

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

**CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE ICTIOFÁUNULAS ISOLADAS POR UM  
DIVISOR DE ÁGUAS EM REGIÕES LIMÍTROFES DE DUAS BACIAS  
HIDROGRÁFICAS NA SERRA DA MANTIQUEIRA.**

LIANO CENTOFANTE

São Carlos/SP  
2003

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

**CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE ICTIOFÁUNULAS ISOLADAS POR UM  
DIVISOR DE ÁGUAS EM REGIÕES LIMÍTROFES DE DUAS BACIAS  
HIDROGRÁFICAS NA SERRA DA MANTIQUEIRA.**

LIANO CENTOFANTE

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  
2003

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

C397cc

Centofante, Liano.

Citogenética comparativa entre ictiofáunulas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na Serra da Mantiqueira / Liano Centofante . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

163 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética animal. 2. Ictiofauna de riachos. 3. Citogenética. I. Título.

CDD: 591.15 (20<sup>a</sup>)

---

Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho  
(Orientador)

*Sempre é possível ir longe demais.*

Dedico este trabalho aos meus pais Sylvio e Aládia,  
aos meus irmãos Lonia, Elias e Wilson, e a você Silvana,  
pelo apoio, dedicação, companheirismo e muito amor.

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos são para o Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução, ao CNPq por mais uma vez (a terceira) ter concedido uma bolsa de auxílio, “Viva o CNPq” e a FAPESP pelo auxílio logístico.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, pela excelente orientação e oportunidade a mim concedida. Ao amigo Orlando, pelos momentos de descontração e confidências.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Carlos Bertollo, pela oportunidade de convívio e tê-lo como colaborador na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Galetti Jr., pelos poucos momentos, mas fundamentais durante este período.

Não posso nunca deixar de lembrar e nem de expressar os meus eternos agradecimentos para as pessoas responsáveis pela minha formação acadêmica e profissional. O meu muito obrigado a vocês, Dr. Paulo Cesar Vênere, Dra. Eliana Feldberg e Dr. Orlando Moreira-Filho.

À pesquisadora Dra. Silvana Angélica Gama Gomes pelas sugestões. À mulher Silvana Angélica Gama Gomes, pelo apoio, carinho, confiança, cumplicidade e companheirismo dedicados a mim.

Às meninas da Pós-Graduação, Rose, Regeane e Tatiane, por sempre estarem disponíveis para qualquer eventualidade.

À secretaria do Departamento de Genética e Evolução representada pela Leila, a quem recorri várias vezes.

Ao Luis Henrique da Silva pelo auxílio nas coletas e pela amizade.

Ao Jorjão pelos momentos de descontração todas as manhãs durante o cafezinho e pela sua amizade.

Aos amigos do laboratório Elisangela Dantas, Marcelo, Celeste, Carol, Elisangela B, Luciano, Paulo, Monique, Célia, Terumi, Patrícia, Débora, Alexandra, Daniele, Ana Karina, Alexandre, Welligton, Marc, Vitor, Marilza, Fabio, Mercival, Eloise, Pricila, Débora Marques, Cesar, Adriane, Vera, Dagmar, Cristina.

À minha “família” de São Carlos, Elisangela e Marcelo, Rogério e Daniele, Cristiano e Yara, família esta que proporcionou bons momentos extra-laboratório.

E por fim, a todos que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	001
2. OBJETIVOS.....	006
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	008
3.1. Espécies Estudadas.....	008
3.2. Obtenção de Cromossomos Mitóticos.....	008
3.3. Detecção da Heterocromatina Constitutiva.....	009
3.4. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos.....	010
3.5. Coloração com o Fluorocromo CMA <sub>3</sub> .....	011
3.6. Localização Cromossômica do rDNA 18S e 5S.....	012
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	013
CAPÍTULO I – Citogenética comparativa entre espécies simpátricas de <i>Characidium</i> (Pisces, Characiformes), análise da diversidade com descrição de um sistema de cromossomos sexuais ZW e triploidia natural.....	014
CAPÍTULO II – Divergência cromossômica e manutenção de espécies simpátricas de <i>Characidium</i> (Crenuchidae, Characidiinae).....	036
CAPÍTULO III – Sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em uma nova espécie do gênero <i>Parodon</i> (Pisces, Parodontidae).....	054
CAPÍTULO IV – Correlação de caracteres cromossômicos e morfológicos em duas espécies de <i>Astyanax</i> (Pisces, Characidae).....	084
CAPÍTULO V – Diferenciação cromossômica em populações alopátricas de <i>Hyphessobrycon anisitsi</i> (Pisces, Tetragonopterinae).....	104
CAPÍTULO VI – Cromossomos B e triploidia natural em <i>Rhamdia</i> sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae).....	119
5. DISCUSSÃO GERAL.....	144
6. CONCLUSÕES.....	148
7. REFERÊNCIAS.....	149

## RESUMO

A Serra da Mantiqueira está localizada na região sudeste do Brasil e é um marco na divisa política entre os estados de São Paulo e Minas Gerais, servindo como um efetivo divisor de águas entre as bacias formadas pelos rios Paraíba do Sul e Paraná. Assim, a Serra da Mantiqueira pode atuar como uma expressiva barreira de isolamento biogeográfico para as ictiofaunas dessas bacias hidrográficas. O presente trabalho foi desenvolvido com dez espécies de peixes (*Characidium gomesi*, *C. cf. zebra*, *C. lauroi*, *C. cf. alipioi*, *Parodon sp.*, *P. tortuosus*, *Astyanax fasciatus*, *A. parahybae*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Rhamdia sp.*), pertencentes a quatro distintas famílias, representantes das ictiofaunas dessa região limítrofe entre alguns tributários do rio Paraíba do Sul e de alguns riachos da drenagem do rio Sapucaí, bacia do Paraná. Os estudos citogenéticos objetivaram a caracterização cromossômica e análise comparativa entre as espécies dessas ictiofaunas. Como resultados principais obtidos no presente trabalho, destacam-se: descrições cariotípicas das dez espécies acima relacionadas, descoberta de uma nova espécie do gênero *Parodon*, descrições de três novos casos de sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, descoberta de dois novos casos de triploidias naturais, sendo um deles associado ao cromossomo B. Os estudos realizados ainda permitiram a formulação de hipóteses sobre as possíveis causas da origem da diversidade cromossômica encontrada nas espécies dessa região, a verificação do papel da Serra da Mantiqueira no isolamento e na distribuição biogeográfica das ictiofaunas envolvidas, bem como as correlações entre as espécies das duas bacias hidrográficas.

