atual da ictiofauna nas bacias consideradas, conforme também proposto em estudos anteriores com outras espécies presentes nessas bacias (VICARI et al., 2005). Por outro lado, as diferenças constatadas quanto ao padrão de bandamento C evidencia que uma dessas populações, a do rio Jaguariaíva, se apresenta diferenciada em relação às demais no tocante a esse caráter, possivelmente como consequência da restrição ao fluxo gênico entre elas ao longo da sua história geológica e evolutiva.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA nº 02017.000686/00-21), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós somos gratos também ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela assistência de campo e laboratório.

Referências

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

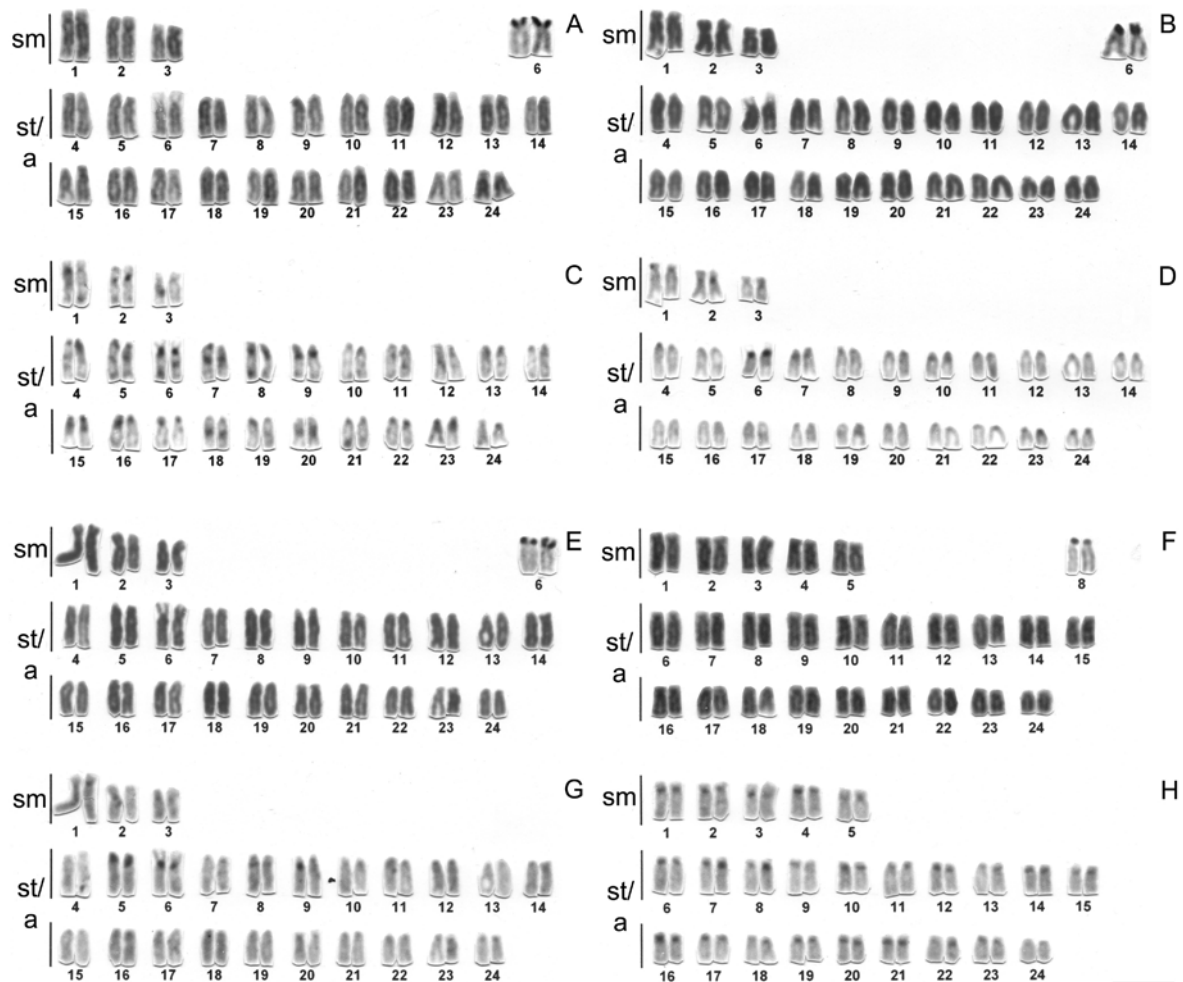


Figura 1. Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (A, B, E) e *Cichlasoma facetum* (F) com coloração convencional por Giemsa, e análise seqüencial da heterocromatina (C, D, G) e (H), respectivamente. Em destaque, o par cromossômico portador do sítio Ag-NOR positivo. (A, C) população do rio Jaguariva; (B, D) população do rio Socavão; (E, G) população do rio Verde; (F, H) população da Lagoa Tarumã. A barra representa 5 μm.

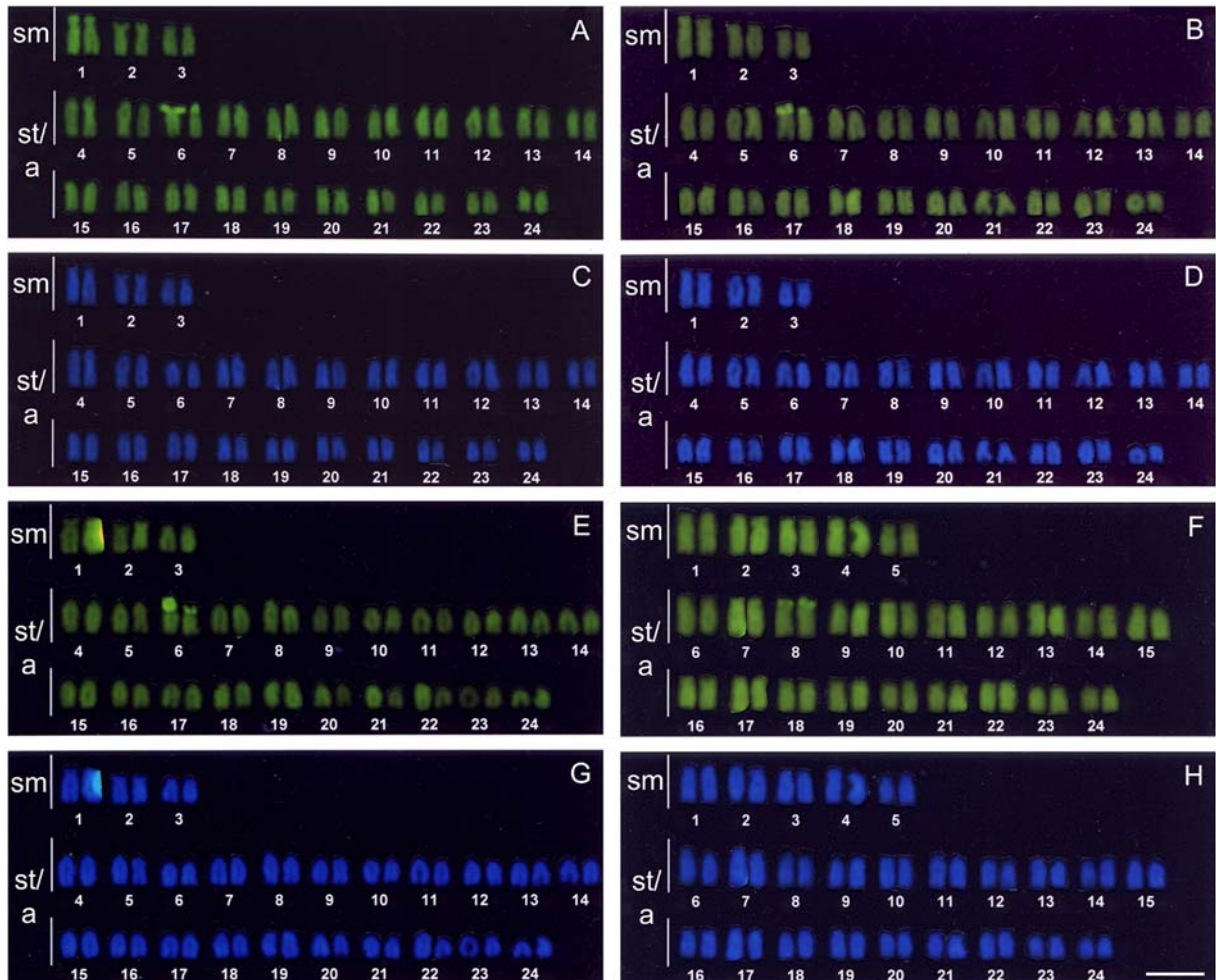


Figura 2. Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (A, B, E) e de *Cichlasoma facetum* (F), corados com o fluorocromo cromomicina A₃ e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (C, D, G) e (H), respectivamente, mostrando um sítio GC positivo e AT negativo nos pares cromossômicos 6 de *G. brasiliensis* e 8 de *C. facetum*. (A, C) população do rio Jaguariaíva, (B, D) população do rio Socavão, (E, G) população do rio Verde. A barra representa 5 µm.

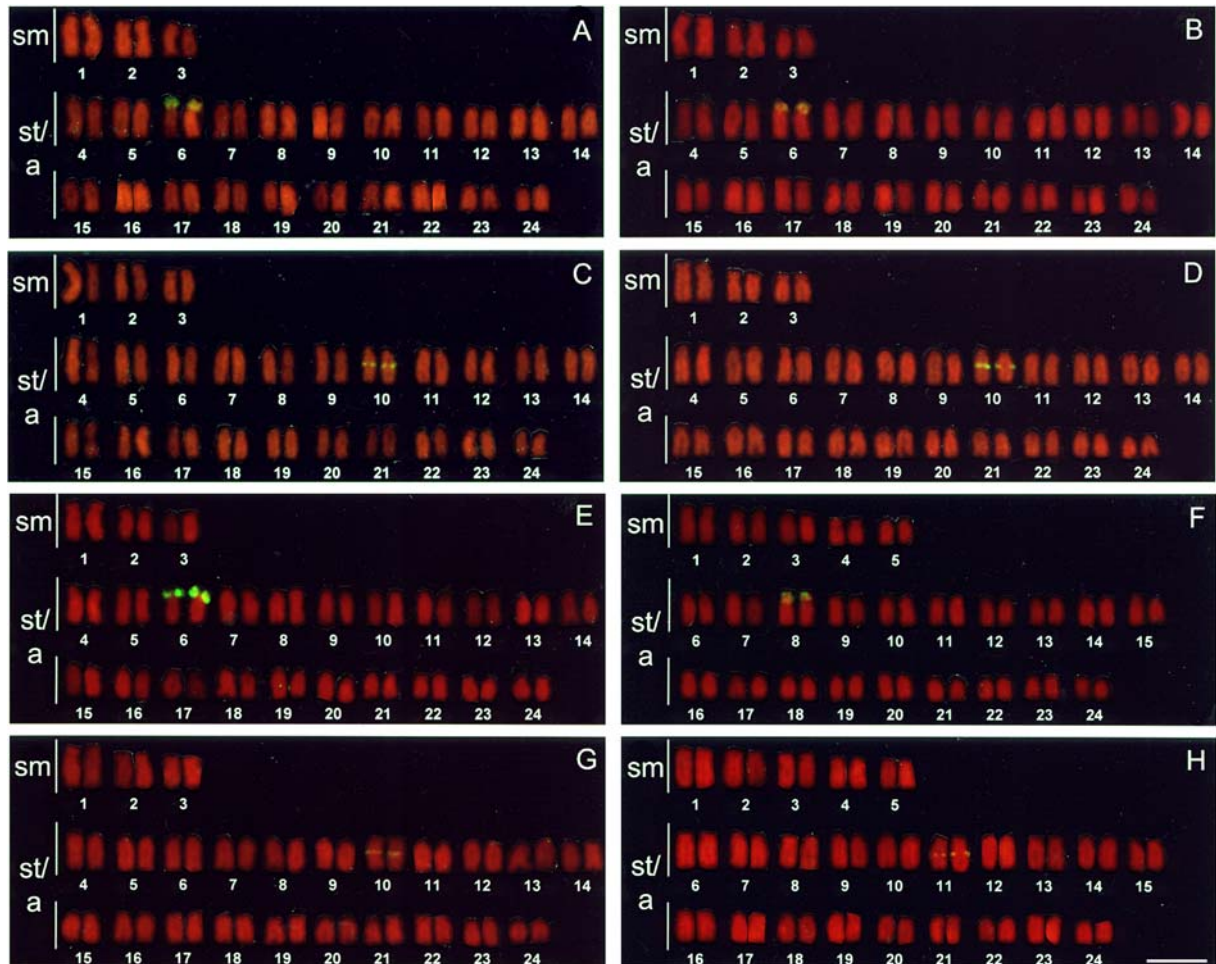


Figura 3. Cariótipos de *Geophagus brasiliensis* (C, D, G) e de *Cichlasoma facetum* (F), mostrando a localização do rDNA 18S nos pares cromossômicos 6 e 8, respectivamente, e a localização do rDNA 5S no pares cromossômicos 10 (C, D, G) e 11 (H), respectivamente. (A, C) população do rio Jaguariaíva, (B, D) população do rio Socavão, (E, G) população do rio Verde. A barra representa 5 µm.

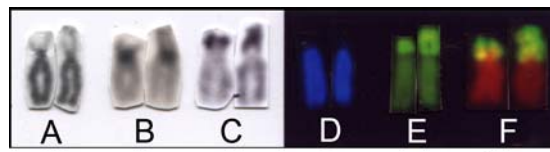


Figura 4. Par cromossômico número 6 de *Geophagus brasiliensis*, mostrando a localização da NOR no braço curto e o seu polimorfismo de tamanho, sob diferentes metodologias de análise: (A) coloração convencional com Giemsa, evidenciando a constrição secundária bem evidente; (B) bandamento C, mostrando a localização da heterocromatina adjacente ao sítio da NOR, (C) sítio Ag-NOR positivo, (D) sítio DAPI negativo, (E) sítio cromomicina A₃ positivo e, (F) localização do rDNA 18S. A barra representa 5 μ m.

4.4 Complexo “*Astyanax scabripinnis*” das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi

CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE ESPÉCIES DE PEIXES DO COMPLEXO *A. scabripinnis*. INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS E BIOGEOGRÁFICAS.

VICARI, M.R.; NOLETO, R.B.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. BERTOLLO, L.A.C. (submetido para publicação). Comparative cytogenetics among species of the *A. scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genet. Mol. Biology.**

Resumo

Dados cariotípicos são apresentados para populações de espécies de *Astyanax* do complexo *A. scabripinnis*, de três diferentes sistemas hidrográficos do estado do Paraná, Brasil (rio Verde – bacia do Tibagi; rio Açungui – bacia do Ribeira e rio Santo Antônio – bacia do Jaguariaíva). Diferentes formas cariotípicas foram identificadas, aqui denominadas de cariótipo A ($2n=50$ cromossomos, sendo $8m+18sm+10st+14a$ e com treze sítios de rDNA 18S); cariótipo B ($2n=50$ cromossomos, sendo $8m+18sm+10st+14a$ e com 4 sítios de rDNA 18S); e cariótipo C ($2n=48$ cromossomos, sendo $10m+16sm+10st+12a$ e com oito sítios de rDNA 18S). O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva mostrou-se semelhante entre as três formas cariotípicas, com poucas diferenças interpopulacionais. O rDNA 5S apresentou-se como um caráter sinapomórfico quanto ao número e localização nas três populações estudadas. A forma cariotípica A ocorre no centro da distribuição da localidade tipo da espécie *A. paranae*, nas proximidades da cidade de Castro (Bacia do Tibagi) e pode ter atingido, por dispersão, as cabeceiras da bacia do rio Ribeira. As formas cariotípicas B e C são simpátricas e sintópicas, ocorrendo somente na bacia do rio Jaguariaíva. Os dados obtidos são importantes para a citotaxonomia de *A. paranae*, assim como para a elaboração de hipóteses sobre a evolução do cariótipo de espécies do complexo *A. scabripinnis*.

Introdução

O gênero *Astyanax* integra uma assembléia de peixes Neotropicais, amplamente distribuídos pela América do Sul e Central, anteriormente alocados na subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977). Recentemente, este grupo foi considerado como *insertae sedis*, por não apresentar evidências consistentes de monofiletismo (LIMA et al., 2003). Sendo assim, estudos citogenéticos/evolutivos são de especial interesse no gênero *Astyanax*, podendo contribuir para o esclarecimento de inter-relações entre suas espécies.

MOREIRA-FILHO & BERTOLLO (1991) propuseram, com base em caracteres morfológicos e cromossômicos, que *A. scabripinnis* deveria constituir um complexo de espécies. Dados morfológicos indicam que este complexo seja constituído por cerca de 15 espécies, dentre as quais se insere *A. paranae* (BERTACO & LUCENA, 2006). Esta espécie tem sido usualmente considerada como uma subespécie de *A. scabripinnis* (MAISTRO et al., 1998; GARUTTI & BRITSKI, 2000). Provavelmente a falta de caracteres diagnósticos precisos para *A. paranae* contribuiu para que populações do complexo *A. scabripinnis* do rio Paraná tenham sido consideradas como *A. scabripinnis* (BERTACO & LUCENA, 2006).

A localidade tipo de *A. paranae* é a região de Castro, no estado do Paraná, Brasil (EINGENMANN, 1914, cit. em GARUTTI & BRITSKI, 2000). Foram analisados os cromossomos de *Astyanax* de três córregos distintos no estado do Paraná, pertencentes às cabeceiras do rio Tibagi, nas proximidades de Castro, e dos rios Ribeira e Jaguariaíva, com o objetivo de caracterizar o cariótipo de espécies do complexo *A. scabripinnis* que ocorrem nessa região, bem como comparar

citogeneticamente as diferentes populações entre si, procurando estabelecer possíveis relações evolutivas/biogeográficas entre as mesmas.

Material e Métodos

Cento e trinta espécimes de *Astyanax* foram analisados: 44 espécimes do rio Verde – tributário da bacia do Tibagi, na região de Castro (25°04'81" S; 50°04'63" W), 17 espécimes do rio Açungui – tributário da bacia do Ribeira (25°44'89" S; 49°67'44" W) e 69 espécimes do Parque Estadual do Cerrado, córrego Santo Antônio e rio Jaguariaíva (24° 35` 42" S; 49° 25` 67" W) - (Tabela I). Todos os espécimes apresentaram caracteres que delimitam o complexo de espécies *A. scabripinnis*. Amostras testemunho foram depositadas no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil (MZUEL 3700, *A. paranae* do rio Verde; MZUEL 3702, *Astyanax* sp. do rio Santo Antônio e; MZUEL 4064 *A. paranae* do rio Açungui).