## ABSTRACT

The Serra da Mantiqueira is located in the southeastern region of Brazil, and is a landmark for the political division between the São Paulo and Minas Gerais States, serving as an effective water divisor for the Paraíba do Sul and Paraná Rivers. This way, the Serra da Mantiqueira may act as an expressive biogeographic barrier for the isolation of the ichthyofaunas of these hydrographic basins. The present work was carried out with ten fish species (*Characidium gomesi*, *C. cf. zebra*, *C. lauroi*, *C. cf. alipioi*, *Parodon* sp., *P. tortuosus*, *Astyanax fasciatus*, *A. parahybae*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Rhamdia* sp.), belonging to four distinct families, representing the ichthyofaunas of this limiting region between some tributaries of the Paraíba do Sul River and some drainage rivers of the Sapucaí River, Paraná basin. The cytogenetic studies aimed the chromosomal characterization and the comparative analysis between the species of these ichthyofaunas. Among the main results obtained in the present work, we highlight: the karyotypical descriptions of the ten species previously mentioned; the discovery of a new species for the genus *Parodon*; the description of three new ZZ/ZW sex chromosome systems; and the discovery of two new cases of natural triploidies, one of them being associated to the B chromosome. The studies also permitted the formulation of hypotheses on the possible causes of the origin of the chromosome diversity found in the species of this region, the verification of the role the Serra da Mantiqueira has in the isolation and biogeographic distribution of the ichthyofaunas involved, and also the correlations between the species of the two hydrographic basins.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Quando comparado com outros grupos de vertebrados, muito pouco ainda se conhece sobre a sistemática, evolução, ecologia, fisiologia e genética de peixes. Possivelmente, uma das principais razões para essa carência seja o elevado número de espécies, cerca de 24.600 (Nelson, 1994), o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies de todos os demais vertebrados. O habitat dos peixes também proporciona uma dificuldade a mais para o seu estudo (captura, observação e determinação dos parâmetros biológicos) quando comparado com a maioria dos outros vertebrados (Bohlke et al., 1978).

Segundo Lowe-McConnell (1987), a diversidade de comunidades, tanto de plantas quanto de animais, é muito maior em latitudes baixas, quando comparadas com comunidades de altas latitudes, o que se reflete também entre as espécies de peixes. Este princípio parece válido tanto para peixes tropicais de água doce quanto de água marinha e essa diversidade pode ser encontrada tanto em um pequeno taxon como dentro das comunidades.

A América do Sul isolou-se de outras áreas continentais há cerca de 70 milhões de anos. A grande diversidade de ambientes ecológicos existentes permitiu uma grande irradiação evolutiva, possuindo hoje esta região uma fauna de peixes muito rica, contendo cerca de 60 famílias e aproximadamente 2500 espécies conhecidas. Schaefer (1998) analisando tendências históricas estima que considerável proporção desta fauna é desconhecida, estimando que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais. Essa fauna extremamente complexa é, do ponto de vista evolutivo, um grande produto do mundo biológico (Bohlke et al., 1978). Observa-se frequentemente entre as espécies de peixes uma subdivisão em populações locais isoladas. Este fenômeno é mais acentuado em peixes de água doce que habitam rios ou lagos com barreiras físicas, enquanto que

populações de peixes marinhos são menos delimitadas (Carvalho, 1993). Portanto, fatores históricos, tais como as colonizações e o surgimento de barreiras físicas ou geográficas, podem influenciar a distribuição dos peixes (Carvalho et al., 1991), bem como fatores incluindo movimento das águas, salinidade, pH, temperatura, disponibilidade do alimento, predadores e doenças.

Nas duas últimas décadas a citogenética vem contribuindo bastante para o conhecimento dos nossos peixes, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies/populações. Dados recentes estimam ao redor de 2.600 espécies com cariótipos conhecidos, entre cerca de 20.000 espécies taxonomicamente reconhecidas (Ozouf-Costaz & Foresti, 1992). Klinkhardt et al., (1995) também destacam que apenas cerca de 12% das mais de 22.000 espécies de peixes taxonomicamente descritas, tem algum dado cromossômico conhecido.

Nos últimos anos, o número de publicações sobre citogenética evolutiva de peixes tem aumentado consideravelmente, principalmente no que se refere às espécies que habitam a calha de rios e ambientes lênticos. Trabalhos relativos a ambientes de cabeceiras são, no entanto, raros. Alguns exemplos conhecidos restringem-se a levantamentos faunísticos, abordagens taxonômicas ou distribuição longitudinal de espécies (Caramaschi, 1986; Garutti, 1988; Langeani-Neto, 1989). Estudos realizados por Moreira-Filho & Bertollo (1991) com o lambari *Astyanax scabripinnis* nas cabeceiras dos afluentes das bacias do Alto Paraná e do Rio São Francisco, mostraram a importância das cabeceiras atuando como isolados geográficos, onde teriam contribuído significativamente na diversificação deste grupo

de lambari, uma vez que, foram considerados um complexo de espécies. Dessa forma, existe ainda hoje uma lacuna relacionada a estudos nesses ambientes e, em particular, integrando diferentes áreas para um melhor conhecimento do processo evolutivo e da diferenciação das espécies de peixes que ocorrem em regiões de cabeceiras.

A importância de se estudar os ambientes de cabeceira dos rios é ressaltada por Lowe-McConnell (1969), quando afirma que sistemas de rios tropicais de grande porte permitem que algumas espécies de peixes se isolem geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras físicas, químicas ou bióticas. Por sua vez, movimentos tectônicos alteram os leitos e os percursos dos rios, causando um rejuvenescimento e fazendo com que trechos de corredeiras não fiquem limitados às cabeceiras, alternando-se com trechos do tipo remanso. Tais alterações nas condições ecológicas permitem um isolamento microgeográfico, com várias espécies de alguns grupos de peixes ficando limitadas a diferentes trechos de um mesmo rio.

Os estudos ecológicos e levantamento faunístico em riachos têm aumentado significativamente devido à grande importância deste ecossistema na manutenção da biodiversidade. Existem diversas espécies que ficam restritas a estes ambientes, portanto não sendo encontradas nos grandes rios.

Os riachos apresentam condições peculiares, bem como a sua fauna ictiológica. Situações climáticas interferem muito mais rapidamente nestes ambientes, quando comparados com os grandes rios. Assim, por exemplo, as tempestades de verão alteram rapidamente as condições abióticas (temperatura da água, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e turbidez). As enxurradas formadas pelo grande volume de água que chega rapidamente nos riachos formam

correntezas que podem afetar a comunidade deste ambiente, carreando as larvas, alevinos e até mesmo deslocando as populações de peixes de seu micro habitat. Dependendo da intensidade, as chuvas podem alterar o leito dos riachos, carreando material alóctone para esse local ou, inversamente, retirando material do leito e depositando-os em suas margens. Assim sua ictiofauna está sujeita a este conjunto de modificações ambientais, relativamente comuns na região tropical.

O interesse dos estudos biológicos em riachos tem ganhado destaque nos últimos anos, devido à grande importância sócio-econômica destes ecossistemas, destacando-se seu papel na agricultura, principalmente para o cultivo de hortaliças como fonte de irrigação, assim como na agropecuária e na captação de água para as cidades. No entanto, esses mananciais estão sendo agredidos a uma velocidade muito maior do que os estudos ali realizados. Atualmente, muitos córregos têm sido usados para escoamento de esgoto doméstico e industrial, chegando ao ponto de servirem até como depósito de lixo sólido. O desmatamento ciliar representa, por sua vez, uma outra fonte importante de alteração ambiental com sérios reflexos sobre a comunidade dos córregos ou riachos. Assim sendo, é imprescindível que estudos multidisciplinares sejam levados a cabo, para podermos entender melhor a dinâmica desses ecossistemas. Paralelamente, existe a carência de um programa educacional que desperte a população para a importância e a necessidade da conservação desses ambientes.

A região de Campos do Jordão é marcada por um divisor de águas, Serra da Mantiqueira, que apresenta altitudes que variam de 600 a 2040 metros. A Serra da Mantiqueira, em Campos do Jordão, representa uma região limítrofe entre as cabeceiras do rio Sapucaí das cabeceiras de alguns afluentes do rio Paraíba do Sul. O rio Sapucaí percorre uma distância de 66 Km em direção ao sudoeste de Minas

Gerais até desaguar no rio Grande, fazendo parte do sistema hidrográfico do rio Paraná ([www.ana.gov.br](http://www.ana.gov.br)). O rio Paraíba do Sul é formado pela união dos rios Paraitinga e Paraibuna, que nascem na Serra do Mar e correm para o sudoeste do Estado de São Paulo por 130 Km, quando se juntam para formar o Paraíba, onde o mesmo sofre uma inflexão de 180° em direção ao nordeste, percorrendo um total de 800 Km, desaguardo no Oceano Atlântico no Estado do Rio de Janeiro (Lima, 1997).

Devido à altitude da Serra da Mantiqueira a temperatura dos sistemas hídricos é relativamente baixa, além de desníveis freqüentes nos riachos que formam inúmeras cachoeiras que impedem o fluxo permanente entre as populações de peixes. Assim, diferentes populações confinadas a ambientes particulares podem ser encontradas nessa região, proporcionando um excelente material para estudos de natureza genético-evolutiva.

No presente trabalho foi realizado um estudo citogenético em espécies de peixes que habitam as cabeceiras dos riachos Paiol Grande e Ribeirão das Perdizes que são afluentes do rio Sapucaí (bacia do Alto Paraná) e das cabeceiras dos riachos Ribeirão Grande e Piracuama que são afluentes do rio Paraíba do Sul, na Serra da Mantiqueira, região de Campos do Jordão, SP, Brasil.

## 2. OBJETIVOS

A região de Campos do Jordão apresenta características peculiares, as quais a tornam extremamente propícia para a investigação de processos implicados na diversificação cariotípica e na evolução de grupos de peixes ali existentes. Assim, hipóteses e questões foram aventadas como objetivos a serem testados:

1º Com o soerguimento da Serra da Mantiqueira, em época bem remota, as populações das diversas espécies de peixes que habitavam esta região poderiam ter sido redistribuídas ou fragmentadas em populações menores, entre as atuais bacias dos rios Paraíba do Sul e Sapucaí. Assim, este isolamento geográfico teria originado uma situação de alopatria para a fauna ictiológica destas bacias. Ocorreriam ainda formas idênticas entre estas duas bacias hoje isoladas? Se assim for, apresentariam elas algum nível de diversificação em relação a algum aspecto detectável em nível cromossômico ou morfológico?

2º Após a formação da Serra da Mantiqueira ocorreram movimentos tectônicos em diferentes épocas, criando novas situações para a fauna ictiológica da região. Capturas de cabeceiras de pequenos riachos das duas bacias distintas podem ter possibilitado o contato de espécies ou populações que estavam em alopatria durante longo período (alopatria transitória). Assim sendo, poderiam ocorrer formas aparentadas, mas com caracteres exclusivos, em condição de simpatria?

Utilizando-se de estratégias que possibilitassem obter respostas ou esclarecimentos para as questões acima consideradas, foi proposto:

a) um levantamento das ictiofáunulas dos riachos pertencentes às cabeceiras das bacias do rio Sapucaí (Sistema Alto Paraná) e de afluentes do rio Paraíba do Sul (Sistema das Bacias do Leste), na região de Campos do Jordão-SP.

b) a análise cariotípica comparativa entre espécies/populações das 2 bacias hidrográficas em questão, assim como entre as espécies de bacias adjacentes, cujos dados já são conhecidos na literatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas nos riachos Paiol Grande (22°40'34"S e 45°41'00"W) e Ribeirão das Perdizes (22°44'43"S e 45°34'07"W) (pertencentes à bacia do Alto Paraná) e nos riachos Ribeirão Grande (22°46'2.98"S e 45°26'7.05"W) e Rio Piracuama (22°43'18"S e 45°40'16"W) (pertencentes à bacia do Rio Paraíba do Sul). Os peixes foram capturados com o auxílio de tarrafa, rede de arrasto e peneira.

#### 3.1. Espécies Coletadas

Bacia do alto rio Paraná	Bacia do rio Paraíba do Sul
<b>CHARACIFORMES</b>	<b>CHARACIFORMES</b>
<i>Parodon tortuosus</i>	<i>Characidium lauroi</i>
<i>Parodon</i> sp.	<i>Characidium</i> cf. <i>alipioi</i>
<i>Characidium gomesi</i>	<i>Astyanax paraybae</i>
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	<i>Astyanax scabripinnis</i>
<i>Astyanax fasciatus</i>	<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>
<i>Astyanax scabripinnis</i>	<i>Oligosarcus</i> sp.
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	<b>SILURIFORMES</b>
<b>SILURIFORMES</b>	<i>Cetopsorhandia</i> sp.
<i>Trichomycterus brasiliensis</i>	<i>Rhamdia</i> sp..
<i>Cetopsorhandia</i> sp.	<i>Imparfinis</i> sp.
	<i>Pareiorhina</i> sp.
	<i>Harttia</i> sp.
	<i>Neoplecostomus</i> sp.
	<b>GYMNOTIFORMES</b>
	<i>Gymnotus panterinus</i>

### **3.2. Obtenção de Cromossomos Mitóticos**

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica de “air-drying” descrita por Bertollo et al., (1978), como segue:

1. Injetar solução de colchicina a 0,025%, intraperitonealmente, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal.
2. Deixar o peixe em um aquário bem aerado por aproximadamente 50 minutos, sacrificá-lo e retirar as porções anterior e posterior do rim.
3. Transferir o órgão retirado para uma pequena cuba de vidro, contendo 15 ml de solução hipotônica de KCl a 0,075M.
4. Fragmentar bem o material com auxílio de pinças de dissecação.
5. Obter uma suspensão celular homogênea através de leves movimentos de aspiração e expiração do material com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha.
6. Deixar a suspensão obtida em estufa a 37°C durante 30 minutos.
7. Transferir a suspensão celular para um tubo de centrífuga, acrescentar algumas gotas de fixador recém preparado (álcool metílico: ácido acético - 3:1), ressuspender o material com pipeta Pasteur e centrifugá-lo por 10 minutos a 900 rpm.
8. Descartar o sobrenadante, adicionar 12 ml de fixador recém preparado, ressuspender o material e centrifugá-lo por 10 minutos a 900 rpm.
9. Repetir o item 8 por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 ml de fixador e ressuspender bem o material. Este poderá ser então armazenado a 4°C, acondicionado em pequenos frascos tipo "Ependorff", ou trabalhado conforme os seguintes passos:
10. Pingar duas gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, coberta com uma película de água a 50-60°C.