As preparações cromossômicas foram obtidas de células do rim anterior usando o tratamento *in vivo* com colchicina (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva foi visualizada pelo bandamento C (SUMNER, 1972), bem como pela dupla coloração com fluorocromos cromomicina A₃+DAPI (SCHWEIZER, 1980), que são indicativas de regiões GC- e AT-ricas, respectivamente.

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) foram detectadas usando a coloração pelo nitrato de prata (Ag-RONs), de acordo com HOWELL & BLACK (1980), e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para localizar os genes de rDNA nos

cromossomos. Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr., 2004) e, uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999). As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). Os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por PINKEL et al. (1986) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Próximo a 30 metafases por espécime foram analisadas para determinar o número diplóide e a estrutura cariotípica. Os cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a), de acordo com LEVAN et al. (1964).

Resultados

Três tipos distintos de cariótipos foram identificados considerando as populações analisadas de *Astyanax*, aqui denominados de A, B e C, podendo ser diferenciados quanto ao número de cromossomos e/ou estrutura cariotípica,

Cariótipo A

Apresentou $2n=50$ cromossomos, diferenciados em $8m+18sm+10st+14a$, (Figura 1 a). A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos e na região intersticial ou telomérica de alguns pares (Figura 1 b; Tabela II). Foram observadas Ag-RONs teloméricas múltiplas, com variações intraindividuais, intrapopulacionais e interpopulacionais (Tabela II). Treze sítios de

rDNA 18S foram detectados por FISH, sempre em localização telomérica, sendo que um cromossomo subtelocêntrico apresenta ambos telômeros marcados, ou seja, RONS biteloméricas (Figura 1 c). A dupla coloração CMA₃/DAPI, mostrou bandas CMA₃ positivas e DAPI negativas, em sítios conspícuos coincidentes ao rDNA 18S (Figura 1 d, e respectivamente). O rDNA 5S foi localizado em dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro acrocêntrico, proximais ao centrômero (Figura 1 f). Esta forma cariotípica foi detectada nos espécimes provenientes dos rios Verde (bacia do Rio Tibagi) e Açungui (bacia do rio Ribeira), nas imediações da cidade de Castro. Para a população do rio Verde, o par acrocêntrico número 21 mostrou-se polimórfico quanto a um grande bloco heterocromático na extremidade distal do braço longo, detectado em alguns indivíduos da população em condição heterozigota (Figura 1 b).

Cariótipo B

Este cariótipo também apresentou $2n=50$ cromossomos, organizados em $8m+18sm+10st+14a$ (Figura 2 a). A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos e na região intersticial ou telomérica de alguns pares (Figura 2 b; Tabela II). As Ag-RONS também foram evidenciadas nas regiões teloméricas, com variações intraindividuais e intrapopulacionais, porém com um número bem mais reduzido do que no citótipo A (Tabela II), caracter este também confirmado pela presença de apenas 4 sítios de rDNA 18S, detectados por FISH (Figura 2 c). A dupla coloração CMA₃/DAPI mostrou bandas CMA₃ positivas e DAPI negativas, em sítios conspícuos coincidentes ao rDNA 18S (Figura 2 d, e respectivamente). O rDNA 5S foi localizado em dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro acrocêntrico, proximais ao centrômero (Figura 2 f). Esta forma

cariotípica foi encontrada nos espécimes provenientes do rio Santo Antônio (bacia do rio Jaguariaíva).

Cariótipo C

Diferentemente de A e B, o cariótipo C apresentou $2n=48$ cromossomos, agrupados em $10m+16sm+10st+12a$ (Figura 3 a). A heterocromatina constitutiva foi localizada na região centromérica de todos os cromossomos, na região telomérica de alguns pares, além de algumas conspícuas marcações intersticiais em cromossomos acrocêntricos (Figura 3 b). As Ag-RONs também foram múltiplas, variando entre dois a cinco sítios (Tabela II). Contudo, 8 sítios de rDNA 18S foram detectados por FISH, sempre em localização telomérica (Figura 3 c). A dupla coloração CMA₃/DAPI, mostrou bandas CMA₃ positivas e DAPI negativas, em sítios conspícuos coincidentes ao rDNA 18S (Figura 3 d, e respectivamente). O rDNA 5S foi localizado em dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro acrocêntrico, proximais ao centrômero (Figura 3f). Esta forma cariotípica foi encontrada na população do rio Jaguariaíva, ocorrendo também em simpatria e sintopia com o cariótipo B no córrego Santo Antônio.

Discussão

O número diplóide $2n=50$ cromossomos mostrou-se o mais freqüente, sendo encontrado em três das quatro populações de *Astyanax* estudadas (rios Verde, Açungui e Santo Antônio). O mesmo número cromossômico foi também observado na grande maioria das populações estudadas do complexo de espécies *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MANTOVANI et al., 2000; NEO

et al., 2000; FERRO et al., 2001; MAISTRO et al., 2000, 2001; MOREIRA-FILHO et al., 2001; FERRO et al., 2003).

Embora os cariótipos $2n=50$ sejam semelhantes em sua macroestrutura ($8m+18sm+10st+14a$), com algumas poucas variações na distribuição e localização da heterocromatina, foi possível diferenciá-los em duas formas distintas: cariótipo A, encontrado nas populações do rio Verde e rio Açungui, caracterizado por 13 sítios de rDNA 18S, dois deles localizados em ambos os telômeros de um mesmo cromossomo (RONs biteloméricas), e cariótipo B, encontrado na população do rio Santo Antônio, caracterizado por apresentar 4 sítios de rDNA 18S (Tabela II). Uma terceira forma cariotípica (cariótipo C), foi caracterizada pela presença de um número diplóide menor ($2n=48$ cromossomos), uma fórmula cariotípica também diferenciada ($10m+16sm+10st+12a$) e 8 sítios de rDNA 18S. Espécimes portadores deste cariótipo foram encontrados no rio Jaguariaíva, além de sua ocorrência simpátrica e sintópica com espécimes portadores do cariótipo B, no rio Santo Antônio (Tabela II).

A análise comparativa dos cariótipos B ($2n=50$) e C ($2n=48$), dos espécimes do rio Santo Antônio, mostra que eles provavelmente mantêm uma homeologia dos seus pares cromossômicos, exceto pela ausência de dois pares cromossômicos pequenos (1sm e 1a) no cariótipo C e conseqüente presença de um par metacêntrico grande (par 2). A similaridade morfológica indica que os pares metacêntricos 1, 2, 3 e 4 dos cariótipos A e B devem ser homeólogos aos pares 1, 3, 4 e 5 do citótipo C, respectivamente. Assim sendo, o par metacêntrico número 2 do cariótipo C ($2n=48$) pode ter sido originado por um evento de translocação Robertsoniana ou fusão entre dois cromossomos pequenos, um submetacêntrico e

outro acrocêntrico, a partir de uma população com $2n=50$ cromossomos e com um cariótipo semelhante ao da forma B.

A ocorrência de $2n=48$ cromossomos já foi descrita para algumas populações de *A. scabripinnis*, pertencentes à bacia do alto rio Paraná (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA et al., 1996; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; MAISTRO et al., 2000; MANTOVANI et al., 2000; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002). Além da diferença numérica, essas populações geralmente diferem daquelas com $2n=50$ cromossomos pela presença de um par diferenciado de cromossomos subtelocêntricos (MANTOVANI et al., 2000), ou submetacêntricos (MAISTRO et al., 2000). No entanto, nenhuma dessas populações com $2n=48$ apresentou um cromossomo metacêntrico como o par número 2 do cariótipo C. Assim, a presença desse caráter apomórfico, por ora exclusivo da população de *Astyanax* do rio Santo Antônio, evidencia que diferentes caminhos de evolução cariotípica estariam originando populações com $2n=48$ cromossomos. Assim sendo, a forma cariotípica C do rio Santo Antônio estaria mais estreitamente relacionada à forma cariotípica B dessa mesma bacia, do que com os demais espécimes de *Astyanax* com $2n=48$ cromossomos, descritos por MANTOVANI et al. (2000) e MAISTRO et al. (2000). Nenhum dos exemplares amostrados apresentou uma fórmula cariotípica híbrida, sugerindo um provável isolamento reprodutivo entre as formas B e C. Além disso, pequenas diferenças na localização dos blocos de heterocromatina nos cromossomos acrocêntricos, bem como a ocorrência de números distintos de sítios de rDNA 18S (Tabela II), condizem com a possível existência de duas taxa diferentes. Esses dados também sugerem um modelo de especiação alopátrica entre essas duas formas cariotípicas as quais, após a quebra de barreiras geográficas, teriam se tornado simpátricas, como também proposto para algumas

outras espécies do complexo *scabripinnis* (SOUZA et al., 1995; MAISTRO et al., 2000).

Ag-RONs múltiplas foram observadas em todas as populações analisadas, com variações numéricas intra- e interpopulacional. A análise dos sítios de rDNA 18S permitiu localizar esses sítios sempre na região telomérica dos cromossomos, em concordância com as Ag-RONs. A dupla coloração por fluorocromos GC e AT específicos, cromomicina A₃ e DAPI respectivamente, mostrou regiões de DNA GC positivas e AT negativas em sítios conspícuos, coincidentes ao rDNA 18S. A presença de um cromossomo subtelocêntrico com NORs biteloméricas foi constatada apenas nas populações portadoras do cariótipo A. Este dado, aliado ao maior número de RONS presente nessas populações, reforçam uma relação filogenética mais estreita entre os portadores da forma cariotípica A, ou seja, as populações do rio Verde (bacia do rio Tibagi) e do rio Açungui (bacia do rio Ribeira). Uma possível dispersão por “captura de cabeceiras” (termo usado para designar quando a cabeceira de um dado rio é incorporada em um outro rio pertencente a uma bacia hidrográfica adjacente), poderia explicar o conservadorismo entre os espécimes dessas duas bacias hidrográficas diferentes, sendo as poucas diferenças observadas na distribuição da heterocromatina (Tabela II) resultante da restrição do fluxo gênico atualmente existente. Este modelo de captura de cabeceiras e de dispersão é aplicável para outras espécies de peixes dessas mesmas bacias, como é o caso de *Hoplias malabaricus* (VICARI et al., 2005) e *Geophagus brasiliensis* (VICARI et al., 2006), tendo sido também utilizado para explicar a simpatria observada entre diferentes espécies de *Characidium* (CENTOFANTE et al., 2001).

Sítios de rDNA 5S mostraram-se conservados em dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro acrocêntrico, na região proximal ao centrômero, em todas

as populações amostradas. A manutenção desses dois pares cromossômicos, com sítios de rDNA 5S na mesma posição, foi também verificada em outras espécies de *Astyanax* e do complexo *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005), evidenciando ser esta característica uma sinapomorfia para essas espécies de *Astyanax*.

Os dados cariotípicos apresentados são subsídios importantes para os estudos taxonômicos em *Astyanax*. Neste sentido, nossa proposta é que a forma cariotípica A corresponde à espécie *A. paranae*, por ser encontrada no centro de distribuição de sua localidade tipo (região de Castro, Paraná, Brasil), a partir da qual teria atingido, por capturas de cabeceiras, a bacia do rio Ribeira. Por sua vez, as formas cariotípicas B e C encontradas na bacia do rio Jaguariaíva, citogeneticamente diferenciadas entre si e da forma A, no entanto, morfologicamente semelhantes, representam outras espécies pertencentes ao complexo de espécies *A. scabripinnis*. Estes dados citogenéticos podem vir a somar aos estudos taxonômicos e indicar que o complexo de espécies *A. scabripinnis* possa ser constituído por 17 representantes, duas espécies a mais do aceito por BERTACO & LUCENA (2006).

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA nº 02017.000686/00-21), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária

(Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós somos gratos também ao Dr. Oscar A. Shibata pela assistência taxonômica e ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela assistência de campo e laboratório.

Referências

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

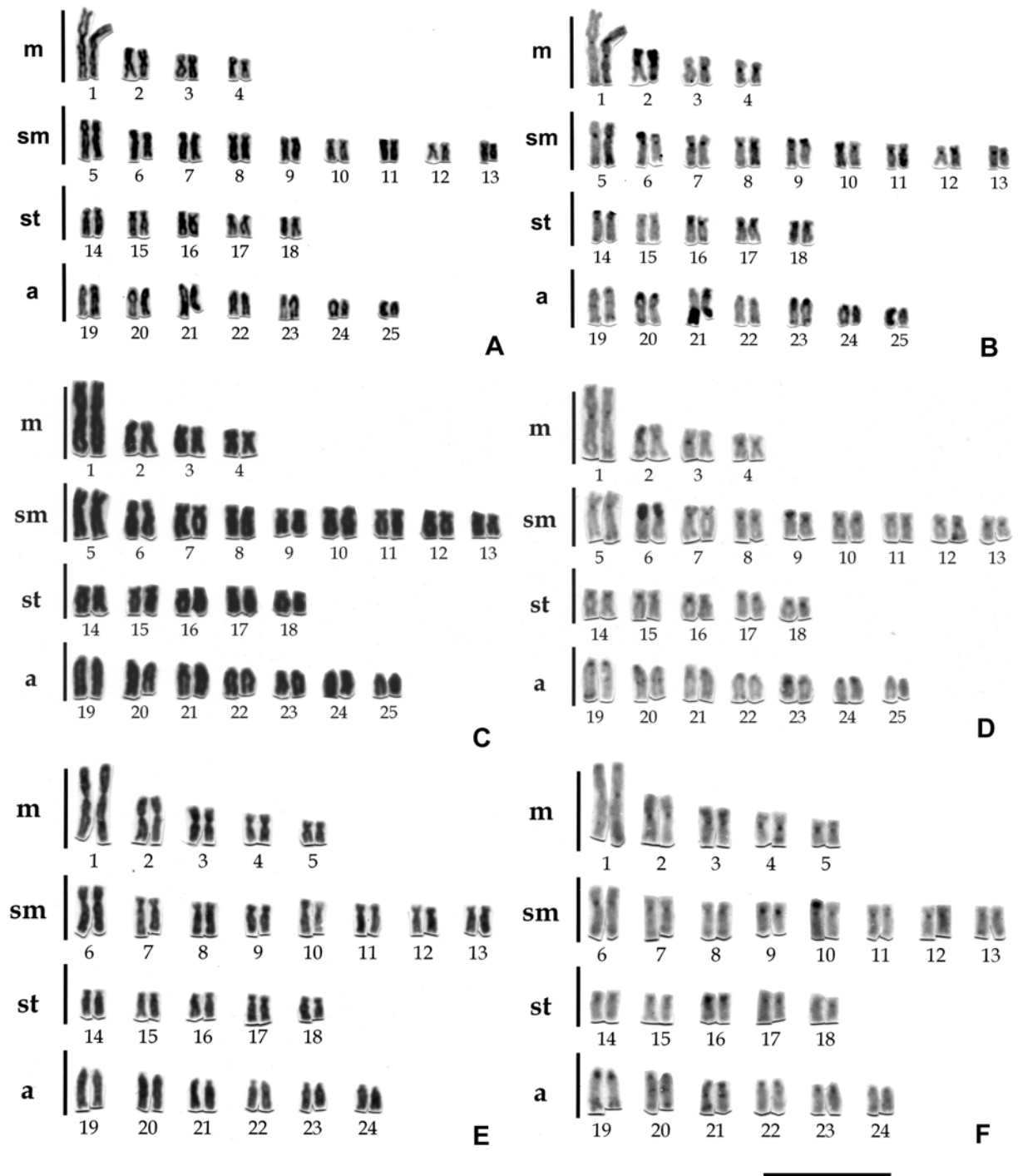


Figura 1. Cariótipos do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*: (A, B) Cariótipo A do rio Verde; (C, D) Cariótipo B do rio Santo Antônio; (E, F) Cariótipo C do rio Santo Antônio. (A, C, E) coloração convencional por Giemsa e (B, D, F) bandamento C sequencial, respectivamente. A barra representa 10 μ m.

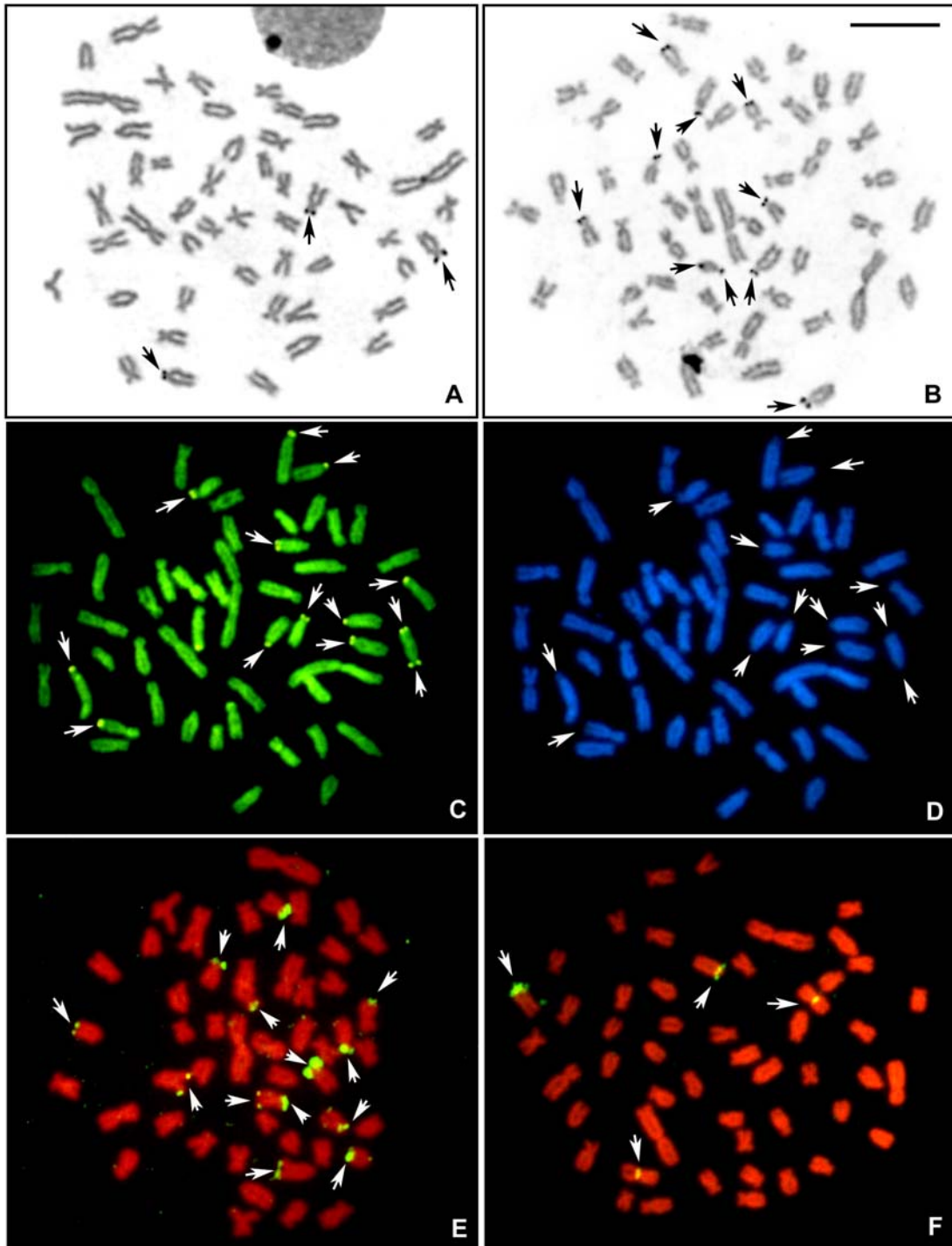


Figura 2. Metáfases de *Astyanax paranae* (Cariótipo A) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 μ m.

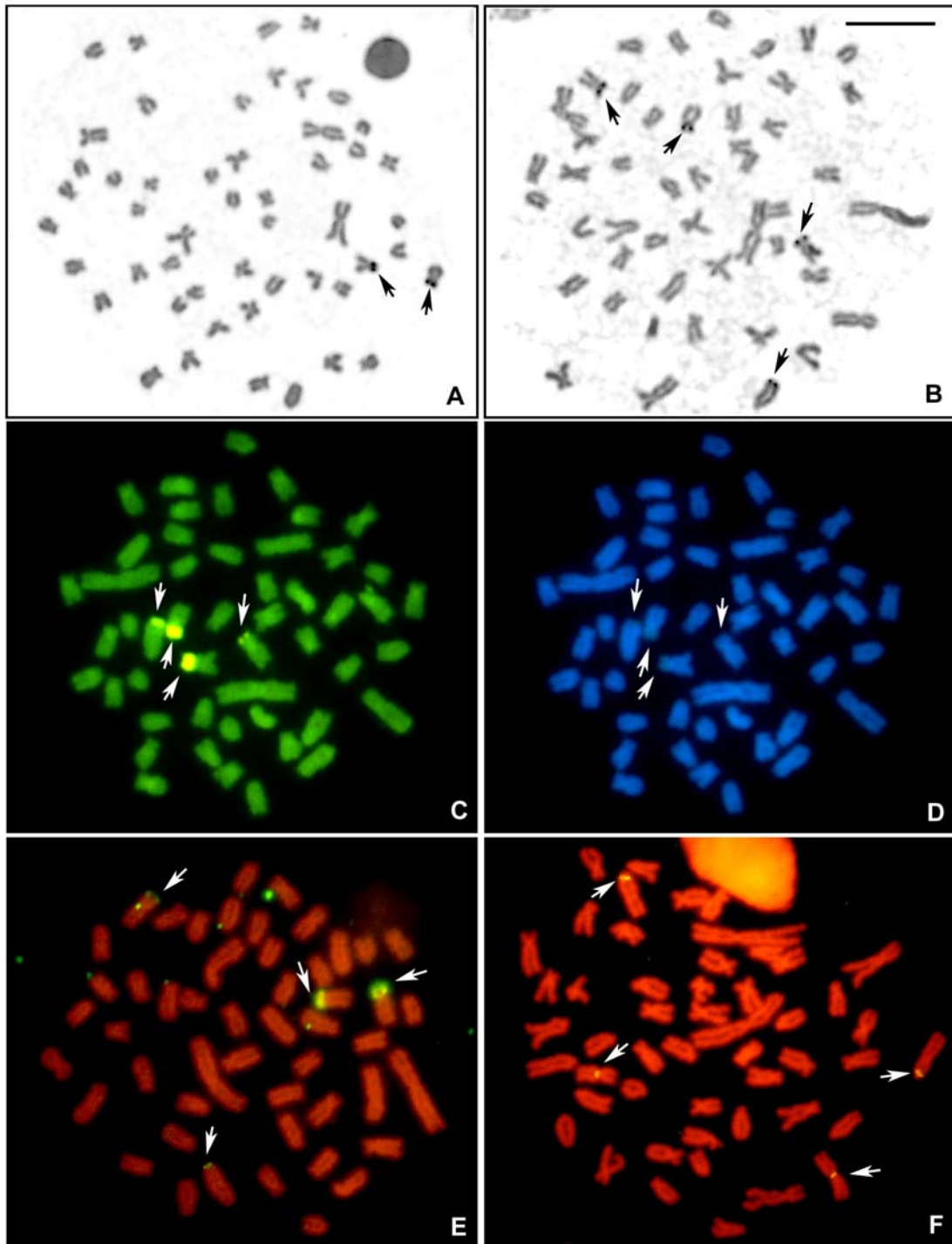


Figura 3. Metáfases de *Astyanax* sp (Cariótipo B) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 μ m.

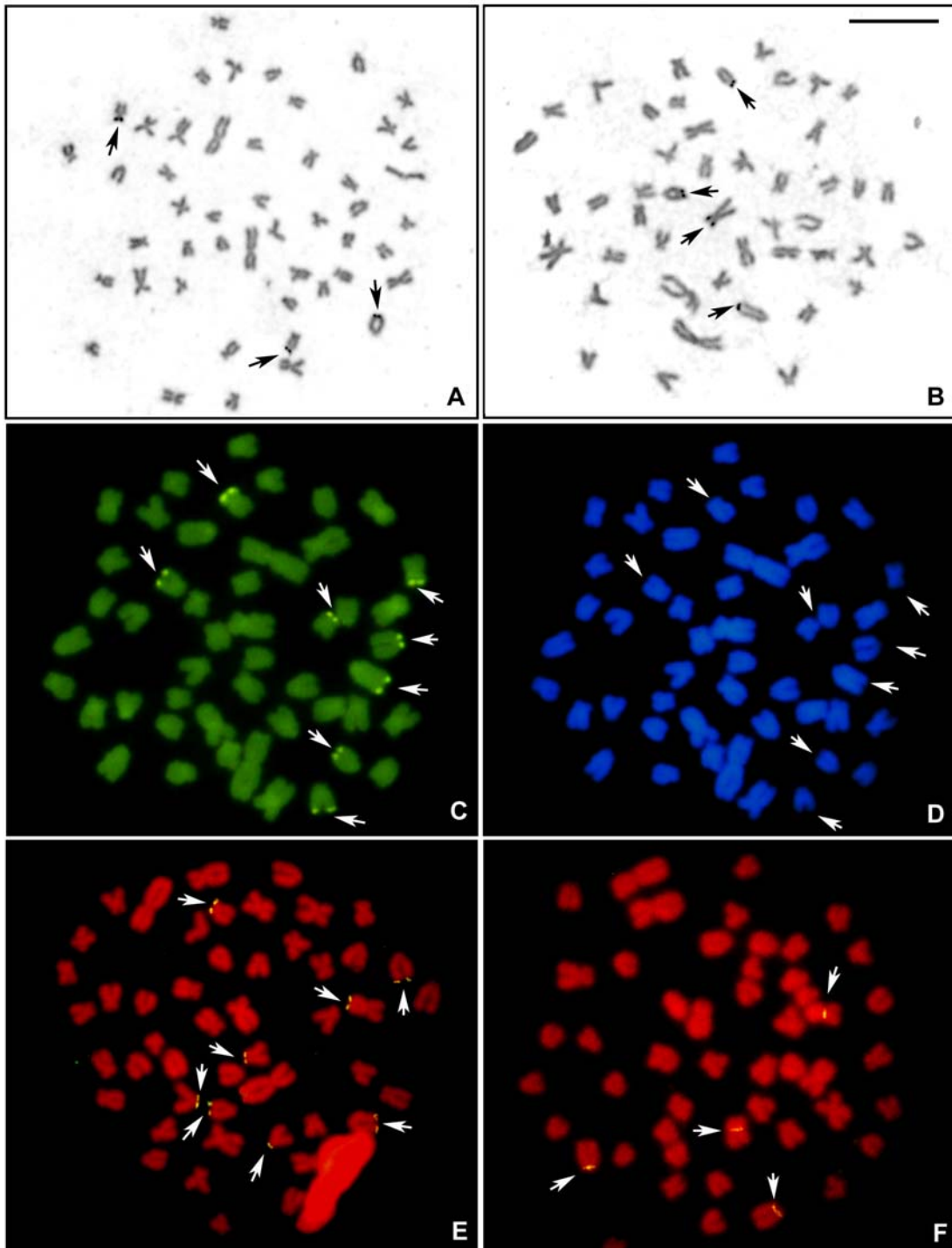


Figura 4. Metáfases de *Astyanax* sp (Cariótipo C) evidenciando em (A, B) os cromossomo portadores das Ag-RONs, (C) fluorocromo cromomicina A₃ mostrando sítios GC-positivos e seqüencialmente corados com o fluorocromo DAPI (D) mostrando os sítios AT-negativos, (E) os sítios de rDNA 18S, e (F) os sítios de rDNA 5S. A barra representa 10 μ m.

Tabela I. Número de exemplares estudados de *Astyanax* pertencentes às formas cariotípicas A, B e C.

Rios	Car	n. ♀	n. ♂	Total
Verde	A	31	13	44
Açungui	A	11	6	17
Santo Antônio	B	34	10	44
Santo Antônio	C	13	6	19
Jaguariaíva	C	0	6	6
Total		89	41	130

Car = Cariótipos; n. ♀ = número de fêmeas; n. ♂ = número de machos

Tabela II. Dados cariotípicos de *Astyanax* do rio Verde (bacia do rio Tibagi), rio Açungui (bacia do rio Ribeira), rio Santo Antônio (bacia do rio Jaguariaíva) e rio Jaguariaíva.

Rios	Car	2n	Fórmula Cariotípica				Variação Ag-RONs	No. Sítios 18S	No. Sítios 5S	Pares (a) heter. I.
			m	sm	st	a				
Verde	A	50	8	18	10	14	2-7	13	4	19 e 20
Açungui	A	50	8	18	10	14	2-10	13	4	19 e 20
Santo Antônio	B	50	8	18	10	14	1-4	4	4	20
Santo Antônio	C	48	10	16	10	12	2-5	8	4	20 e 21
Jaguariaíva	C	48	10	16	10	12	2-4	8	4	20 e 21

Car = Cariótipos; Pares (a) heter. I. = pares acrocêntricos com heterocromatina intersticial.

4.5 *Astyanax janeiroensis* da bacia do rio Ribeira

CO-LOCALIZAÇÃO, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DE DNAS SATÉLITES NOS DOMÍNIOS HETEROCROMÁTICOS DE *Astyanax janeiroensis* (Teleostei, *insertae sedis*).

(Em preparação).

Resumo

As heterocromatinas do peixe *Astyanax janae* foram analisadas com diferentes marcadores cromossômicos convencionais, fluorocromos base específicos e por hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA e do DNA satélite As51, possivelmente derivado de um elemento transponível de DNA. Três classes de DNAs repetitivos, relacionados à heterocromatina, puderam ser detectadas: (1) a heterocromatina centromérica, presente em todos os cromossomos do cariótipo; (2) a heterocromatina associada com as RONS, marcadamente GC-rica (heterocromatina GC/rDNA18S); (3) a heterocromatina presente em regiões intersticiais e teloméricas de 14 pares subtelo/acrocêntricos, composta por uma mescla do DNA satélite As51 inter-espaçado por regiões de rDNA 18S, detectada por dupla FISH. Essa heterocromatina não responde ao fluorocromo cromomicina A₃ e também responde negativamente ao fluorocromo DAPI, AT-específico (heterocromatina As51/rDNA18S/DAPI). São discutidos os papéis do DNA satélite As51 na evolução do genoma de *A. janae* a partir de uma hipótese de elemento transponível de DNA, as respostas discordantes dos fluorocromos base específicos ao conteúdo de bases presente em domínios heterocromáticos e a presença de caracteres cromossômicos que podem ser considerados sinapomorfias entre *A. janae* e *A. scabripinnis*, indicando uma forte relação de parentesco entre essas duas espécies.

Introdução

Uma importante fração do genoma dos eucariotos é representada por uma classe de DNA que é repetida várias vezes e que pode variar no tamanho e composição (ELDER & TURNER, 1995). Esta classe de DNA pode estar dispersa no genoma, ou organizada em tandem, formando um loco característico definido como DNA satélite. Unidades monoméricas repetidas são comumente detectadas nos centrômeros e telômeros dos cromossomos formando blocos heterocromáticos (TYLER-SMITH & WILLARD, 1993). Em geral, o bandamento C tem sido utilizado para caracterizar a localização destes blocos nos cariótipos. No entanto, como a composição da heterocromatina pode variar bastante (para uma revisão ver (VERMA, 1988; SUMNER, 1990), o emprego de fluorocromos base específicos, como os que identificam regiões AT ou GC ricas são úteis na caracterização dessas regiões cromossômicas, assim como, é por meio do isolamento, seqüenciamento e localização destes DNAs satélites *in situ* que regiões cromossômicas heterocromáticas podem ser melhor caracterizadas.

A origem de muitas famílias de DNA satélite é desconhecida, algumas delas podem ter sido derivadas de elementos transponíveis ou ter um componente maior que é relatado como sendo parte de um elemento móvel (EVGEN`EV et al., 1982; ZELENTOVA et al., 1986; HEIKKINEN et al., 1995; KAPITONOV et al., 1998). MESTRINER et al. (2000) isolou um DNA satélite do peixe *Astyanax scabripinnis* que apresentava repetições de 51 pares de bases (As51) e estava presente nas heterocromatinas distais, nas RONS e no cromossomo B da população estudada. Essa seqüência satélite de *A. scabripinnis* apresentou 58,8% de similaridade com uma porção do retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* e menor homologia com o gene da transposase do transposon TN4430 do *Bacillus thuringiensis*, sugerindo

que essa seqüência pode ter surgido a partir de um elemento transponível de DNA. Sendo assim, este DNA satélite pode ter sido transferido para os espaçadores do rDNA 45S na população estudada. MANTOVANI et al. (2004) estudando duas outras populações de *A. scabripinnis* mostraram que os blocos de heterocromatina distais com homologia para a seqüência *As51*, encontrados em ambas populações, apresentavam respostas discordantes para os fluorocromos base específicos que não poderiam ser atribuídos à composição de bases do DNA.

O cariótipo de *Astyanax janeiroensis* é característico por apresentar grandes blocos de heterocromatina em cromossomos subtelo/acrocêntricos (CARVALHO et al., 2002). Assim, este trabalho visou uma melhor caracterização da heterocromatina presente no cariótipo de *A. janeiroensis* empregando fluorocromos base específicos e FISH com sondas de rDNA e do DNA satélite *As51*, inter-relacionando e discutindo a composição e estrutura dos domínios heterocromáticos na evolução do genoma desta espécie.

Material e Métodos

Foram analisados os cariótipos de 32 espécimes de *A. janeiroensis*, 18 (7 machos e 11 fêmeas) provenientes do rio Socavão, Castro, PR (24° 53' 31" S; 49° 35' 37" W) e 14 espécimes (5 machos e 9 fêmeas) provenientes do rio Açungui, São Luís do Purunã, PR (25°44'89" S; 49°67'44" W), ambos pertencentes às cabeceiras do rio Ribeira no estado do Paraná. Exemplares testemunhos foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL 3835).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento "*in vivo*" com colchicina (BERTOLLO et al., 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) com o emprego do Nitrato

de Prata (HOWELL & BLACK, 1980), e a heterocromatina constitutiva foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972), bem como por dupla coloração com emprego dos fluorocromos cromomicina A₃ + DAPI (SCHWEIZER, 1980), que são indicativos das regiões GC e AT ricas, respectivamente.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de rDNA e do DNA satélite As51 nos cromossomos. Foram utilizadas as sondas de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr. 2004); uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999) e; uma sonda do DNA satélite As51 isolada a partir do DNA genômico do peixe *A. scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000). As sondas 18S e 5S foram marcadas com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal foram realizadas com os seguintes componentes: “TSA Kit with HRP.streptavidin and Alexa Fluor 488 tyramide” (Molecular Probes) para a sonda 18S; e sistema avidina-FITC conjugado – anti-avidina biotina conjugada (Sigma) para a sonda 5S. O DNA satélite As51 foi marcado por “nick translation” utilizando o composto “ChromaTide Alexa Fluor 546-14-dUTP” (Molecular Probes) e utilizado em dupla hibridação com a sonda de rDNA 18S. O procedimento geral de hibridação seguiu o protocolo descrito por PINKEL et al. (1986). A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização do sistema CoolSNAP-pro, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da sua razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos cariótipos.

Resultados

O cariótipo de *A. janeiroensis* está organizado em $2n=50$ cromossomos, diferenciados em $6m+14sm+14st+16a$, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 1). A heterocromatina foi localizada na região centromérica dos cromossomos, na região telomérica de alguns pares, bem como em grandes blocos na região intersticial do par acrocêntrico número 18 e na região telomérica dos cromossomos subtelocêntricos 11, 12, 13, 14 e acrocêntricos 19, 22 e 23 (Figura 1b). As regiões organizadoras de nucléolos, evidenciadas pelo nitrato de prata, (Ag-RONs) são múltiplas, variando entre três a sete sítios sempre com localização terminal (Figura 2a, b). A dupla marcação pela hibridação fluorescente *in situ* (Double FISH), com sonda de rDNA 18S e DNA satélite As51, mostrou 22 sítios de rDNA 18S (Figura 3a) e 14 sítios de DNA repetitivo As51 (Figura 3b). Entretanto, os 14 sítios As51 compartilham localização com o rDNA 18S, constituindo domínios cromossômicos As51/rDNA 18S (Figura 3c, f). Oito sítios são constituídos de apenas rDNA 18S (Figura 3c, f) e estes todos podem mostrarem-se ativos. A coloração com o fluorocromo DAPI mostrou 8 bandas DAPI negativas coincidentes aos sítios de rDNA 18S, bem como 14 bandas DAPI negativas aos domínios As51/rDNA 18S (Figuras 3d e 4a). A dupla coloração CMA₃/DAPI evidenciou 22 bandas DAPI negativas e 13 bandas GC positivas (Figura 4a, b). Os 8 sítios constituídos de apenas rDNA 18S são CMA₃ positivos/DAPI negativos (Figura 4a, b). O rDNA 5S foi localizado em um único par cromossômico acrocêntrico, em posição proximal ao centrômero, no braço longo (Figura 4c).