11. Deixar secar ao ar e corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH=6,8) por 7 minutos.

12. Lavar com água destilada, deixar secar ao ar e analisar ao microscópio óptico.

### **3.3. Detecção da Heterocromatina Constitutiva**

Para a detecção da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de bandamento C, descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

1. Tratar a lâmina, contendo os cromossomos mitóticos, com uma solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 15 minutos, lavar em água deionizada e secar ao ar.

2. Deixar a lâmina em uma solução salina 2xSSC à temperatura ambiente por 15 minutos, lavar em água deionizada e secar ao ar.

3. Submergir a lâmina numa cuba contendo solução de hidróxido de bário 5% a 42°C durante 1 minuto e 20 segundos (tempo experimental), lavar em solução de HCl 0,2N, água deionizada e secar ao ar.

4. Incubar a lâmina numa solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos, lavar em água deionizada e secar ao ar.

5. Corar com Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos, lavar em água deionizada, secar ao ar e analisar ao microscópio óptico.

### **3.4. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)**

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos, foi utilizada a técnica descrita por Howell & Black (1980).

1. Pingar uma gota de água destilada, duas gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 ml para cada 100 ml de solução)

e quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% sobre uma lâmina preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos.

2. Cobrir com lamínula e incubar em estufa a 60°C por um período de aproximadamente 5 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da lâmina e dos cromossomos ao microscópio.

3. Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumem uma tonalidade amarelada e as NORs e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada naturalmente pelo próprio fluxo d'água.

4. Secar a lâmina ao ar e analisar ao microscópio óptico.

### **3.5. Coloração com o Fluorocromo Cromomicina (CMA<sub>3</sub>)**

O fluorocromo GC-específico cromomicina (CMA<sub>3</sub>), combinados com o contracorante distamicina A, foram empregados de acordo com Schmid (1980) e Schweizer (1980), respectivamente, com algumas modificações.

1. Colocar cerca de 150 ul da solução de distamicina A (0.3mg/ml) sobre uma lâmina contendo cromossomos mitóticos cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos.

2. Escorrer a lamínula e lavar com jato de água corrente, por aproximadamente 1 minuto.

3. Colocar o material em tampão McIlvaine e deixar por 5 minutos; secar ao ar.

4. Adicionar cerca de 150 ul da solução de mitramicina (0.1 mg/ml), ou cromomicina (0,5 mg/ml), cobrir novamente o material com lamínula e deixar em local protegido da luz, por 60 minutos.

5. Escorrer a lamínula e lavar com jato de água corrente, por aproximadamente 1 minuto; mergulhar a lâmina em tampão McIlvaine e deixar por 5 minutos.
6. Deixar secar ao ar e montar a lâmina com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.
7. Armazenar a lâmina a temperatura ambiente, no escuro, durante um tempo mínimo de 15 dias para aumentar a estabilidade do fluorocromo.
8. Analisar o material em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

### **3.6. Localização Cromossômica do rDNA 18S e 5S**

Foi realizada a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel et al., 1986 com alguns ajustes às condições do Laboratório de Citogenética da UFSCar. O procedimento para FISH foi conduzido utilizando-se como sondas a região codificante do rDNA 18S de peixe, obtida por PCR com o uso dos primers NS1 e NS8 (White et al., 1990) e sondas rDNA 5S obtida de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999). A sonda foi marcada com biotina através de "Nick Translation", seguindo-se as recomendações do fabricante (Nick Translation Kit-Boehringer Mannheim). As lâminas com cromossomos mitóticos foram tratadas com RNase (10 mg/ml 2xSSC) por 1 hora em câmara úmida e posteriormente, com pepsina (0,005 % em HCl 10mM) por 10 minutos a 37°C. O material foi desnaturado em formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos. A mistura de hibridação consistiu de 1µg de DNA (sonda), formamida 50%, sulfato dextrano (10 mg/ml) e 2xSSC. Essa mistura foi levada ao banho fervente por 10 minutos para desnaturação da sonda. A hibridação foi realizada a 37°C em câmara úmida "overnight". A sonda foi revelada através da utilização da avidina conjugada ao FICT

(fluorescein isothiocyanate-Sigma). Após esta etapa, realizou-se uma rodada para amplificação do sinal com anti-avidina-biotina conjugada e avidina-FICT conjugada. Os cromossomos foram corados com iodeto de propídio (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e as lâminas montadas com "antifade" Vectashield (Vector) e posteriormente o material foi analisado em fotomicroscópio de epifluorescência.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de 6 capítulos, referentes a trabalhos científicos.

## CAPÍTULO I

# **CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *Characidium* (PISCES, CHARACIFORMES), ANÁLISE DA DIVERSIDADE COM DESCRIÇÃO DE UM SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS ZW E TRIPLOIDIA NATURAL.**

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 a ZW Sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*, 54(3): 253-260.

## RESUMO

Uma análise citogenética comparativa foi realizada em duas espécies simpátricas do gênero *Characidium*, *C. gomesi* e *C. cf. zebra*, provenientes da bacia do Paraná, Estado de São Paulo, Brasil. Embora ambas as espécies apresentem o mesmo número diplóide ( $2n=50$ ) e uma macroestrutura cariotípica similar, foi detectado nos cariótipos uma diversidade inter-específica com relação à distribuição do bandamento C e das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW foi detectado em *C. gomesi*, onde o cromossomo W encontra-se totalmente heterocromático e de menor tamanho que o cromossomo Z. Esta espécie também apresenta um espécime fêmea triploide portando um cromossomo W e dois cromossomos Z. Em *C. cf. zebra* não foi observado heteromorfismo cromossômico sexual. Estes dados são discutidos levando-se em consideração a caracterização da ictiofauna regional e seus aspectos evolutivos.

## ABSTRACT

A comparative cytogenetic analysis was carried out in two sympatric fish species of the genus *Characidium*, *C. gomesi* and *C. cf. zebra*, from the Paraná basin, São Paulo State, Brazil. Although both species showed the same diploid number ( $2n = 50$ ) and a similar karyotypic macrostructure, an interspecific diversity was detected concerning the distribution of the C-bands and the nucleolar organizing regions in the karyotypes, as well as the sex chromosomes. A ZZ/ZW sex chromosome system was detected in *C. gomesi*, where the W chromosome appears fully heterochromatic and with a small size than Z chromosome. This species also presented a triploid female specimen bearing one W and two Z chromosomes. In *C. cf. zebra* heteromorphic sex chromosomes were not found. These data are discussed concerning the characterization of the regional ictiofauna and its evolutionary aspects.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Characidium* é formado por peixes de pequeno porte, apresentando corpo alongado com boca pequena e nadadeira anal curta, distribuídos desde o Panamá até a Argentina (Buckup, 1991).