Discussão

A estrutura cariotípica de *A. janeiroensis* é similar à encontrada por CARVALHO et al. (2002) para uma outra população dessa mesma espécie. No entanto, o presente estudo mostrou que entre os 16 grandes blocos heterocromáticos, 14 compartilham a organização com duas classes de DNAs repetitivos (*As51* e rDNA 18S) e dois apresentaram apenas o rDNA 18S, marcadamente um par de cromossomos subtelocêntricos. Os demais sítios de rDNA 18S estão espalhados pelo complemento cromossômico em blocos heterocromáticos menores. A presença de mais de uma família de DNA satélite em um mesmo domínio heterocromático já é bem documentado em humanos (SHIELS et al., 1997), na cevada (RAMSAY et al., 1999), em drosofilídeos (WILDER & HOLLOCHER, 2001) e no peixe *Prochilodus lineatus* (JESUS et al., 2003).

Em *A. janeiroensis* o DNA satélite *As51* tem uma alta similaridade para elementos transponíveis, sugerindo desta forma que essa família de DNA em tandem pode ter derivado de um elemento móvel de DNA. Elementos transponíveis são potentes agentes mutagênicos com potencial de produzir uma ampla variação no genoma do seu hospedeiro (KIDWELL & LISCH, 2000; 2001). A gama de mutações induzidas pela atividade dos elementos transponíveis vai desde modificações no tamanho e organização de genomas inteiros até substituição, deleção e inserção de um simples nucleotídeo (KIDWELL, 2002). Em adição, detém habilidade para aumentar o genoma em tamanho por transposições, induzem rearranjos cromossômicos tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas. No genoma de *A. janeiroensis* hipotetizamos que a seqüência *As51* invadiu alguns espaçadores do rDNA maior e em seguida, por inúmeras transposições, carregou segmentos do rDNA maior para grandes domínios heterocromáticos *As51*. Ainda, o mecanismo de recombinação ectópica entre cópias

de elementos transponíveis da família *As51* em cromossomos não homólogos, como também descrito por (GRAY, 2000) podem ter auxiliado a espalhar a combinação *As51/rDNA* maior pelo genoma de *A. janeiroensis*. Permanece desconhecido o motivo de não ter ocorrido uma invasão do *As51* em todos domínios de rDNA maior, no entanto, muito provavelmente, deve ser uma estratégia do genoma da espécie para evitar o silenciamento gênico de todos sítios rDNA.

Uma análise citogenética detalhada da composição, conteúdo e localização das heterocromatinas presentes nessa espécie de peixe permitiu identificar três classes de DNAs repetitivos associados a heterocromatina: (1) uma heterocromatina centromérica presente em quase todos os cromossomos do cariótipo; (2) uma classe de heterocromatina em associação com os sítios de RONS, marcadamente GC ricas (heterocromatina GC/rDNA 18S) e; (3) uma classe de heterocromatina presente em regiões intersticiais e teloméricas de alguns dos pares cromossômicos subtelo/acrocêntricos, composta por uma mescla de DNA repetitivo *As51* interespaçado por regiões de rDNA 18S. Essa heterocromatina não responde ao fluorocromo cromomicina A_3 , no entanto, responde negativamente ao fluorocromo DAPI, AT específico (heterocromatina *As51/rDNA 18S/DAPI*⁻).

Nos peixes teleósteos os sítios de rDNA 18S tendem a conter grandes frações de DNA GC rico (AMEMIYA & GOLD 1986; SCHMID & GUTTENBACK 1988, ARTONI & BERTOLLO, 1999; PHILLIPHS & REED, 2000; MANTOVANI et al., 2004), indicando que os genes ribossomais estão provavelmente interespaçados pela heterocromatina (PENDÁS et al., 1993 a,b; ABUÍN et al., 1996). A associação da heterocromatina GC com o rDNA 18S, encontrada em *A. janeiroensis*, possui atividade transcricional mostrando uma grande variação intra- e interindividual de sítios Ag-RONS. Por outro lado, nenhum sítio Ag-RON foi coincidente a classe de

heterocromatina As51/rDNA 18S/DAPI⁺. É possível que o grande número das repetições As51, nessa classe de heterocromatina, possam estar promovendo um silenciamento na expressão do rDNA ali contidos, semelhante ao mecanismo de silenciamento gênico por elementos transponíveis propostos em outros grupos (DORER & NENIKOFF, 1994; FANTI et al., 1998). O número de sítios GC positivos (13 sítios) é superior ao número de sítios que apresentaram apenas o rDNA 18S (8 sítios). Assim, é possível que exista uma outra classe de heterocromatina GC rica, não coincidente com as RONS, como também descrito por ARTONI et al. (1999) no peixe *Liposarcus anisitsi*, ou que alguns sítios de rDNA 18S GC ricos tenham uma localização adjacente e contígua aos domínios As51/rDNA 18S/DAPI⁺, não sendo resolutivos pela dupla FISH.

MESTRINER et al. (2000) localizaram o DNA repetitivo As51 em um sítio coincidente com a RON, no cromossomo número 10 de *A. scabripinnis*, além de blocos com apenas As51 em região distal de alguns cromossomos acrocêntricos e na região intersticial do cromossomo B dessa espécie. Contudo, nesse caso, o DNA repetitivo As51 apresentava-se com o menor número de cópias, interespaçado em um sítio ativo de RON. ABEL et al. (2006) também localizaram a família de DNA repetitivo As51 nos blocos de heterocromatina distais em outras populações de *A. scabripinnis* e em *A. fasciatus*. Estes autores consideram que a diversificação do DNA satélite As51 em *A. scabripinnis* em termos de quantidade, posicionamento e conformação estrutural reforça a proposta que este grupo constitui um complexo de espécies (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991).

A terceira classe de heterocromatina detectada em *A. janeiroensis* mostrou-se constituída por duas famílias de DNAs repetitivos: As51 + rDNA 18S. O DNA repetitivo As51 é 59% rico em AT (MESTRINER et al., 2000), enquanto que o rDNA

18S geralmente é GC rico nos peixes (AMEMIYA & GOLD 1986; SCHMID & GUTTENBACK 1988, ARTONI & BERTOLLO, 1999). No entanto, a dupla coloração pelos fluorocromos cromomicina A₃ (GC específico) e DAPI (AT específico) mostrou que essa classe de heterocromatina apresentou apenas bandas DAPI negativas.

Alguns estudos têm procurado apresentar explicações para resultados discordantes entre conteúdo de bases de DNA e suas respostas aos fluorocromos base específicos (COMINGS & DRETS, 1976; SAITOH & LAEMMLI, 1994; MANTOVANI et al., 2004). O fluorocromo DAPI é DNA ligante, no entanto, sua fluorescência é significativamente aumentada em domínios AT ricos (LIN et al., 1977). COMINGS & DRETS (1976), COMINGS (1978) e JOHNSTON et al. (1978) descreveram que o antibiótico Daunomicina somente emite fluorescência quando o conteúdo AT rico ultrapassa os 65%. Dessa forma, é possível que o baixo número de sítios AT ricos, detectados por fluorocromos específicos entre os peixes, possa ser explicada pela ausência de DNA repetitivo AT rico superior a este percentual. Em *A. janeiroensis* dois diferentes fatores poderiam talvez estar atuando para formar sítios DAPI negativos na classe de heterocromatina As51/rDNA 18S (1) a falta de fluorescência associada a estes DNAs repetitivos de natureza rica AT ou GC pode ser devida a organização estrutural dessas seqüências heterocromáticas no arcabouço cromossômico, como descrito por SAITOH & LAEMMLI (1994), e/ou a interação entre essas duas classes de DNAs repetitivos promove um efeito de competição, gerando uma resposta aos fluorocromos discordante ao conteúdo de bases daquela região heterocromática.

Em *A. scabripinnis* SOUZA et al. (1996) verificaram que grandes blocos de heterocromatina também mostravam-se DAPI negativos e não respondiam ao fluorocromo mitramicina (GC específico), admitindo que esses resultados poderiam

ser devido à competição entre o contracorante distamicina e o fluorocromo DAPI, como modelo proposto por ZIMMER et al. (1971). MANTOVANI et al. (2004), estudando duas outras populações do complexo de espécies *A. scabripinnis*, uma com $2n=50$ e outra com $2n=48$ cromossomos, verificaram que sítios de heterocromatina, portadores do DNA repetitivo *As51*, apresentavam-se negativos à coloração Distamicina/DAPI e sem nenhuma resposta ao emprego apenas da coloração DAPI. Com a coloração Distamicina/Mitramicina obtiveram bandas positivas para a população de $2n=50$ cromossomos e nenhuma resposta para a população com 48 cromossomos. Assim, os blocos de heterocromatina distais com homologia para a seqüência *As51*, encontrados em ambas populações, apresentavam respostas discordantes para os fluorocromos base específicos que não poderiam ser atribuídos à composição de bases do DNA. Os autores consideraram a possibilidade da presença de uma segunda família de DNA satélite, GC rica, ao lado da família *As51*, no mesmo domínio heterocromático.

Nossos resultados em *A. janeiroensis*, somados aqueles encontrados para *A. scabripinnis*, permitem identificar que os DNAs repetitivos (*As51* e rDNA 18S) podem compartilhar dos mesmos domínios heterocromáticos, muito possivelmente o DNA satélite *As51* é derivado de um elemento móvel de DNA que têm promovido a diversificação do genoma destas espécies. As respostas discordantes, apresentadas para os fluorocromos base específicos, podem depender de vários fatores, como o número de repetições de cada uma dessas famílias de DNA, competição dos fluorocromos pelos sítios de ligação ou mesmo pela organização e ligação desse domínio heterocromático no arcabouço cromossômico.

Enquanto que um grande número de sítios de rDNA 18S ocorrem em *A. janeiroensis*, apenas um par cromossômico acrocêntrico mostrou-se portador do sítio

de rDNA 5S, na região proximal do braço longo. Esse par cromossômico é provavelmente homeólogo a um par acrocêntrico similar, encontrado em populações de *A. scabripinnis* (FERRO et al. 2001; ALMEIDA TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005). Por sua vez, o cromossomo subtelocêntrico portador de rDNA 18S em ambos os telômeros (RON bitelomérica) também já foi encontrado em populações de *A. scabripinnis* (MANTOVANI et al., 2000). Esses fatos, aliado ao compartilhamento dos domínios heterocromáticos acima descritos, reforçam uma relação de proximidade entre *A. janeiroensis* e *A. scabripinnis*, com vários caracteres cromossomos mantidos em sinapomorfia.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná), e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) pela autorização de pesca e captura (IBAMA/MMA No. 02017.000686/00-21). Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – proc. nº 03/13019-0), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós também somos gratos ao Dr. Oscar A. Shibata pela assistência taxonômica e ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela colaboração nas atividades de campo e laboratório.

Referências

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

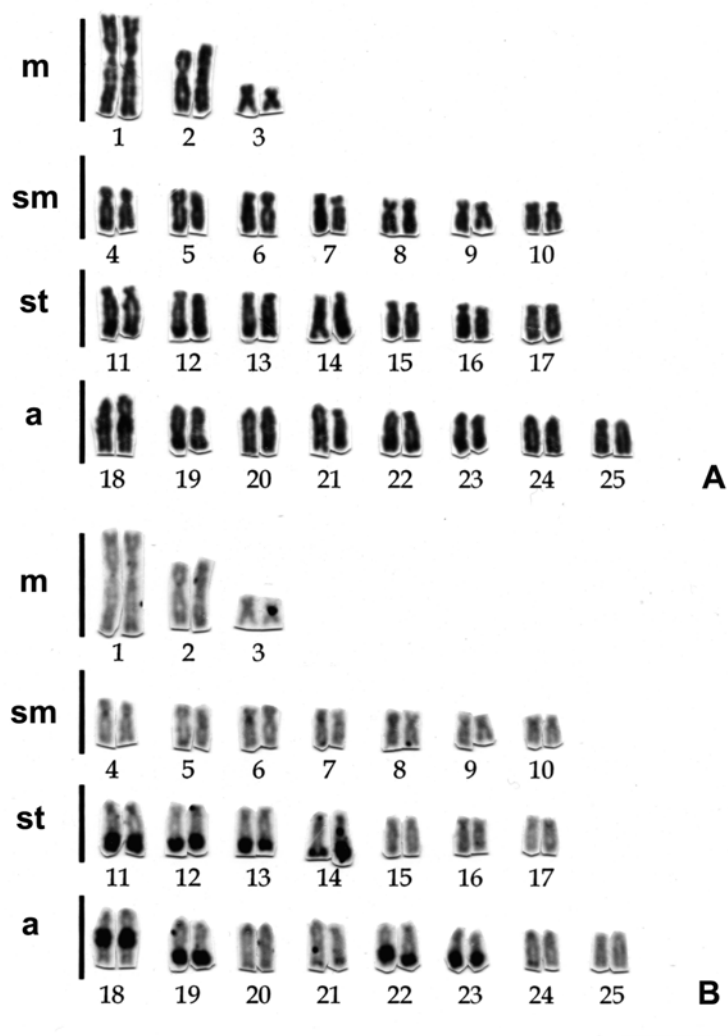


Figura 1. Cariótipo de *A. janeiroensis* da bacia do rio Ribeira. Em (A) coloração convencional por Giemsa; em (B) bandamento C seqüencial. A barra representa 5 µm.

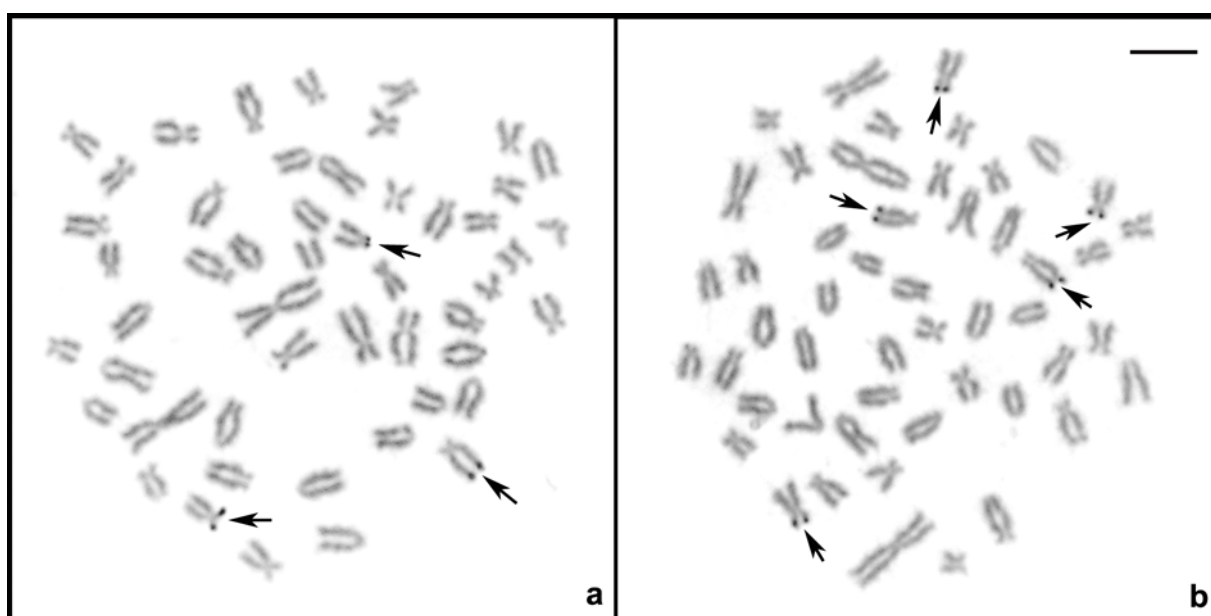
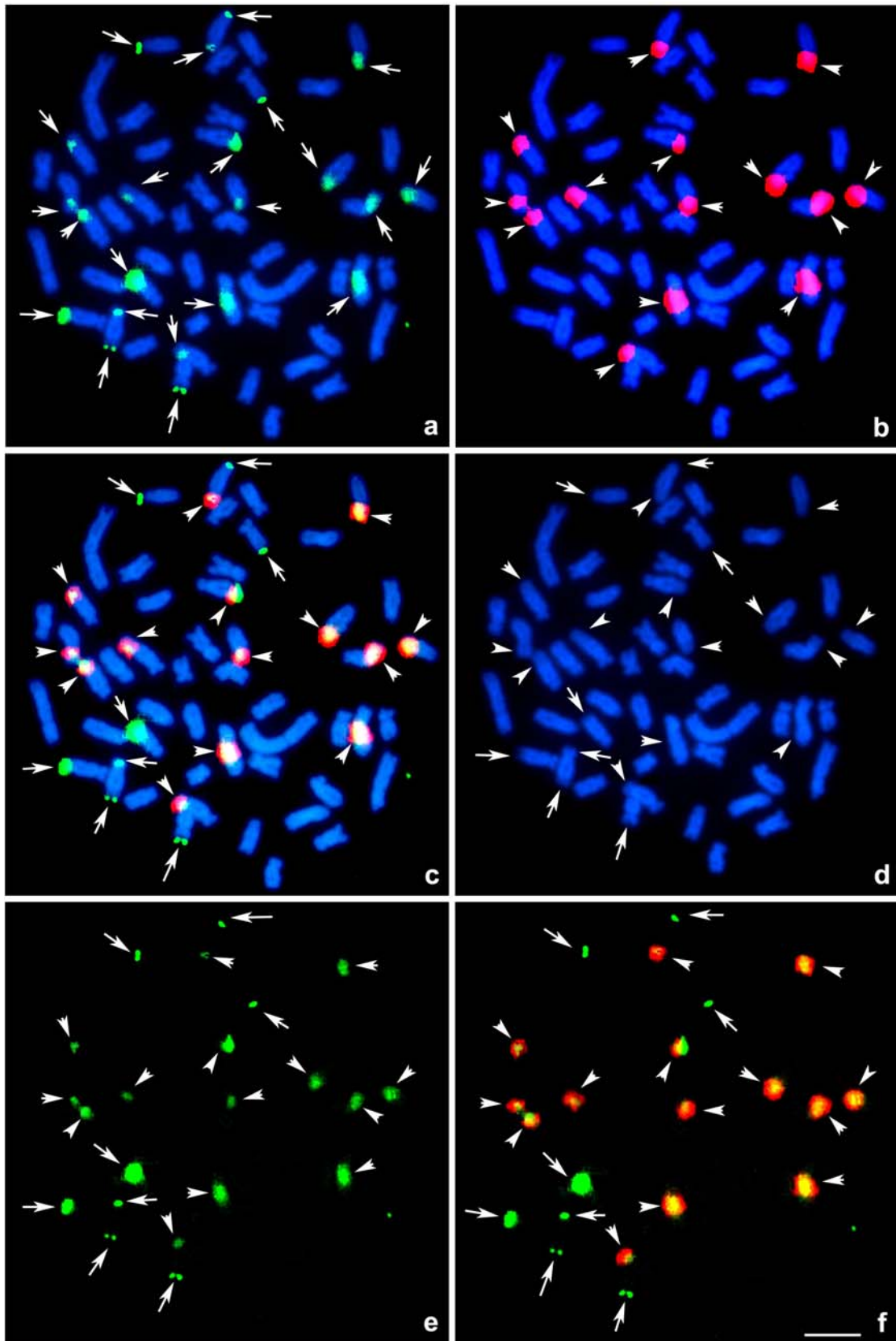
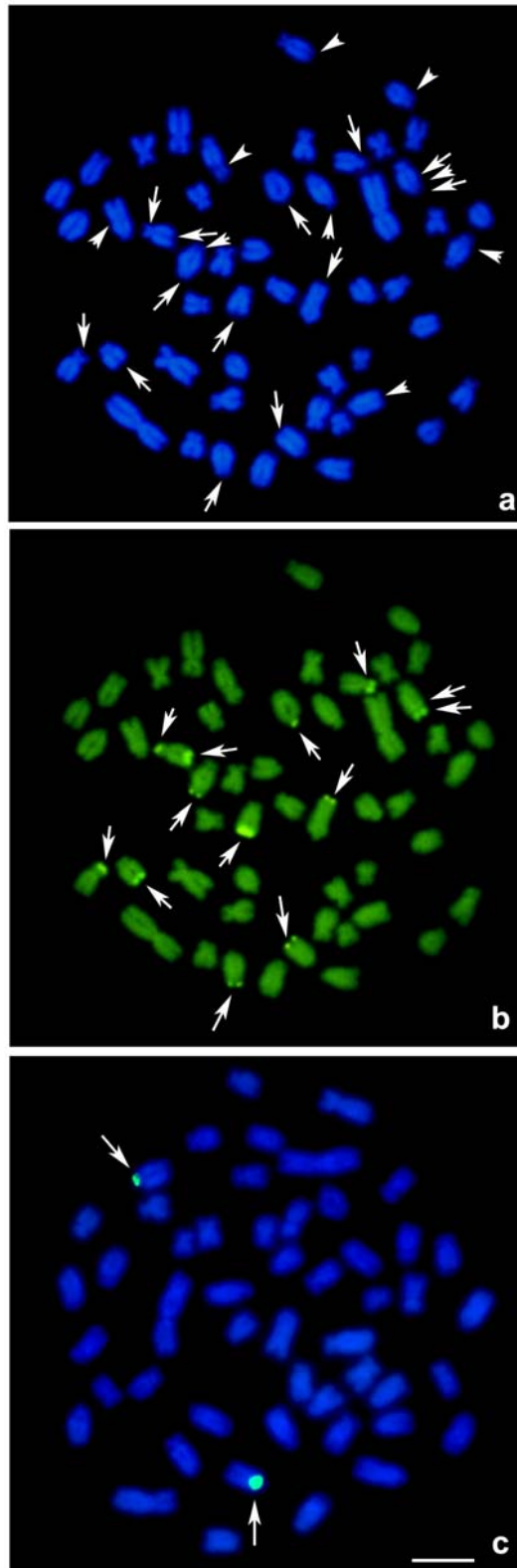


Figura 2. Metáfases de *A. janeiroensis* da bacia do rio Ribeira, tratadas com nitrato de Prata, mostrando variação numérica das RONS: (a) 3 sítios de Ag-RONs (setas); (b) 5 sítios de Ag-RONs (setas). A barra representa 5 μ m.



Legenda na próxima página.

Figura 3. Cromossomos de *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira, submetidos à dupla FISH, com sondas de rDNA 18S e DNA repetitivo As51 e coloração com DAPI: (a) sítios de rDNA 18S (setas); (b) sítios de DNA repetitivo As51 (cabeça de setas); (c) dupla marcação rDNA 18S e DNA repetitivo As51, as setas indicam sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S; (d) coloração com DAPI mostrando as regiões DAPI negativas; as setas indicam as regiões DAPI negativas referentes aos sítios de rDNA 18S; as cabeças de setas indicam as regiões DAPI negativas referentes aos domínios As51/rDNA 18S; (e) sinais fluorescentes obtidos por sondagem de rDNA 18S; as setas indicam sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S; (f) sobreposição de sinais fluorescentes obtidos por sondagem com rDNA 18S e DNA repetitivo As51; as setas indicam os sítios com apenas rDNA 18S, as cabeças de setas indicam os domínios cromossômicos As51/rDNA 18S. A barra representa 5 μ m.



Legenda na próxima página.

Figura 4. Cromossomos de *A. janeiroensis*, da bacia do rio Ribeira: (a) coloração por fluorocromo DAPI; as setas e cabeças de setas mostram os sítios DAPI negativos; (b) coloração pelo fluorocromo CMA₃, evidenciando regiões ricas em pares de bases GC, correspondentes às regiões DAPI negativas mostradas pelas setas em (a); (c) FISH com sonda de rDNA 5S, evidenciando sua localização em apenas um par de cromossomos (setas). A barra representa 5 µm.

4.6 *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* da bacia do rio Tibagi

UMA HIPÓTESE SOBRE A DIVERSIFICAÇÃO E EVOLUÇÃO DE UM SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW EM PEIXES NEOTROPICAIS DO GÊNERO *Characidium*.

(Em preparação).

Resumo

Foram analisados os cromossomos da espécie *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna, sub-afluente das cabeceiras do rio Tibagi, PR, com metodologias citogenéticas convencionais (coloração por Giemsa, Ag-RONs e bandamento C) e moleculares (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S). Esta população apresentou um cariótipo com $2n=50$ cromossomos, organizados em $32\ m + 18\ sm$ nos machos e $31m + 18\ sm + 1st$ nas fêmeas, representando assim um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Foram evidenciadas RONS múltiplas e sítios de rDNA 5S localizados em um único par cromossômico. O sistema de cromossomos sexuais ZW é comparável com o de outras três populações e/ou espécies de *Characidium* portadoras desse mesmo sistema, sendo característico de alguns representantes de um clado diferenciado neste gênero, também diagnosticado pela filogenia morfológica. Dados de biogeografia também corroboram uma origem comum para o sistema ZW de *Characidium*. Dessa forma, a ocorrência deste sistema de cromossomos sexuais provavelmente representa uma sinapomorfia em um clado diferenciado de *Characidium*.

Introdução

A ictiofauna Neotropical de peixes de água doce é a mais diversificada do mundo, com mais de 4000 espécies descritas (REIS et al., 2003). O número atual de espécies, entretanto, pode chegar a 8000 de acordo com algumas estimativas (SCHAEFER, 1998; VARI & MALABARBA, 1998), devido a uma ampla gama de ambientes inexplorados. As razões para esta pronunciada diversidade são comumente atribuídas a eventos históricos e ecológicos ao longo de milhões de anos de evolução desde a separação de Gondwana até o presente.

Os peixes Crenuchidae foram removidos da família Characidae, onde constituíam a subfamília Crenuchinae e, recentemente, considerados como uma nova família monofilética (BUCKUP, 1998). Esta unidade monofilética apresenta 80 espécies nominais, das quais 71 são consideradas válidas (BUCKUP, 1993a), sendo que uma hipótese de relação filogenética encontra-se disponível para a maioria dos *taxa* (BUCKUP, 1993c). *Characidium* é o gênero mais diversificado dos Crenuchidae e amplamente distribuído por sistemas de água doce entre o Panamá e Argentina, incluindo 59 espécies, das quais 48 são consideradas válidas (BUCKUP, 1993c). Contudo, esse gênero ainda é pobremente diagnosticado e várias espécies não estão descritas ou tiveram suas descrições realizadas recentemente, como *C. stigmatosum* (MELO & BUCKUP, 2002) e *C. longum* (TAPHORN et al., 2006).

Os dados citogenéticos disponíveis mostram que a diversificação de *Characidium* é acentuada principalmente no que se refere à presença de cromossomos sexuais heteromórficos. Embora a maior parte das populações e/ou espécies dos *Characidium* analisadas até o momento não possuam sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, ocorrem espécies que detêm um sistema do

tipo ZZ/ZW bem diferenciado (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003).

O principal objetivo deste artigo é descrever o cariótipo, características cromossômicas e o sistema de cromossomos sexuais heteromórfico ZZ/ZW na espécie *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* de uma população do alto rio Tibagi, PR, abordando também aspectos da evolução desse grupo com base na citogenética, filogenia morfológica e biogeografia.

Material e Métodos

Foram analisados os cariótipos de 17 espécimes de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi*, (8 machos e 9 fêmeas) provenientes do córrego Quebra Perna, Parque Estadual de Vila Velha (25° 14' 09" S; 50° 00' 17" W) pertencente às cabeceiras do rio Tibagi no estado do Paraná. Exemplares testemunhos (Figura 1) foram depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ 29183).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO et al., 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) com o emprego do nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980), e a heterocromatina constitutiva foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de rDNA nos cromossomos. Foram utilizadas as sondas de rDNA 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI Jr. 2004) e uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI Jr., 1999). As sondas 18S e 5S foram marcadas com biotina 14-dATP por “nick

translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal foram realizadas com os seguintes com os compostos avidina-FITC conjugado – anti-avidina biotina conjugada (Sigma). O procedimento geral de hibridação seguiu o protocolo descrito por PINKEL et al. (1986). A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. As figuras cromossômicas foram capturadas com a utilização do sistema CoolSNAP-pro, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), e subtlocêntrico (st) dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados por decréscimo de tamanho nos cariótipos.

Resultados e Discussão

Estrutura cariotípica

Characidium sp. cf. *C. gomesi* apresentou $2n=50$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo Z é um médio m, e o cromossomo W é um st um pouco maior em tamanho que o Z. Desta forma, os machos apresentaram uma fórmula cariotípica de $32m + 18 sm$ e as fêmeas $31m + 18 sm + 1st$ (Figura 2).

Apesar de aparentar uma estrutura cariotípica relativamente estável, mostrando $2n=50$ cromossomos de dois braços, usualmente meta-submetacêntricos o gênero *Characidium* tem demonstrado uma série de divergências inter-específicas e interpulacionais (Tabela 1) como a ocorrência de cromossomos B (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; MAISTRO et al., 1998), sistemas de cromossomos sexuais com heterogametia feminina (MAISTRO et al., 1998; CENTOFANTE et al., 2001;

2003), triploidia natural (CENTOFANTE et al., 2001) e uma variação na localização e número dos sítios de rDNA (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO; 2006). Condições de simpatria e sintopia entre espécies distintas também tem sido verificada algumas vezes nesse gênero (CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO; 2006).

O número diplóide $2n = 50$ cromossomos é detectado em todas espécies do gênero e a macroestrutura cariotípica de $32m + 18 sm$ é a situação mais comumente verificada em *Characidium*, com exceção de *C. pterosticum* (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994) e *C. lauroi* (CENTOFANTE et al., 2003), ambas pertencentes à bacia do Leste, que apresentam um par st e poucas diferenças no número de cromossomos m e sm (Tabela 1), evidenciando que rearranjos cromossômicos tais como inversões e translocações poderiam ter desempenhado um papel importante na diversificação cariotípica destas espécies.

Sítios de rDNA

Characidium sp. cf. *C. gomesi* do presente estudo possui múltiplos sítios de rDNA maior, mostrando uma variação de 2-7 Ag-RONs ativas (Figura 3a). A hibridação *in situ* evidenciou 10 sítios de rDNA 18S todos nas regiões terminais dos cromossomos. Dentre eles, foi possível identificar um grande par sm com o sítio de RON na região telomérica do braço longo (Figura 3a, b). Este par cromossômico é homeólogo a outras espécies de *Characidium* que apresentam RONs simples (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO; 2006).

A localização e o número de sítios de rDNA têm sido espécie-específico para algumas espécies de peixes neotropicais (JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000;

VICENTE et al., 2001; ARTONI et al., 2006) podendo estar também associado com a diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais (BORN & BERTOLLO, 2000; ARTONI et al., 2001; ARTONI & BERTOLLO, 2002; VICARI et al., 2003). No gênero *Characidium* a localização dos sítios de rDNA mostrou-se variável entre algumas espécies (Tabela 1), podendo ser um marcador espécie-específico em alguns casos. CENTOFANTE et al. (2003), propuseram que as espécies de *Characidium* com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (*C. gomesi* e *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*) são mais relacionadas entre si do que as espécies sem tais sistemas, considerando também uma comparação com a filogenia morfológica e a posição telomérica do sítio de rDNA em um par sm grande, não relacionado ao sexo. Recentemente SILVA & MAISTRO (2006) estudaram outra população de *C. gomesi* que possui o sítio de rDNA em posição telomérica de um cromossomo sm grande e que, no entanto, não apresenta sistema de cromossomos sexuais heteromórficos. Estes mesmos autores consideram que esta população identificada como *C. gomesi* poderia, na realidade, representar uma nova espécie para o gênero. *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do presente estudo, além de apresentar um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW diferenciado, possui múltiplos sítios de rDNA maior incluindo o grande par sm com o sítio na região telomérica do braço longo (Figura 3b). Nossos dados, associados a aqueles disponíveis para o gênero, sugerem que o rDNA maior dos *Characidium* possui uma diversificação independente da diferenciação dos cromossomos sexuais Z e W no gênero, e que estes continuam seus processos evolutivos independentemente. *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* também apresentou um único par cromossômico m portador do sítio ribossomal 5S, em posição proximal ao centrômero, no braço curto (Figura 3c), condição considerada plesiomórfica entre os peixes Neotropicais (MARTINS & GALETTI Jr., 1999).

Heterocromatina e diferenciação do cromossomo sexual W

Characidium sp. cf. *C. gomesi* apresenta blocos heterocromáticos centroméricos e/ou pericentroméricos, na maioria dos cromossomos, além de alguns sítios teloméricos (Figura 2 b, d), situação já verificada no gênero (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001, 2003; SILVA & MAISTRO; 2006). Além disso, *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* apresentou uma pequena banda heterocromática proximal no braço longo do cromossomo Z, assim como o cromossomo W totalmente heterocromático (Figura 2d), situação também diagnosticada para todas espécies de *Characidium* que possuem sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW heteromórficos, embora estes cromossomos possam variar em morfologia e tamanho. Nas populações de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do rio Pardo e rio da Quinta, descritas por MAISTRO et al. (1998) como *C. cf. fasciatum*, o par sm pequeno nº 19 foi considerado o par sexual ZW, portanto sem diferença quanto ao tamanho do Z e do W. CENTOFANTE et al. (2001) consideram o cromossomo Z sendo o m número 2 e o cromossomo W sendo um m menor em tamanho em uma população de *C. gomesi* do córrego Paiol Grande. Por sua vez, em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, do córrego Ribeirão Grande, o primeiro par metacêntrico é considerado o par sexual ZW, também sem diferença de tamanho entre o Z e o W (CENTOFANTE et al., 2003). No presente estudo, *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna apresentou um cromossomo Z m, correspondente ao oitavo par no cariótipo e, um cromossomo W st, um pouco maior em tamanho que o cromossomo Z.

Dessa forma, se os cromossomos Z e W de *Characidium* foram inicialmente um par homólogo, a heterocromatinização parece constituir um passo decisivo na

diferenciação do cromossomo W, seguido por modificações estruturais tais como deleções e/ou inversões, conforme mostrado no idiograma comparativo dos cromossomos sexuais das espécies portadoras desse sistema (Figura 4c). Nessa proposta, não somente o W estaria modificando em forma e tamanho, como também o cromossomo Z poderia ter sofrido reduções em tamanho em relação a possível condição ancestral. Este mecanismo está de acordo com o modelo para a evolução de cromossomos sexuais heteromórficos (MULLER, 1964; CHARLESWORTH, 1978; GREEN, 1990). Nesse modelo, o cromossomo Y (ou W) é protegido da presença constante do cromossomo X (ou Z), que é evolutivamente confinado à homozigotidade em um dos sexos, e restrito quanto à habilidade para recombinação. Assim, é possível para o cromossomo Y (ou W) progredir de uma condição inicial de homomorfismo com o cromossomo X (ou Z) para um cromossomo diferenciado, podendo mesmo tornar-se pequeno e heterocromático, com poucos locos funcionais.

Em outros grupos de peixes Neotropicais a presença de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos também surge como uma condição sinapomórfica, por vezes presente em todas espécies do gênero, como em *Triportheus* (ARTONI & BERTOLLO, 2002) ou em alguns de seus representantes, como no gênero *Leporinus* (GALETTI Jr. & FORESTI, 1986) e família Parodontidae (CENTOFANTE et al., 2002; VICARI et al., 2006).

Dados citogenéticos associados à filogenia morfológica e biogeografia das espécies estudadas

CENTOFANTE et al. (2003) já consideraram que as três espécies de *Characidium*, que até então apresentavam cromossomos sexuais ZW, faziam parte

de um subconjunto derivado de Characidiinae devido à presença de algumas sinapomorfias morfológicas e, que foram agrupadas como membros do clado 2 diagnosticado por BUCKUP (1993b). Verificaram também que a ausência de cromossomos sexuais ZW (condição considerada plesiomórfica) na espécie *C. zebra* (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; MAISTRO et al., 1998; CENTOFANTE, et al., 2001), corroborava os dados morfológicos de BUCKUP (1993b) onde essa espécie é considerada mais primitiva, ocupando uma posição basal na filogenia de *Characidium*.