Das 58 espécies que compõe a subfamília Characidiinae, apenas algumas pertencentes aos gêneros *Characidium* e *Jobertina* possuem dados citogenéticos (Miyazawa, 1994; Maistro et al., 1998), evidenciando no gênero *Characidium* um padrão cariotípico relativamente estável, no que se refere ao número diplóide  $2n = 50$  cromossomos de dois braços, geralmente meta-submetacêntricos. Sistemas de cromossomos sexuais, assim como a presença de cromossomos B já foram também constatados para exemplares da bacia do rio Paraná (Tabela 1).

Relatos de triploidia em peixes neotropicais vem se tornando frequentes, com o aumento das espécies e populações analisadas. Hoje cerca de 14 espécies-populações, pertencentes a diferentes ordens e famílias registram essa ocorrência, com uma maior frequência no gênero *Astyanax* (Tabela 2).

Em um levantamento ictiofaunístico e citogenético em espécies de cabeceiras de riachos na região da serra da Mantiqueira (Estado de São Paulo, Brasil), constatamos a presença simpátrica de duas espécies de *Characidium* (*C. gomesi* e *C. cf. zebra*), evidenciando um novo mecanismo cromossômico sexual do tipo ZW em *C. gomesi*, além da ocorrência adicional de triploidia em um exemplar fêmea, portador de dois cromossomos Z e um cromossomo W. Esses dados são discutidos no contexto da caracterização, evolução e biodiversidade da ictiofauna regional.

Tabela 1. Espécies de *Characidium* estudadas da bacia do rio Paraná (Brasil) e suas localidades. **SP**= Estado de São Paulo; **MG**= Estado de Minas Gerais; **TC**= tipos cromossômicos; **B**= cromossomos B; **CS**= cromossomos sexuais; **NOR**= regiões organizadoras de nucléolos; **T**= terminal; **I**= intersticial; **R**=referências bibliográficas.

<b>Espécies</b>	<b>TC</b>	<b>B</b>	<b>CS</b>	<b>NOR</b>	<b>Localidade</b>	<b>R</b>
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	-	-	Par 25 (T)	Reserva Jatai-SP	1
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	1	-	Par 25 (T)	Rio Passa-Cinco-SP	1-2
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	-	-	Par 25 (T)	Rio Piracicaba-SP	1
<i>C. lagosantensis</i>	32M+18SM	-	-		Rio Mogi-Guaçu-SP	1
<i>C. pterostictum</i>	32M+16SM+2ST	-	-		Reserva Jatai-SP	1
<i>C. cf fasciatum</i>	32M+18SM	0-4	ZZ/ZW	Par 17 (T)	Quinta e Rio Pardo-SP	3
<i>C. cf fasciatum</i>	32M+18SM	-	-	Par 23 (I)	Rio Machado-MG	4
<i>C. gomesi</i>	32M+18SM	-	-	Par 17 (T)	Rio Machado-MG	4
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	-	-	Par 23 (I)	São Bento Sapucaí-SP	5
<i>C. gomesi</i>	32M+18SM	-	ZZ/ZW	Par 18 (T)	São Bento Sapucaí-SP	5

Ref.: 1- Miyazawa & Galetti Jr. (1994); 2- Miyazawa (1991); 3- Maistro et al., (1998); 4- Braga et al., (2000); 5- Presente trabalho.

Tabela 2. Ocorrência de triploidia natural em peixes neotropicais. O número entre parênteses refere-se aos exemplares triplóides na amostra analisada. **CS**= cromossomos sexuais.

<b>Espécies</b>	<b>Amostra</b>	<b>2n</b>	<b>2n=3x</b>	<b>CS</b>	<b>Ref.</b>
<b>Characidae</b>					
<i>Astyanax schubarti</i>	21 (1)	36	54	-	1
<i>Astyanax scabripinnis</i>	54 (1)	50	75+2B	-	2,8
<i>Astyanax scabripinnis</i>	74 (1)	50	75+2B	-	3
<i>Astyanax scabripinnis</i>	27 (1)	50	75+1B	-	8
<i>Astyanax cf. fasciatus</i>	03 (1)	48	72	-	12
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	30 (2)	50	75	-	3
<b>Anostomidae</b>					
<i>Leporinus cf. elongatus</i>	28 (1)	54	81	ZZ/ZW	10
<b>Crenuchidae</b>					
<i>Characidium gomesi</i>	27 (1)	50	75	ZZ/ZW	13
<b>Curimatidae</b>					
<i>Curimata modesta</i>	10 (1)	54	81	-	4
<b>Erythrinidae</b>					
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	22 (1)	48	72	-	6
<b>Sternopygidae</b>					
<i>Eigemmanna sp.</i>	06 (1)	30	46	-	5
<b>Gymnotidae</b>					
<i>Gymnotus carapo</i>	07 (1)	54	81	-	7
<b>Trichomycteridae</b>					
<i>Trichomycterus davisii</i>	50 (1)	54	81	-	11
<b>Callichthyidae</b>					
<i>Callichthys callichthys</i>	- (1)	56	84	-	9

**Referência:**1. Morelli et al., (1983); 2. Dias et al., (1992); 3. Fauaz et al., (1994); 4. Venere & Galetti Jr. (1985); 5. Almeida-Toledo et al., (1985); 6. Giuliano-Caetano & Bertollo, (1990); 7. Fernandes et al., (1992); 8. Maistro et al., (1994); 9. Kavalco & Margarido (2000); 10. Molina et al., (1996); 11. Borin & Martins-Santos (1998); 12. Malacrida et al., (2000);13. Presente estudo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 525 metáfases (21 espécimes: 12 fêmeas e 9 machos) de *Characidium cf. zebra* e 635 metáfases (27 espécimes: 16 fêmeas e 11 machos) de *Characidium gomesi* provenientes do córrego Paiol Grande, localizado na região de São Bento do Sapucaí - SP. Os exemplares foram depositados e catalogados no Museu Nacional do Rio de Janeiro, com os números MNRJ 20999 e MNRJ 20998, respectivamente.

As preparações para obtenção de cromossomos mitóticos seguiram a técnica descrita por Bertollo et al., (1978). Para obtenção do padrão de heterocromatina constitutiva utilizou-se o método descrito por Sumner (1972), e para a localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) a técnica descrita por Howell e Black (1980). Preparações sequenciais de bandamento seguiram as recomendações descritas por Centofante (2000). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a razão de braços (Levan et al., 1964).

## RESULTADOS

O cariótipo de *Characidium gomesi* ( $2n=50$ ) encontra-se constituído por 31 cromossomos metacêntricos e 19 submetacêntricos nas fêmeas, enquanto que os machos mostram 32 cromossomos metacêntricos e 18 submetacêntricos (Fig. 1). O número de braços cromossômicos (número fundamental, NF) é igual a 100, para ambos os sexos. No cariótipo feminino (Fig. 1a) pode-se visualizar claramente um heteromorfismo cromossômicos correspondente ao par nº 2, evidenciando diferenças quanto à morfologia e ao tamanho dos cromossomos, ou seja, um metacêntrico grande e um submetacêntrico pequeno. No macho, este par está representado por 2 metacêntricos de mesmo tamanho. O heteromorfismo, exclusivo

nas fêmeas, caracteriza um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW onde o cromossomo Z está representado pelo metacêntrico grande e o cromossomo W pelo submetacêntrico pequeno.

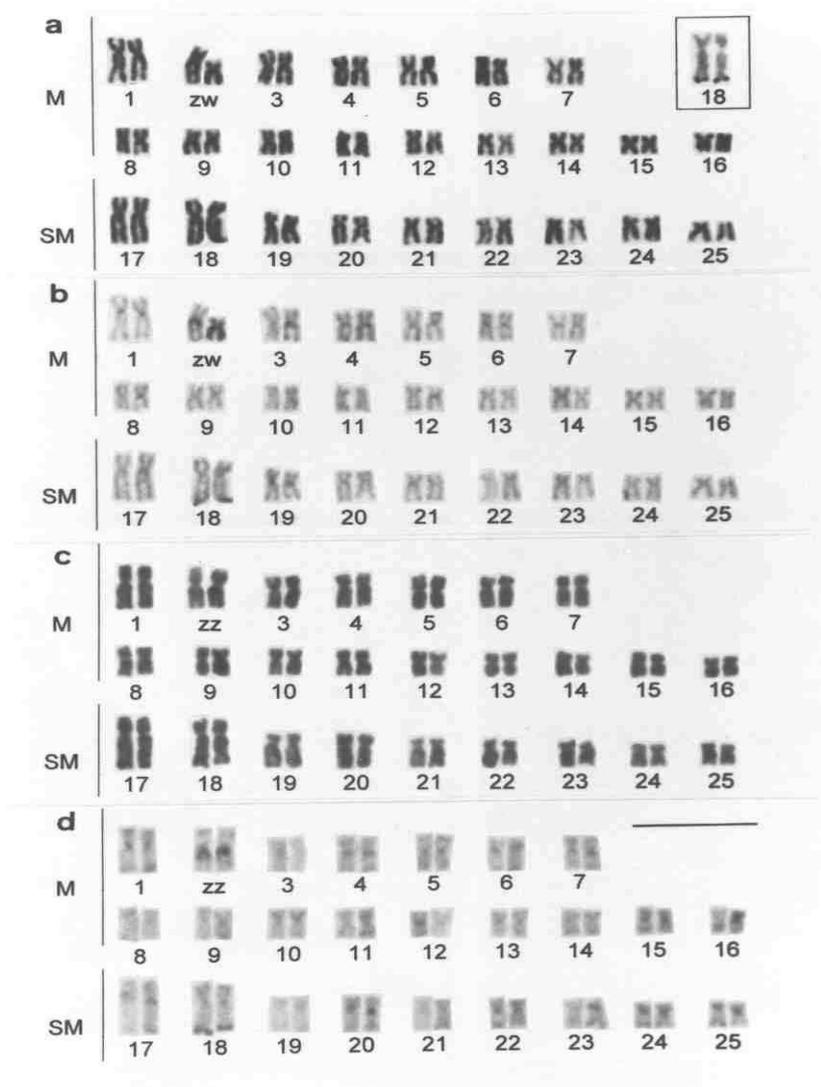
Análises sequenciais (coloração Giemsa convencional seguida pelo bandamento C) possibilitou identificar, com precisão, os cromossomos envolvidos neste sistema (Fig. 1b,d). Enquanto que, o cromossomo Z apresenta blocos intersticiais nos braços longos, o cromossomo W apresenta-se totalmente heterocromático. Bandas C+ podem ser também visualizadas nas regiões pericentroméricas e teloméricas de outros cromossomos do complemento, embora a quantidade total de heterocromatina seja relativamente discreta nesta espécie.

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs), estão localizadas em um único par de homólogos (par 18), na região terminal do braço longo (Fig. 1box), sendo coincidentes com uma região heterocromática (Fig. 1b,d).

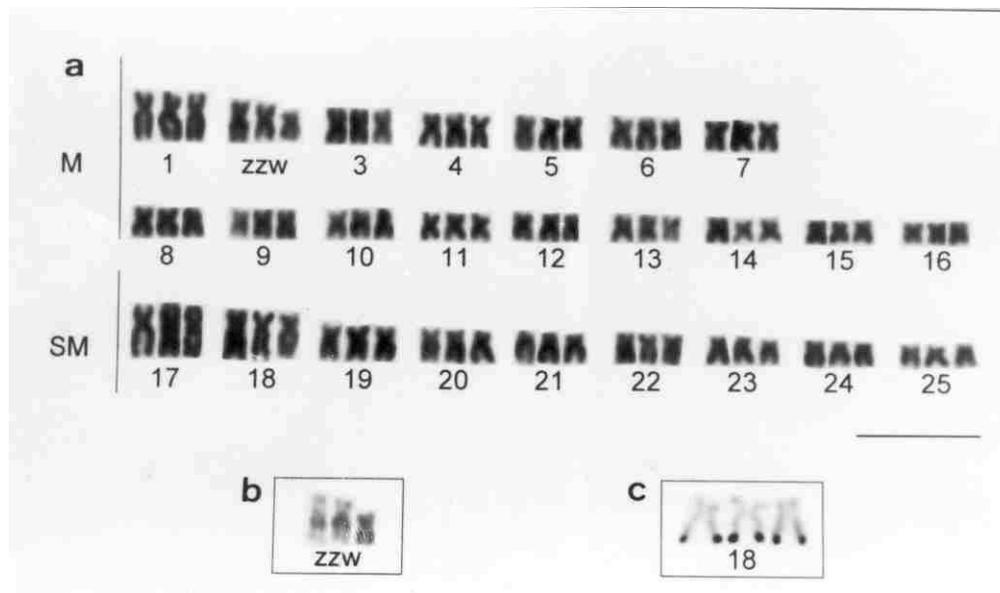
Um caso de triploidia natural ( $2n=3x=75$ ) foi também verificado em um espécime fêmea (Fig. 2a), possuindo dois cromossomos Z e um cromossomo W (Fig. 2b). Concordantemente, três homólogos do par 18 mostraram sítios ribossômicos ativos (Fig. 2c).

O cariótipo de *Characidium cf. zebra*, ( $2n=50$ ), encontra-se constituído por 32 cromossomos metacêntricos e 18 submetacêntricos, NF=100 em ambos os sexos (Fig. 3a). Nesta espécie, nenhum heteromorfismo cromossômico foi observado entre os sexos.