Além das evidências citogenéticas correspondentes as morfológicas, dados de distribuição e da biogeografia histórica podem auxiliar na compreensão da diversificação de *Characidium*. O gênero é conhecido por apresentar espécies estritamente de cabeceiras de rios e com baixo deslocamento. CENTOFANTE et al. (2001) propõem que eventos de captura de cabeceiras de rios poderiam explicar a ocorrência simpátrica de espécies de *Characidium* com e sem sistemas de cromossomos sexuais. Nesse sentido, a presença de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em uma das espécies simpátricas reforçaria o isolamento reprodutivo entre as mesmas tornando-se uma vantagem evolutiva para a diversificação do gênero.

Por outro lado, as formas que exibem o cromossomo W são alopátricas e, por vezes situadas em sistemas hidrográficos diferentes (Figura 4). Este atual estado de alopatria poderia explicar a diferenciação independente dos cromossomos Z e W encontrados entre estas espécies e/ou populações (CENTOFANTE et al., 2001; 2003). *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do rio pardo e rio da Quinta, *C. gomesi* do córrego Paiol Grande e *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna fazem parte do sistema hidrográfico do alto rio Paraná, porém isoladas nas

cabeceiras dos rios Paranapanema, Grande e Tibagi, respectivamente. Estas três populações são identificadas como possivelmente pertencentes à espécie *C. gomesi* por não apresentarem caracteres morfológicos suficientes para diagnosticá-las como entidades diferentes. No entanto, citogeneticamente estas populações apresentam cromossomos W em estados avançados de diferenciação. Nesse sentido, o atual estado de diferenciação de cada sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW destas populações são resultantes da falta de fluxo gênico entre elas e poderiam representar um potente mecanismo de isolamento reprodutivo tornando cada população, embora morfológicamente semelhante, uma espécie diferente.

Os três rios citados acima têm suas nascentes em regiões limítrofes com as nascentes da bacia do Leste no Brasil. *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* ocorre no córrego Ribeirão Grande, nascentes do rio Paraíba do Sul (bacia do Leste) em área adjacente a bacia do rio Grande (sistema do rio Paraná). RIBEIRO (2006) descreve baseado em processos geológicos relacionados aos eventos cladogenéticos que os padrões de distribuição e filogenéticos sugerem uma íntima associação dos rios que correm para o Atlântico (bacia do Leste) e os adjacentes das terras altas do escudo cristalino (sistema do alto rio Paraná) com inúmeros exemplos de fauna inclusiva entre as cabeceiras dos rios costeiros (Ribeira do Iguape e Paraíba do Sul) e nascentes dos rios Iguçu, Tietê e Paranapanema. Dessa forma, essa área apresenta um intercâmbio de fauna entre os rios de terras altas e drenagens costeiras, e vice versa (RIBEIRO, op cit.). Essa região se sobrepõe à área de ocorrência de sistemas de cromossomos ZW heteromórficos em *Characidium*, podendo assim auxiliar no entendimento dos processos de dispersão entre as espécies. A hipótese mais provável é que a ocorrência de espécies sintópicas e simpátricas, algumas vezes uma apresentando sistema de cromossomos sexuais

heteromórficos enquanto outra não possui nenhum dimorfismo de cromossomos relacionados ao sexo é baseada em eventos de capturas de cabeceiras de rios, com conseqüente inclusão de fauna e colocando estas espécies em simpatria.

Assim, a presença de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos surge como uma sinapomorfia em um clado diferenciado do gênero *Characidium* sustentada pelas evidências citogenéticas, filogenia morfológica do grupo e por dados de biogeografia.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IAP (Instituto Ambiental do Paraná), e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) pela autorização de pesca e captura (IBAMA/MMA No. 02017.000686/00-21). Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – proc. nº 03/13019-0), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Nós também somos gratos ao Dr. Paulo A. Buckup pela assistência quanto à taxonomia das espécies e ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela colaboração nas atividades de campo e laboratório.

Referências

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



Figura 1. Espécime de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna, subafluente do rio Tibagi, PR. Barra = 90 mm

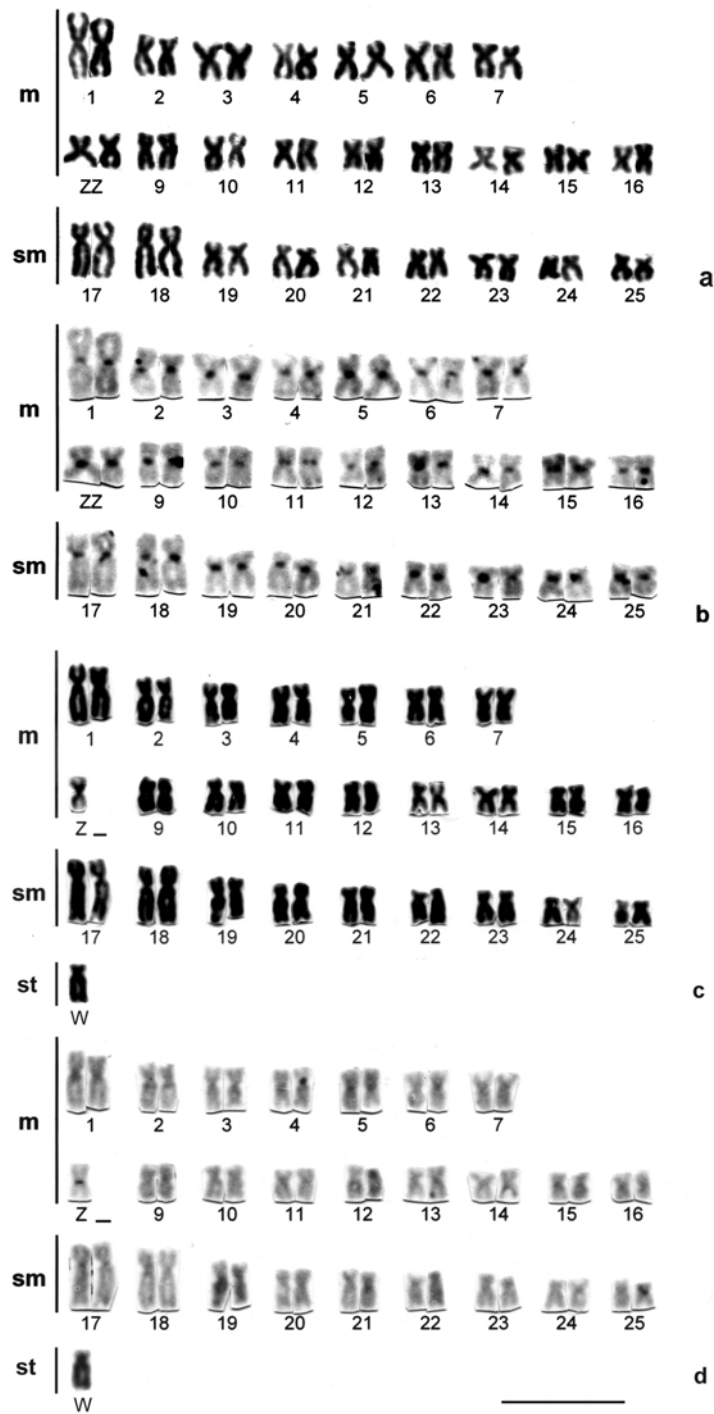


Figura 2. Cariótipos de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna. (a) cariótipo de macho com coloração convencional por Giemsa; (b) bandamento C seqüencial; (c) cariótipo de fêmea com coloração convencional por Giemsa; (d) bandamento C seqüencial. A barra representa 5 µm.

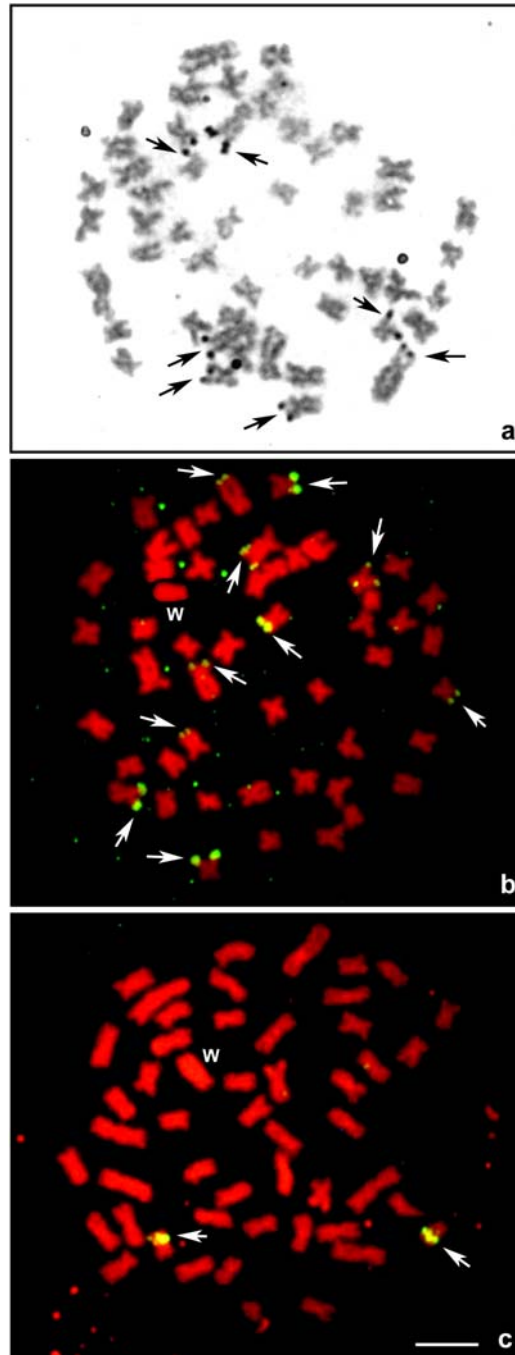


Figura 3. Metáfases de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna. (a) coloração por nitrato de prata, as setas representam os sítios Ag-RONs ativos; (b) hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S em metáfase de fêmea, sendo identificado o cromossomo W e os sítios de rDNA 18S (setas); (c) hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S em metáfase de fêmea, sendo identificado o cromossomo W e os sítios de rDNA 5S (setas). A barra representa 5 μ m.

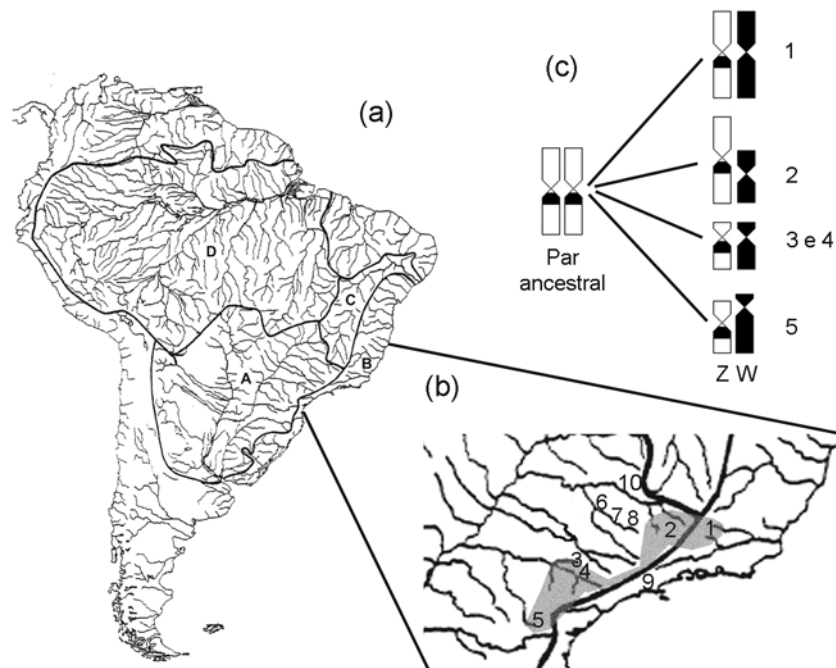


Figura 4. Mapa hidrográfico da América do Sul (a); A = sistema hidrográfico do rio Paraná, B = conjunto de rios costeiros que compõem a bacia do Leste, C = bacia do rio São Francisco e D = bacia Amazônica; em (b) detalhe parcial da margem leste do sul e sudeste do Brasil; a área em destaque mostra a região de abrangência de espécies de *Characidium* que até o presente momento apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, 1 ribeirão Grande (*Characidium* sp. cf. *alipioi* e *C. lauroi*), 2 córrego Paiol Grande (*C. gomesi* e *C. zebra*), 3 rio Pardo (*Characidium* sp cf. *C. gomesi*), 4 rio da Quinta (*Characidium* sp cf. *C. gomesi*), 5 córrego Quebra Perna (*Characidium* sp cf. *C. gomesi*), 6 reserva Jataí (*C. zebra* e *C. lagsantensis*), 7 rio Passa Cinco (*C. zebra*), 8 rio Piracicaba (*C. zebra*), 9 Reserva Carlos Botelho (*C. pterosticum*) e 10 rio Machado (*C. zebra* e *C. gomesi*); em (c) idiograma sobre a hipótese proposta da diversificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Characidium*: 1 *Characidium* sp. cf. *alipioi* do ribeirão Grande, 2 *C. gomesi* do córrego Paiol Grande, 3 *Characidium* sp cf. *C. gomesi* do rio Pardo, 4 *C. sp* cf. *C. gomesi* do rio da Quinta, 5 *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna.

Tabela 1 – Dados cromossômicos para as espécies de *Characidium* da bacia do rio Paraná e suas localidades. m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; CS = cromossomos sexuais; B = cromossomos B; T = terminal; I = intersticial; Ref. = referências; Simp. = Simpátricas.

Espécies	Fórmula Cariotípica				CS	B	Pares Ag-RONs	sítios 18S	sítios 5S	Localidade	Ref.
	m	sm	st	a							
<i>C. zebra</i>	32	18	-	-	-	-	25 (T)	-	-	Reserva Jataí SP	1
<i>C. zebra</i>	32	18	-	-	-	1	25 (T)	-	-	Rio Passa Cinco SP	1-2
<i>C. zebra</i>	32	18	-	-	-	-	25 (T)	-	-	Rio Piracicaba SP	1
<i>C. zebra</i>	32	18	-	-	-	-	23 (I)	-	-	Córrego Paiol Grande SP	4
<i>C. zebra</i>	32	18	-	-	-	-	23 (T)	-	-	Rio Machado MG	7
<i>C. lagosantensis</i>	32	18	-	-	-	-	-	-	-	Reserva Jataí SP	1
<i>C. pterosticum</i>	32	16	2	-	-	-	-	-	-	Reserva Carlos Botelho SP	1
<i>C. lauroi</i>	24	24	2	-	-	-	5 e 23 (T)	-	-	Ribeirão Grande SP	5
<i>C. gomesi</i>	32	18	-	-	-	-	17 (T)	-	-	Rio Machado MG	7
<i>C. gomesi</i>	32	18	-	-	ZZ/ZW	-	18 (T)	-	-	Córrego Paiol Grande SP	4
<i>Characidium</i> sp. cf. <i>C. gomesi</i>	32	18	-	-	ZZ/ZW	0-4	17 (T)	2 (T)	-	Rio Pardo e da Quinta SP	3, 6
<i>Characidium</i> sp. cf. <i>C. gomesi</i>	♂ 32	18	-	-	ZZ	-	vários (T)	10 (T)	2 (I)	Rio Quebra Perna PR	8
<i>C. sp.</i> cf. <i>C. alipioi</i>	♀ 31	18	1	-	ZW	-	(T)	-	-	Ribeirão Grande SP	5

Referências : 1. Miyazawa & Galetti Jr. (1994); 2. Miyazawa (1991); 3. Maistro et al. (1998); 4. Centofante et al. (2001); 5. Centofante et al. (2003); 6. Maistro et al. (2004); 7. Silva & Maistro (2006); 8. Presente estudo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou uma análise citogenética para algumas espécies de peixes de pequeno porte coletadas nas cabeceiras das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi. Algumas espécies tiveram uma análise citogenética populacional comparativa entre diferentes bacias, enquanto em outras foram abordados problemas específicos inerentes apenas à uma população. Assim, este trabalho discutiu principalmente aspectos de citogenética, citotaxonomia, biogeografia e de biologia evolutiva das populações de *Corydoras paleatus*, *Corydoras ehrhardti*, *Apareiodon* sp., *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma facetum*, *Astyanax* “complexo *scabripinnis*”, *Astyanax janeiroensis* e *Characidium* sp. cf. *C. gomesi*.

O gênero *Corydoras* foi considerado composto por cinco grupos de espécies (OLIVEIRA et al., 1992), cada um deles se caracterizando por similaridades cariotípicas e de conteúdo de DNA. Na bacia do Leste, OLIVEIRA et al. (1993a) consideram que a simpatria de diferentes espécies de *Corydoras* ocorre entre grupos cariotípicos distintos, possivelmente em decorrência da possível evolução polifilética.

As espécies simpátricas *C. paleatus* e *C. ehrhardti*, da lagoa Dourada, bacia do alto rio Tibagi, são do mesmo grupo cariotípico ($2n=44$ cromossomos). Assim, as condições especiais de vicariância e distribuição das espécies litorâneas, proposta por WEITZMAN et al. (1988) parecem se aplicar, no caso do gênero *Corydoras*, apenas para a região costeira, enquanto no interior do continente a distribuição atual das espécies desse gênero pode representar eventos históricos de especiação e biogeografia mais complexos, mesmo porque *C. ehrhardti* não realiza migração enquanto *C. paleatus* migra a curtas distâncias (WINEMILLER, 1989; BURGESS, 1989).

Na família Parodontidae, a nova espécie aqui estudada, *Apareiodon* sp., proveniente do rio Verde, bacia do alto rio Tibagi, é morfológicamente semelhante a *Apareiodon ibitiensis*. No entanto, enquanto que *Apareiodon* sp. apresenta um sistema cromossômico simples de determinação do sexo do tipo ZZ/ZW bem diferenciado, em *A. ibitiensis* nenhum heteromorfismo de cromossomos sexuais foi encontrado (MOREIRA-FILHO et al., 1984; 1985; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000). Além disso, a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais simples (ZZ/ZW) era uma situação que, até então, parecia exclusiva do gênero *Parodon* entre os parodontídeos (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003). Assim sendo, a existência do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Apareiodon*, como apresentado neste trabalho, gera alguns questionamentos quanto ao agrupamento das espécies pertencentes à família Parodontidae. Uma provável origem em comum para os sistemas ZZ/ZW na família Parodontidae é uma hipótese plausível de ser testada por uma filogenia mais robusta e por mapeamento dos dados citotaxonômicos.

Dentre os Perciformes, foram estudadas amostras comparativas de três populações de *G. brasiliensis* (bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi), assim como uma população de *C. facetum* (bacia do rio Tibagi). Essas populações apresentaram número cromossômico considerado basal para Perciformes, $2n=48$ cromossomos (GALETTI Jr. et al., 2000). No entanto, o número fundamental encontrado para ambas espécies pode ser considerado derivado (NF=54 em *G. brasiliensis* e NF=58 em *C. facetum*). Mecanismos de inversão pericêntrica podem explicar a variação do NF encontrado entre os Perciformes (GALETTI Jr. et al., 2000; AFFONSO & GALETTI Jr., 2005). Ainda, essas espécies e populações mostraram

pares cromossômicos homeólogos portadores de sítios de rDNA maior e menor. A análise da heterocromatina pelo bandamento C evidenciou pequenas diferenças de blocos intersticiais presentes na população de *G. brasiliensis* do rio Jaguariaíva, os quais não foram visualizados para as populações dos rios Ribeira e Tibagi. Assim, as diferenças constatadas quanto ao padrão de bandamento C evidencia que a população do rio Jaguariaíva se apresenta diferenciada em relação às demais no tocante a esse caráter, possivelmente como consequência da restrição ao fluxo gênico entre elas ao longo da sua história geológica e evolutiva.

Populações do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* também tiveram uma análise citogenética comparativa entre as bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi. Nesta análise foram identificadas três formas cariotípicas, denominadas de cariótipo A ($2n=50$ cromossomos, sendo $8m+18sm+10st+14a$ e com treze sítios de rDNA 18S); cariótipo B ($2n=50$ cromossomos, sendo $8m+18sm+10st+14a$ e com 4 sítios de rDNA 18S; e cariótipo C ($2n= 48$ cromossomos, sendo $10m+16sm+10st+12a$ e com oito sítios de rDNA 18S). A forma cariotípica A, identificada como *A. paranae*, ocorre no centro de distribuição da localidade tipo da espécie, nas proximidades da cidade de Castro (rio Verde, bacia do Tibagi) e pode ter atingido, por dispersão promovida por eventos de capturas de cabeceiras de rios, a bacia do rio Ribeira (cabeceiras do rio Açungui). As formas cariotípicas B e C são simpátricas e sintópicas, ocorrendo somente na bacia do rio Jaguariaíva sem nenhuma evidência de formas híbridas. Os dados obtidos são importantes para a citotaxonomia de *A. paranae*, assim como para a elaboração de hipóteses sobre a evolução do cariótipo de espécies do complexo *A. scabripinnis*.

Os resultados obtidos para as diferentes populações do complexo de espécies *A. scabripinnis* das bacias dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi reforçam a

proposta que eventos de vicariância, provavelmente por capturas de cabeceiras de rios, podem ter sido responsáveis pela mistura de faunas e distribuição atual de *A. paranae* nas bacias dos rios Ribeira e Tibagi, conforme também proposto em estudos anteriores nessa região com a espécie *Hoplias malabaricus* (VICARI et al., 2005) e *Geophagus brasiliensis* (VICARI et al., no prelo). Os resultados de hibridação *in situ* quanto ao número e localização do rDNA 18S, bem como a presença do citótipo B de $2n=48$ cromossomos na população do rio Jaguariaíva, permitem identificar uma ictiofauna do complexo de espécies *Astyanax scabripinnis* mais relacionadas entre si nas populações da bacia do rio Jaguariaíva do que aquelas populações de *A. paranae* das bacias dos rios Ribeira e Tibagi, possivelmente como consequência de um provável isolamento entre elas. Esses resultados são concordantes com aqueles apresentados por *G. brasiliensis* nas mesmas localidades (VICARI et al., no prelo).

Em *Astyanax janeiroensis* foi aplicado um amplo estudo de citogenética molecular no intuito de buscar um melhor entendimento da localização, composição e natureza dos grandes domínios heterocromáticos presentes no cariótipo da espécie. *A. janeiroensis* tem um cariótipo constituído por $2n=50$ cromossomos, RONS múltiplas e grandes blocos de heterocromatina presentes em cromossomos subtelo- acrocêntricos, como também encontrado por CARVALHO et al. (2002). O estudo relaciona o possível papel do DNA satélite As51 na evolução do genoma de *Astyanax janeiroensis* a partir de uma hipótese de elemento transponível de DNA. Foram identificadas três classes de heterocromatinas, presentes no cariótipo, sendo uma delas centromérica, uma outra constituída por heterocromatina GC/rDNA 18S e uma terceira classe composta por uma mescla do DNA satélite As51/rDNA 18S que respondeu negativamente ao fluorocromo DAPI (heterocromatina As51/rDNA

18S/DAPI⁻). Questões quanto à composição e emissão de fluorescências desses domínios heterocromáticos foram abordadas na tentativa interpretar os dados obtidos.

Foi também possível identificar uma estreita relação filogenética de *A. janeiroensis* com *A. scabripinnis*, por meio de marcadores citogenéticos, como o compartilhamento de um mesmo par cromossômico portador de rDNA 5S, RONS múltiplas, presença de um cromossomo subtlocêntrico com RONS biteloméricas e presença do DNA satélite *As51* e blocos heterocromáticos distais.

Na espécie *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* do córrego Quebra Perna, subafluente do rio Tibagi, PR foi demonstrada a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Este sistema é comparável para as outras três populações e/ou espécies de *Characidium* que apresentam cromossomos sexuais heteromórficos. Essas espécies que compartilham o sistema ZZ/ZW fazem parte de um clado diferenciado no gênero, pela filogenia morfológica proposta por Backup (1993b). Dados de biogeografia mostram a ocorrência destas espécies em regiões limítrofes das cabeceiras do rio Paraíba do Sul (bacia do Leste) e rios Grande, Paranapanema e Tibagi (sistema do alto rio Paraná). Está sendo proposto que a presença deste sistema de cromossomos sexuais surge como uma sinapomorfia em um clado diferenciado do gênero *Characidium*, com base nas evidências citogenéticas, na filogenia morfológica do grupo e na biogeografia.

Alguns rios de terras altas do escudo cristalino do sul-sudeste do Brasil mostram um intercâmbio de faunas com drenagens costeiras (RIBEIRO, 2006). São elas: as cabeceiras dos rios Ribeira de Iguape, Iguazu, Paranapanema e uma porção do alto rio Tietê. Essas áreas apresentam características geológicas interessantes, onde um complexo sistema de falhas e movimentos verticais de blocos impuseram

uma aceleração do dinamismo fluvial. Na região das cabeceiras dos rios Paranapanema, Iguazu e Ribeira de Iguape a mais proeminente característica geológica é o arco de Ponta Grossa. O arco consiste de uma elevação da formação cristalina na porção leste da bacia do Paraná atuando como um atual divisor de águas entre os rios costeiros e do sistema do rio Paraná (PETRI & FULFARO, 1983). O Arco de Ponta Grossa é visível nos mapas geológicos como uma curvatura para o oeste da porção sudeste da bacia do Paraná (RAPOSO, 1995) dispendo de um intrincado sistema de profundas falhas e fraturas. Esse sistema de falhas pode ter canalizado um imenso fluxo de lava da bacia do Paraná, no Cretáceo, de uma região formada por diques de magma intrusivo à esquerda do arco de Ponta Grossa, conhecido como formação da Serra Geral. Alguns autores têm apontado uma tendência de elevação do Arco de Ponta Grossa (ALMEIDA & CARNEIRO, 1998) o qual teve grande atividade tectônica durante o Cenozóico (ALMEIDA & CARNEIRO, 1998; SOUZA & SOUZA, 2002). A atividade tectônica do Arco de Ponta Grossa pode ter resultado em uma aceleração do dinamismo fluvial entre sistemas de drenagens adjacentes, acelerando o compartilhamento de fauna entre elas (RIBEIRO, 2006). No arco de Ponta Grossa, as falhas controlam o relevo e os padrões de drenagem (MELO, 2002). Movimentos verticais entre blocos falhados e evolução erosiva dos rios ao longo desta região promoveram uma mistura entre drenagens adjacentes, o que poderia facilitar o compartilhamento de fauna que ocorre entre a bacia costeira do Ribeira de Iguape e as cabeceiras dos rios Paranapanema e Iguazu (RIBEIRO, 2006).

A ocorrência de ictiofauna compartilhada entre estes rios já havia sido detectado citogeneticamente por VICARI et al. (2005) estudando populações de *Hoplias malabaricus* entre áreas adjacentes das cabeceiras dos rios Iguazu, Ivaí,

Tibagi e Ribeira. No presente estudo, a análise comparativa de populações das espécies *Geophagus brasiliensis* e *Astyanax paranae* também permitiram detectar esse compartilhamento entre as cabeceiras do rio Tibagi e Ribeira de Iguape, nas imediações do Arco de Ponta Grossa. A presença de espécies endêmicas da bacia do Leste ou do rio Iguaçu (entre elas: *Hyphessobrycon* sp. cf. *H. griemi*, *Mimagoniates microlepis*, *Trichomycterus davisii*) nas cabeceiras do rio Tibagi, nos permite identificar um incursão de fauna para esta região. Por outro lado, a bacia do rio Jaguariaíva parece não ter participado deste processo de fauna, onde *G. brasiliensis* e espécies do complexo *A. scabripinnis* possuem cariótipos mais diversificados em relação aqueles encontrados nas cabeceiras dos rios Tibagi e Ribeira de Iguape. Possivelmente esta região apresente uma fauna mais endêmica, justificando a sua alta prioridade para inventário ictiológico pelo Ministério do Meio Ambiente (2000).

O relatório do Ministério do Meio Ambiente “Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos” (2000) indicou áreas prioritárias para estudos de peixes em grandes regiões aquáticas, consideradas unidades ecológicas/biogeográficas básicas, agregando comunidades que têm em comum a maioria das espécies, a mesma dinâmica e condições ambientais idênticas. Entre elas, estavam presentes as regiões de Mata Atlântica que incluem as cabeceiras do rio Iguaçu-PR e cabeceiras do rio Ribeira-PR, e as cabeceiras do rio Paranapanema, parcialmente incluídas tanto na Mata Atlântica como nos Campos Sulinos.

Assim, o presente estudo procurou também comparar citogeneticamente peixes de cabeceiras de três rios paranaenses incluídos nestas áreas: 1 cabeceiras

dos rios Ribeira de Iguape incluso em uma área de Mata Atlântica Densa, PR; 2 cabeceiras do rio Tibagi, pertencente à região dos Campos Gerais, PR e; 3 cabeceiras do rio Jaguariaíva, PR, parcialmente incluso nestas duas áreas, com finalidade de verificar se há uma íntima relação destes biomas com os níveis de endemismo e dispersão de espécies de peixes nestas áreas. MENEZES (1998) considera o alto grau de endemismo o traço mais marcante da ictiofauna regiões, resultante do processo de evolução histórica das espécies em uma área geomorfológica isolada das outras áreas onde se localizam as demais bacias hidrográficas brasileiras. Entretanto, apesar destas drenagens adjacentes corresponder a áreas de grande significado biogeográfico, apresentando um alto grau de endemismo em sua fauna de peixes decorrente do isolamento geográfico histórico entre elas, nas regiões de cabeceiras dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi parece existir um intercuro de faunas como resultado de captura de rios de terras altas pelas drenagens costeiras, e vice-versa, tendo como consequência a dispersão de espécies endêmicas e não endêmicas nos sub-afluentes destas áreas adjacentes. Dessa forma, o isolamento histórico destes biomas tem papel preponderante no endemismo destas ictiofaunas, enquanto que eventos geológicos posteriores podem estar atuando no compartilhamento da fauna em regiões adjacentes, onde o relevo tem sido alvo de constantes modificações.

Em resumo, as populações de peixes das cabeceiras dos rios Jaguariaíva, Ribeira e Tibagi apresentam particularidades citogenéticas, biogeográficas e de biologia evolutiva que podem ser aplicadas ao entendimento da biodiversidade de nossa ictiofauna e à sua conservação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L.D.S.; MONIQUE MANTOVANI, M. & MOREIRA-FILHO, O. 2006. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genet Mol Biol** 29 (3): 448-452.
- AB'SÁBER, A.N. 1970. Domínios morfoclimáticos no Brasil. **Geomorfologia** 20: 18-26.
- ABUÍN, M., CLABBY, C., MARTÍNEZ, P., GOSWAMI, U., FLAVIN, F., WILKINS, N.P., HOUGHTON, J.A., POWELL, R.; SÁNCHEZ L. 1996. A NOR associated repetitive element present in the genome two *Salmo* species (*Salmo solar* and *Salmo trutta*). **Genome** 39: 671-679.
- AFFONSO, P.R.A.M.; GALETTI Jr., P.M., 2005. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). **Genética** 123: 227-233.
- ALMEIDA, F.F.M.; CARNEIRO, C.D.R.1998. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências** 28(2): 135–150.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1978. **Contribuição à citogenética de Gymnotoidei (Pisces, Osthariophysi)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1998. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M. & Lucena, C.A.S. (eds) **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, pp. 583-588.

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. 1984. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genetica** 64(3): 165-169.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; PÉQUIGNO, T.E.V.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. 2001. XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. **Cytogenet Cell Genet** 95: 73-78.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. 2002. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 97: 229–233.
- ALVES, A.L.; SANTOS, I.C.M. 2002. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) with 2n=48 chromosomes.. **Cytologia** 67: 117-122.
- ALVES, A.L. 2002. **Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysii, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, SP.
- ALVES, A.L., OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia** 56 (1): 57-63.
- AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. 1986. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia** 1: 226-231.

- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. 1994. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. **Caryologia** 47: 27-37.
- ARTONI R.F.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, Jr. P.M. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet Mol Biol** 22: 1-6.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica** 106: 209-214.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C., 2001, Trends in the Karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134: 201-210.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C., 2002, Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. **Heredity** 89: 15-19.
- ARTONI, R.F.; FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research** 9: 449-456.
- ARTONI, R.F.; VENERE, P.C.; BERTOLLO, L.A.C. 1998. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia** 63: 421-425.
- ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. 2000. Citogenética de peixes neotropicas: métodos, resultados e perspectivas. **Publicatio UEPG** 6(1): 41-60.
- ARTONI, R.F.; TERÊNCIO, M.L.; VICARI, M.R.; MATIELLO, M.C.A.; CESTARI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. 2006. Cytogenetics of two sympatric *Corydoras*

- species (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) of southern Brazil. **Braz J Biol** 66(1b): 29-41.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genet Mol Biology** 28: 710-716.
- BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, A.O.; GARAVELLO, J.C. 2000. **Peixes do rio Tibagi: uma abordagem ecológica**. Editora UEL, Londrina.
- BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. 1995. Composición ictiofaunística en cinco localidades de la cuenca del rio Tibagi, PR - Brasil. **Interciência** 20: 7-13.
- BERTACO, V.A.; LUCENA, C.A.S. 2006. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotr Ichthyol** 4: 53-60.
- BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res** 8: 603-613.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr, P.M. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J Fish Biol** 28: 153-159.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASH, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev Bras Genet** 1(2): 103-120.
- BIZERRIL, C.R.S.F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biol Leopoldensia** 16(1): 51-80.

- BOCKMANN, F.A.; CASTRO, R.M.C.; BIZERRIL, C.R.S.F. 1995. Sistemática e biogeografia dos bagres do gênero *Rhamdiopsis* Haseman, 1911 (Siluriformes, Pimelodidae). In **Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Zoologia**, Porto Alegre, RS.
- BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res** 8: 111-118.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. 1984. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca.
- BRUM, M.J.I.; GALETTI Jr., P.M. 1997. Ancestral karyotype of Teleostean fish. **J Comp Biol** 2: 91-102.
- BRUM, M.J.I. 1995. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. In: **Série Monografias 2**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 5-42.
- BRUM, M.J.I.; MURATORI, C.F.M.L.; LOPES, P.R.D.; VIANNA, P.R.G. 1998. A ictiofauna do sistema lagunar de Marica (RJ). **Acta Biol Leopoldensia** 16(2): 45-55.
- BUCKUP, P.A. 1991. **The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relations with other characiform fishes**. PhD Thesis. Univeristy of Michigan.

- BUCKUP, P.A. 1993a. The monophyly of Characidiinae, a Neotropical group of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysi). **Zool J Linn Soc** 108: 225–245.
- BUCKUP, P.A. 1993b. Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi). **Cladistics** 9: 305–341.
- BUCKUP, P.A. 1993c. Review of characidiin fishes (Teleostei: Characiformes), with descriptions of four new genera and ten new species. **Ichthyol Explor Freshw** 4: 97–154.
- BUCKUP, P.A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds), **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 123–144.
- BURGESS, W.E., 1989, **An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes, a preliminary survey of the Siluriformes**. TFH Publications, Neptune, United States, 784 p.
- CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2002. Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia** 55: 181-188.
- CASTRO, R.M.C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: CARAMASHI, E.P.; MAZZONI, R.; BIZERRIL, C.R.S.F.; PERES-NETO, P.R. **Ecologia de peixes de riachos: Estado Atual e Perspectivas**, (eds.). Oecologia Brasiliensis, v. VI, Rio de Janeiro, p. 139-155.
- CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; STOPIPLIA, R.; ABREU, T.X;

- BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C.T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica** 3(1): 1-31.
- CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2001. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia** 54(3): 253-260.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2002. ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 54: 139-150.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MIYAZAWA, C.S.; MOREIRA-FILHO, O., 2003. Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia** 68: 283-288.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; BUCKUP, P.A.; MOREIRA-FILHO, O. 2003. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidim* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). **Hereditas** 138: 213-218.
- CHARLESWORTH, B. 1978. Model for the evolution of Y chromosomes and dosage compensation. **Proc Natl Acad Sci USA** 75: 5518-5622.
- COMINGS, D.E.; DRETS, M.E. 1976. Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, hoechst 33258 and daunomycin banding? **Chromosoma** 56:199-211.
- COMINGS, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structures. **Ann Rev Genet** 12: 25-46.