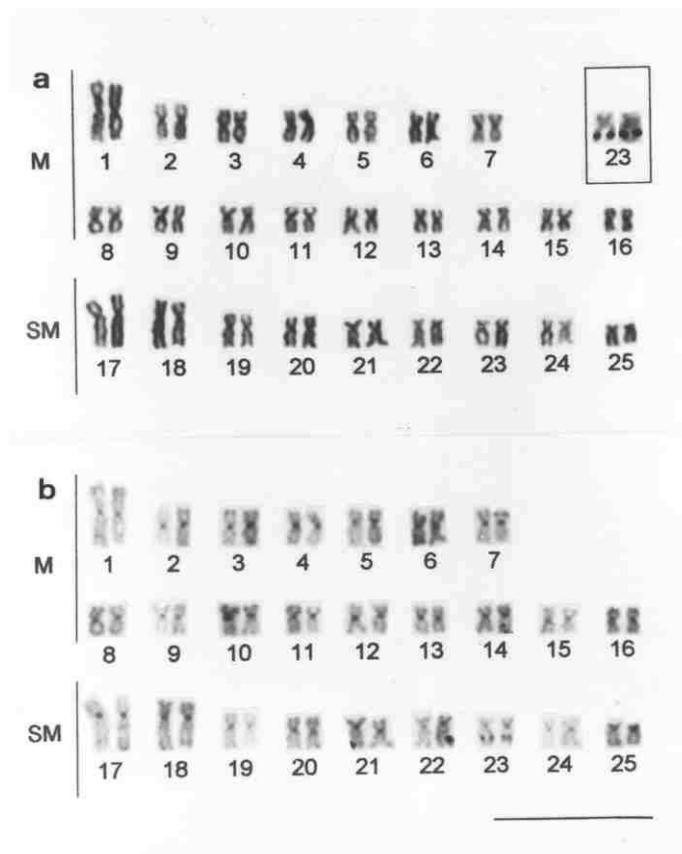
Heterocromatina pericentromérica pode ser observada em todos os cromossomos do complemento cariotípico, de forma mais conspícua do que em *C. gomesi*. As NORs estão localizadas na região intersticial do par nº 23 (Fig. 3 box) e são também coincidentes com pequenos blocos heterocromáticos (Fig. 3b).



**Fig. 1.** Cariótipo de *Characidium gomesi*, fêmea (a,b) e macho (c,d) com coloração convencional Giemsa (a,c) e bandamento-C sequencial (b,d). Em evidencia no box o par 18 portador de sítios de NORs. A barra equivale 5µm.



**Fig. 2.** Cariótipo do indivíduo triploide fêmea de *Characidium gomesi*, com coloração convencional Giemsa (a), bandamento-C nos cromossomos sexuais (b) e os cromossomos portadores de sítios de NORs (c).



**Fig. 3.** Cariótipo de *Characidium cf. zebra*, com coloração convencional Giemsa (a) e bandamento-C sequencial (b). Em evidência no box o par 23 portador dos sítios de NORs. A barra equivale 5 $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

Ambas as espécies simpátricas de *Characidium*, *C. gomesi* e *C. cf. zebra* mostraram o mesmo número diplóide ( $2n=50$ ), o mesmo  $NF=100$  e uma macroestrutura relativamente parecida. Entretanto em *C. gomesi* foi detectado um mecanismo cromossômico sexual ZZ/ZW bem evidente, enquanto em *C. cf. zebra* nenhum heteromorfismo cromossômico foi observado. Diferenças em relação à localização das NORs também foram constatadas entre as duas espécies, pois enquanto em *C. gomesi* estas regiões são encontradas no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos grandes (par 18), em *C. cf. zebra* as NORs podem ser vistas nas regiões intersticiais do braço longo de pequenos cromossomos submetacêntricos (par 23). Além disso, o primeiro par do cariótipo de *C. cf. zebra* é acentuadamente maior em relação ao segundo par, o que não é tão evidente em *C. gomesi* (Fig. 2 e 4). Assim sendo, os caracteres cromossômicos analisados são perfeitamente diagnósticos para estas duas espécies simpátricas, permitindo uma caracterização precisa das mesmas.

Miyazawa & Galetti Jr. (1994) estudaram 4 espécies de *Characidium*, *C. cf. zebra*, *C. cf. lagosantensis*, *C. pterostictum* e *Characidium* sp. de diversas localidades na bacia do Paraná, as quais apresentaram uma grande similaridade cariotípica. Entretanto Maistro et al. (1998) analisando populações de *C. cf. fasciatum* da bacia do Paraná, descreveram cariótipos divergentes daqueles relatados por Miyazawa & Galetti Jr. (op. cit.). Segundo Maistro et al., (1998) as diferenças nas estruturas cariotípicas entre espécies-populações de *Characidium* poderiam estar relacionadas ao modo de vida desses animais, típicos de cabeceiras, com baixa mobilidade, formando populações locais que poderiam facilitar a fixação de rearranjos cromossômicos.

Aproximadamente 50% das ocorrências de cromossomos sexuais, reportadas para a fauna neotropical, correspondem à heterogametia feminina (Moreira-Filho et al., 1993; Bertollo et al., 2000) entre outros. Dois padrões básicos tem sido postulado para explicar a origem e desenvolvimento dos cromossomos sexuais nesse grupo. No primeiro ocorreria, inicialmente, um processo de prevenção da permuta de segmentos entre os homólogos durante a meiose, decorrente de rearranjos cromossômicos estruturais (Beçak et al., 1969). No segundo, a etapa inicial da diferenciação poderia ocorrer mesmo independentemente de rearranjos, a partir da origem e acúmulo de algumas classes de DNA satélite em um dos homólogos do par inicial, estando portando associada a um processo de heterocromatinização (Singh et al., 1980, entre outros).

Em algumas espécies como em *Poecilia var. melanística* (Haaf & Schmid, 1984), *Leporinus* (Galetti Jr. & Foresti, 1986), *Semaprochilodus taeniatus* (Feldberg et al., 1987), *Poecilia latipinna* (Sola et al., 1990), *P. reticulata* (Nanda et al., 1991), *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo et al., 1991), *Micropepidogaster leucofrenatus* e *Pseudotocinclus tietensis* (Andreato, 1991), *Parodon hilarii* (Moreira-Filho et al., 1993; Jesus et al., 2000), a diferenciação entre os cromossomos sexuais parece estar de fato relacionada a segmentos de heterocromatina exclusivo aos cromossomos Y ou W. Na maioria desses casos a heterocromatinização primária parece ter sido seguida por um processo de acúmulo da heterocromatina, com o consequente alongamento do cromossomo heterólogo (W ou Y) em relação ao homólogo original (Z ou X). Por outro lado, no caso das diversas espécies de *Triporthus* esse processo foi acompanhado por uma redução de tamanho do cromossomo W, o qual apresenta-se menor que o Z e morfologicamente diferenciável entre as distintas espécies já analisadas (Bertollo & Cavallaro, 1992;

Sánchez & Jorge, 1999; Artoni et al., 2001). Neste contexto, os resultados obtidos em *C. gomesi* enquadram-se também no modelo *Triportheus*, visto a redução e heterocromatinização apresentada pelo cromossomo W nesta espécie.