- DANIEL-SILVA, M.F.Z. 1996. **Estudos citogenéticos de quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DEIANA, A.M.; CAU, A.; SALVADORI, S.; COLUCCIA, E.; CANNAS, R.; MILIA, A.; TAGLIAVINI, J. 2000. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. **Chromosome Res** 8: 213-218.
- DIAS, A.L.; FORESTI, F., 1993, Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Brazil J Genetics** 16: 585-600.
- DORER, D.R.; HENIKOFF, S. 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. **Cell** 77: 993–1002.
- ELDER, J.F.; TURNER, B.J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **Q Ver Biol** 70: 297–320.
- EVGEN'EV, M.B., YENIKOLOPOV, G.N.; PEUNOVA, N.I.; ILYIN, Y.V. 1982. Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila*. **Chromosoma** 85: 75–386.
- FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C., 1984 An additional chromosome in two fish species. **Brazil J Genet** 1: 109-118.
- FANTI, L., DORER, D.R.; BERLOCO, M.; HENIKOFF, S.; PIMPINELLI, S. 1998. Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays. **Chromosoma** 107: 286–292.
- FAUAZ, G.; VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O. 1994. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazil J Genet** 2: 157-163.

- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. 1985a. Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38: 257-268.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. 1985b. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38: 319-324.
- FELDBERG, E., PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L.A.C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of Cichlid fishes during evolution, 258-308. In: VAL, A.L.; KAPOOR, B.G. **Fish adaptations**. Science Publishers, INC. New Dehli & New York. 418 pp.
- FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C., 1992a. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. **Cytobios** 69: 41-46.
- FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C., 1992b. Karyotype, C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). **Cytobios** 72: 19-22.
- FENOCCHIO, A.S. 1993. **Cromossomos supranumerários no gênero Rhamdia (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- FENOCCHIO, A.S.; JORGE, L.C.; VÊNERE, P.C.; BERTOLLO, L.A.C., 1993. Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in three species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). **Brazil J Genetics** 16: 1097-1101.
- FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. 1991. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia** 44: 161-166.

- FERRO, D.A.M., MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62.
- FERRO, D.A.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2003. B chromosome polymorphism in the fish *Astyanax scabripinnis*. **Genetica** 119: 147-153.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. 1984. Chromosomes studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). **Caryologia** 37: 141-146.
- FOWLER, H.W. 1948. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq Zool** 6: 1-204.
- GALETTI Jr. P.M.; FORESTI, F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenet Cell Genet** 43: 43-46.
- GALETTI JR., P.M. 1998. Chromosome diversity in Neotropical fish. NOR studies. **Ital J Zool** 65 (suppl.): 53-56.
- GALETTI Jr., P.M.; BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA-FILHO, O. 1994. Trends in chromosome evolution in Neotropical characiform fishes. **Caryologia** 47: 289-297.
- GALETTI Jr., P.M.; AGUILAR, C.T.; MOLINA, W. 2000. An overview of marine fish cytogenetics. **Hidrobiologia** 420: 55-60.
- GARAVELLO, J.C.; BRITSKI, H.A. 1993. Duas novas espécies do gênero *Schizodon* Agassiz, da Bacia do Alto Paraná, Brasil, América do Sul (Ostariophysi, Anostomidae). **Naturalia** 15: 153-170.
- GARAVELLO, J.C. 1977. Descrição de *Apareiodon vittatus* SP. N. do rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* EIGNMANN, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae). **Rev Brasil Biol** 37: 447-455.

- GARUTI, V.; BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Telostei: Characidae) da bacia do Alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc PUCRS** 13: 65-88.
- GÉRY, J. Characoids of the world. **TFH Publications**: 672p, 1977.
- GRAY, Y.H. 2000. It takes two transposons to tango: transposable element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends Genet** 16: 461–468.
- GREEN, D.M. 1990. Muller`s Ratched and the evolution supernumerary chromosomes. **Genome** 33: 818-824.
- HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239-244.
- HEIKKINEN, E.; LAUNONEN, V.; MULLER, E.; BACHMANN, L. 1995. The pvB370 BamIII satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. **J Mol Evol** 41: 604–614.
- HERAS, M.P. 1998. **Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de alguns rios do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.
- HSU, T.C.; SPIRITO, S.E.; PARDUE, L.M. 1975. Distribution of 18/28S ribosomal genes in mamalian genomes. **Chromosoma** 53: 25-36.
- HUBERT, N.; RENNO, J. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **J Biogeogr** 33: 1414-1436.

- INGENITO, L.F.S. & BUCKUP, P.A. 2005. A New Species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia** 2005 (4): 765–771
- JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. 2000a. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia** 65: 397-402.
- JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. 2000b. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyol Explor Freshwatsrs** 11: 75-80.
- JESUS, C.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 1999. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica** 105: 63-67.
- JESUS, C.M.; GALETTI, Jr. P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. 2003. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** 118: 25-32.
- JOHNSTON, F.P.; JORGENSON, K.F.; LIN, C.C.; SANDE, J.H. 1978. Interaction of anthracyclines with DNA and chromosomes. **Chromosoma** 68:115-129.
- JORGE, L.C., MOREIRA-FILHO, O. 2000. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorfism. **Genetica** 109: 267-273.
- JORGE, L.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2004. Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 57: 203-207.
- JUSTI, A.J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces-Characidae, em três bacias hidrográficas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.

- KAPITONOV, V.V.; HOLMQUIST, G.P.; JURKA, J. 1998. L1 repeat is a basic unit of heterochromatin satellites in Cetaceans. **Mol Biol Evol** 15: 611–612.
- KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. **Trends Ecol Evol** 15: 95–99.
- KIDWELL, M.G., LISCH, D.R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution** 55: 1–24.
- KIDWELL, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica** 115: 49–63.
- KORNFIELD, I.L.; RITTE, U., RICHLER, C.; WAHRMAN, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the Sea of Galilee. **Evolution** 33: 1-14.
- KULLANDER, S.O. 1983. **A revision of the South American cichlid genus *Cichlasoma* (Teleostei: Cichlidae)**. Naturhistoriska Riksmuseet, Stockholm.
- LE GRANDE, W.H. 1981. Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus*. **Copeia** 1: 33-52.
- LEVAN, A.; FREDGA, K., SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- LIM, J.K.; SIMMONS, M.J. 1994. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Bioessays** 16: 269–275.
- LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, S.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA,

- P.H.F. (2003) Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.V.E.N.O.; FERRARIS Jr., C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.
- LOUREIRO, M.A. 1999. **Análise citogenética em quatro espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- MAACK, R. 1968. Os sistemas hidrográficos do Estado do Paraná. In: **Geografia física do Estado do Paraná**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 1998. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genet Mol Biol** 21: 201-206.
- MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae, Tetragonopteridae). **Gen Mol Biol** 2(2): 365-369.
- MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2001. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica** 110: 177-183.
- MAISTRO, E.L.; JESUS, C.M.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. 2004. Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). **Cytologia** 69:181-186.
- MAISTRO, E.L.; PRIETO-MATA, E.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 1998. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica** 104: 1-7.

- MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109: 161-168.
- MANTOVANI, M., ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genet Mol Biology** 27: 536-542.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** 123: 211-216.
- MARTINEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C.; ARIAS, J.; AMARO, R.; SANCHEZ, L. 1991. Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of sea and brown trout from northwestern Spain. **Heredity** 66: 9-17.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 363-367.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J.M. 2000. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas** 133: 39-46.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; WRIGHT, J.M.; FORESTI, F. 2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenet Genome Res** 98: 78–85

- MARTINS, I.C.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO Jr, H.F. 1995. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná river. **Cytologia** 42: 535-537.
- MATOSO, D.A.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; SHIBATTA, O.A.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. 2002. Karyotypic studies in the Characidae fish, genus *Astyanax*. An endemic and highly isolated population of *Astyanax* sp. **Cytologia** 67: 123-128.
- MELO, M.R.; BUCKUP, P.A. 2002. *Characidium stigmosum* (Characiformes: Crenuchidae): a new species of characidiin fish from central Brazil. **Copeia** 4: 988–993.
- MELO, M.S. 2002. Canyon do Guartelá, PR: profunda garganta fluvial com notáveis exposições de arenitos devonianos. Pp. 279–288. *In*: SCHOBENHAUS, C.; CAMPOS, D.A.; QUEIROZ, E.T.; WINGE, M.; BERBERT-BORN, M.L.C. (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. Brasília. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), 540p.
- MENEZES, N.A. 1994. Importância da conservação da ictiofauna dos ecossistemas aquáticos brasileiros. **Seminário sobre Fauna Aquática e o setor Elétrico Brasileiro**. COMASE, ELETROBRAS. Caderno 3, Conservação. p 7-13.
- MENEZES, N.A. 1998. Padrões de distribuição da biodiversidade da Mata Atlântica do Sul e Sudeste Brasileiro: Peixes de Água Doce. *In*: **Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rainforest**. Base de Dados Tropicais. [Publicação "on line"].
- MENEZES, N.A.; CASTRO, R.M.C.; WEITZMAN, S.H.; WEITZMAN, M.J. 1990. Peixes de riacho da Floresta Costeira Atlântica Brasileira: um conjunto pouco

- conhecido e ameaçado de vertebrados. *In*: Watanabe, S. (coordenador) **II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Manejo e Função**. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo. pp. 290-295.
- MESTRINER, C.A.; GALETTI Jr., P.M.; VALENTINI, S.R.; RUIZ, I.R.G.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. 1999. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85: 1-9.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2000. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. *in*: <http://www.conservation.org.br/ma/mapas/peixes.htm>.
- MIYAZAWA, C.S.; GALETTI Jr., P.M. 1994. First cytogenetical studies in *Characidium* (Characidiinae, Characidae). **Cytologia** 59: 73-79.
- MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. 1998a. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Gen Mol Biol** 21: 55-61.
- MIZOGUCHI, S.M.H.N.; SANTOS, I.C.M. 1998 b. Activation Patterns of the nucleolar Organizer Region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia** 63: 259-265.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazil J Genet** 14: 331-357.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. 1980. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 33: 83-91.

- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 26: 564-568.
- MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. 1985. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces - Cypriniformes). **Caryologia** 38: 47-55.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. 1993. Distribution of sex chromosomes mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia** 46: 115-125.
- MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia** 66: 59-64.
- MULLER, H.J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. **Mutat Res** 43: 165-229.
- NANDA, I.; VOLFF, J.N.; WEIS, S.; KÖRTING, C.; FROSCHAUER, A.; SCHMID, M.; SCHARTL, M. 2000. Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. **Chromosoma** 109: 173-180.
- NELSON, J.S. 1984. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons Inc., New York.
- NÉO, D.M., BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. 2000. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity** 85: 136-141.

- NIJSSEN, H.; ISBRUCKER, I.J.H. 1986. Review of the genus *Corydoras* from Peru and Equador (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 21: 1-68.
- OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. 1993a. Cytogenetic and DNA content studies of armoured catfishes of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. **Rev Bras Gen** 16: 617-629
- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J.M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Res** 6: 205-211.
- OLIVEIRA, C., 1991, **Estudos citogenéticos e de conteúdo de DNA na família Callichthyidae (Pisces, Siluriformes)**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; TOLEDO FILHO, S.A., 1990. Cytogenetics analysis of three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Cytologia** 55: 21-26.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO FILHO, S.A., 1988. Chromosome formulae of neotropical fresh water fishes. **Brazil J Genetics** 11: 577-624.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; MORI, L.; TOLEDO FILHO, S.A., 1993b. Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes,). **Caryologia** 46: 171-188.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; MORI, L.; TOLEDO-FILHO, S.A. 1992. Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **J Fish Biol** 40: 419-431.

- PAVANELLI, C.S.; BRITSKI, H.A. 2003. *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with Description of three New species. **Copeia** 2: 337-348.
- PAVANELLI, C.S. 1999. **Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos – Brazil.
- PAVANELLI, C.S. 2006. New Species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, Upper Rio Paraná Basin, Brazil. **Copeia** 1: 89–95.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2006. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 – karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research** 112: 313-319.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, G. 1993a. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet Cell Genet** 63: 128-130.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, G. 1993b. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. **Chromosome Res** 1: 63-67.
- PETRI, S.; FÚLVARO, V. J. 1983. **Geologia do Brasil**. São Paulo, Edusp, 631p.
- PHILLIPS, R.B.; REED, K.M. 2000. Localization of repetitive DNAs to zebrafish (*Danio rerio*) chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome Res** 8: 27-35.

- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 2934-2938.
- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E., 1992. Comparative cytogenetic study of the armoured catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae). **Brazil J Genetics** 15: 359-367.
- RAMSAY, L.; MACAULAY, M.; CARDLE, L.; MORGANTE, M.; IVANISSEVICH, S.; DEGLI, E.; MAESTRI, E.; POWELL, E.; WAUGH, R. 1999. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. **Plant J** 17: 415–425.
- RAPOSO, M.I.B. 1995. Episódios intrusivos no Arco de Ponta Grossa, determinados através de um estudo paleomagnético. **Revista Brasileira de Geociências** 25(1): 3–19.
- REIS, R.E., 1998. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zool J Linn Soc** 124: 105-168.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre**, Edipucrs, 729p.
- RIBEIRO, A.C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotrop Ichthyol** 4(2): 225-246.
- ROBERTS, T.R. 1974. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). **Bull Mus Comp Zool** 146: 411-472.
- ROSA, R.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. 2006. Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp.

- (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica** 128: 159-166.
- SAITOH, Y.; LAEMMLI, U.K. 1994. Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. **Cell** 76: 609-622.
- SALAS, E.; BOZA, J. 1991. Citotaxonomia comparativa de três espécies de *Cichlasoma* (Pisces, Cichlidae) nativas de Costa Rica. **Rev Biol Trop** 3(2): 219-224.
- SCHAEFER, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae) Pp. 375 – 400. *In*: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. 1988. Evolutionary diversity of reverse fluorescence chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma** 97: 101-114.
- SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103.
- SCHMID, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-344.
- SCHWEIZER, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet Cell Genet** 27: 190-193.
- SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L. 1996. Diversidade de peixes da bacia do rio Tibagi. In **Aspectos da fauna e flora da bacia do rio Tibagi** (Relatório). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

- SHIBATTA, O.A. 1993. **Estudo comparativo ao nível intra-específico de *Salminus hilarii*, *Pimelodus cf. maculatus*, *Leporinus cf. elongatus*, *Eigenmannia cf. virescens* (Pisces, Ostariophysi) das bacias do Alto Paraná e São Francisco, através da análise morfométrica multivariada.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.
- SHIELS, C., COUTELLE, C.; HUXLEY, C. 1997. Contiguous arrays of satellites 1, 3, and β form a 1.5 Mb domain on chromosome 22p. **Genomics** 44: 35-44.
- SHIMABUKURO, DIAS., C.K. 2003. **Análise da evolução de espécies da família Callichthyidae (Teleostei, Siluriformes) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, SP.
- SILVA, A.R.; MAISTRO, E.L. 2006. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado River, Minas Gerais, Brazil. **Genet Mol Biology** 29(3): 459-463.
- SOUZA, C.R.G.; SOUZA, A.P. 2002. O escarpamento estrutural de furnas, SP/PR: raro sítio geomorfológico brasileiro. Pp. 299– 306. *In*: SCHOBENHAUS, C.; CAMPOS, D.A; QUEIROZ, E.T.; WINGE, M & BERBERT-BORN, M.L.C. (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil.** Brasília. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), 540p.
- SOUZA, I.L.; GALIÁN, J.; DE LA RÚA, P.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2001. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia** 66: 85-91.
- SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex. II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia** 60: 273-281.

- SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P.M. 1996. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazil J Genet** 3: 405-410.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res** 75: 304-306.
- SUMNER, A.T. 1990. **Chromosome banding**. Unwin Hyman Inc., London, 434 pp.
- TAKAHASHI, E.K. 1995. **Análise citogenética de *Astyanax bimaculatus* coletados no ribeirão Três Bocas**. Monografia de Bacharelado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- TAPHORN, D.C.; MONTAÑA; C.G.; BUCKUP, P.A. 2006. *Characidium longum* (Characiformes: Crenuchidae), a new fish from Venezuela. **Zootaxa** 1247: 1–12.
- TURNER, B.J.; DIFFOOT, N.; RASCH, E.M., 1992. The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. **Ichthyol Explor Freshwaters** 3: 17-23.
- TYLER-SMITH, C.; WILLARD, H.F.1993. Mammalian chromosome structure. **Curr Opin Genet Dev** 3: 390–397.
- VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. 1998. Neotropical Ichthyology: An Overview. Pp. 1–11. *In*: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, **603p**.
- VARI, R.P. 1991. Systematics of the neotropical characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Osteriophysii). **Smithsonian Contr Zool** 507: 1-118.
- VERMA, R.S. 1988. **Heterochromatin: Molecular and structural aspects**. Cambridge University Press, New York, 320.

- VICARI, M.R.; ARTON, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2006. Basic and Molecular Cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia** 59 (3): 260-266.
- VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenet Genome Res** 101: 24-28.
- VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genet Mol Biology** 28: 103-110.
- VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2006. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet Genome Res** 114: 163–168.
- VICENTE, V.E.; BERTOLLO, L.A.C.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. 2003. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica** 119: 115-120.
- VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. 2001. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 54: 365-369.
- WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A.; WEITZMAN, M.J.. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes: Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil, pp. 379-427, *in*: P.E. Vanzolini & W.R. Heyer (eds.) **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 488 p.

- WILDER, J.; HOLLOCHER, H. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Mol Biol Evol** 18: 384–392.
- WINEMILLER, K.O. 1989. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia** 81: 225-241.
- ZELENTSOVA, E.S.; VASHAKIDZE, R.P.; KRAEV, A.S.; EVGEN'EV, M.B. 1986. Dispersed repeats in *Drosophila virilis*: elements mobilized by interspecific hybridization. **Chromosoma** 93: 469–476.
- ZIESLER, R.; ARDIZZONE, G.D. 1979. The inland waters of Latin America. **Copescal Technical Paper Nº 1**. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Roma, 171p.
- ZIMMER, C.H.; REINERT, K.E.; LUCK, G.; WÄHNERT, U.; LÖBER, G.; THRUM, H. 1971. Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamicin A with nuclei acids. **J Mol Biol** 58:329-348.