Maistro et al., (1998), também descreveram para *Characidium* cf. *fasciatum*, da bacia do rio Paraná, um sistema ZZ/ZW, onde os cromossomos Z e W apresentam-se com a mesma forma e tamanho, sendo diferenciáveis entre si pela heterocromatinização total do cromossomos W. Assim sendo, o sistema ZW de *C. gomesi* mostra-se distinto daquele de *C. cf. fasciatum* no que se refere ao cromossomo W, o qual seguiu processos de diferenciação específicos em cada uma dessas espécies.

Entre os peixes neotropicais podem ser encontrados distintos sistemas de cromossomos sexuais, mesmo entre espécies de uma mesma família, como em Erythrinidae (Bertollo et al., 1979, 1983) e Parodontidae (Moreira-Filho et al., 1993), ou até mesmo entre espécies de um mesmo gênero, como em *Eigenmannia* (Almeida-Toledo et al., 1984), em *Hoplias* (Bertollo et al., 2001), entre outros. A diversidade destes sistemas indica que, além dos processos terem origem distintas, eles ocorreram em épocas diferentes, visto que as separações das bacias hidrográficas brasileiras aconteceram em diferentes períodos, seguidas por um isolamento entre elas. Assim, sendo, diferentes sistemas de cromossomos sexuais, puderam ser fixados de forma independente nos componentes da mesma família, ou até mesmo de um dado gênero, contribuindo assim significativamente para a especiação. Esta hipótese pode ser reforçada ao se verificar a história geomorfológica das regiões onde se encontram os atuais sistemas hidrográficos brasileiros. Paralelamente, outros eventos geomorfológicos poderiam ter contribuído para a redistribuição destas espécies, colocando-as em condição de simpatria, onde

os sistemas de cromossomos sexuais já diferenciados poderiam contribuir efetivamente para o isolamento reprodutivo entre elas, tal é o caso “captura de cabeceiras”, (termo usado para designar, quando a cabeceira de um rio é capturada por outro rio pertencente à bacia hidrográfica adjacente), como ocorreu nas antigas cabeceiras do rio Tietê que foram anexadas ao rio Paraíba do Sul (AB´Saber, 1957), ou das conexões entre bacias hidrográficas distintas, como as das cabeceiras e rios da bacia do Paraná com as cabeceiras de tributários do rio Amazonas (Menezes, 1972). Diferenciações cromossômicas devem estar efetivamente atuando no isolamento entre as espécies simpátricas e sintópicas *C. gomesi* e *C. cf. zebra* aqui estudadas, uma com um sistema ZZ-ZW bem diferenciado e outra sem nenhum heteromorfismo cromossômico observado.

Em *Triportheus* o sistema ZZ-ZW pode mostrar-se diferenciado, mesmo entre espécies pertencentes a uma grande bacia hidrográfica. Neste caso, o provável isolamento deste grupo de peixes entre os inúmeros tributários presentes num grande sistema hidrográfico, como o Amazônico, pode favorecer tal diferenciação, o mesmo podendo ser válido, para o gênero *Characidium*, onde também podemos encontrar um sistema de cromossomos sexuais ZW diferenciados em *C. gomesi* e *C. cf. fasciatum*, ambas pertencentes à bacia do Paraná. Assim, a interpretação da diversidade deste grupo de peixes deve ser fundamentada não apenas no modo de vida destes animais, mas também na história das origens das bacias hidrográficas, juntamente com os eventos geomorfológicos que ocorreram no Continente Sul-Americano.

No que se refere a situações de poliploidias entre os peixes neotropicais, todas as descrições já apresentadas referem-se a formas triplóides (Tabela 2), não sendo descritos outras condições poliplóides. Entretanto em *Curimata modesta*

(Venere et. al.,1985) e em *Astyanax scabripinnis* (Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994) a triploidia é acompanhada por cromossomos supranumerários. Em geral a fertilização de óvulos diplóides por espermatozóides haplóides tem sido considerada como a origem mais provável dos espécimes triplóides, associada a possíveis choques térmicos por ocasião da desova, induzindo a formação de óvulos não-reduzidos (Cuellar & Uyeno, 1972; Valenti, 1975).

O caso de triploidia, aqui apresentado pelo exemplar de *C. gomesi*, torna-se interessante por esta espécie possuir cromossomos sexuais. Neste exemplar foi verificado a presença de 2 cromossomos Z e um W (Fig. 3b) e 3 cromossomos portadores de NORs (Fig. 3c). Molina et al., (1996) também registraram uma ocorrência semelhante em *Leporinus*. cf *elongatus*, espécie esta que também apresenta um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, sendo o exemplar analisado um macho, portador de 3 cromossomos Z. A presença de dois cromossomos Z em *C. gomesi* e a possível dificuldade que os espermatozóides (2n) teriam para fecundar os ovócitos, são indícios que apóiam a hipótese da triploidia ter sido originada através da não disjunção meiótica na formação do óvulo em *C. gomesi*. Entretanto não podemos descartar que, em alguns outros casos, espermatozóides não-reduzidos (2n) poderiam também fecundar os ovócitos (n), dando assim origem a espécimes triplóides.

Poucas espécies de *Characidium* foram estudadas até o momento. Entretanto os resultados do presente trabalho, associados aos da literatura, evidenciam que enquanto o número diplóide das espécies deste grupo de peixes parece ser constante ( $2n=50$ ), ocorre uma diversidade cromossômica complementar entre as espécies, no que se refere à distribuição do bandamento C, às regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e no sistema de cromossomos sexuais.

Estudos citogenéticos e de sistemática que estão sendo conjuntamente realizados em outras espécies de distintas bacias hidrográficas, separadas por um divisor de águas (serra da Mantiqueira) na região sudeste do Brasil, associados às informações já disponíveis para o gênero *Characidium*, virão complementar a análise dos processos evolutivos que contribuíram para a diversidade deste grupo de peixes.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela FAPESP (proc. 01-00713-0) e CNPq (proc. 523237/95-2).

## REFERÊNCIAS

- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. & Toledo-Filho, S.A. (1985). Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the amazon basin. *Genetica*, 66: 85-88.
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. & Toledo-Filho, S.A. (1984). Complex Sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica*, 64: 165-169.
- 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 the ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Res.*, 9: 449-456.
- Beçak, W. & Beçak, M.L. (1969). Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpents. *Cytogenetics*, 8: 247-262.
- 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., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1983). Multiple sex chromosome in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, 48: 1-12.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.*, II (1): 17-37.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 1: 103-120.

- Braga, R.J. & Maistro, E.L. (2000). Estudos citogenéticos em duas espécies de *Characidium* (Pisces, Characidiinae) coletadas simpaticamente no rio Machado – MG. *Genet. Mol. Biol.*, Supplement, pg.58.
- Borin, L.A. & Martins-Santos, I.C. (1998). Triploidia natural em *Trichomycterus davisi* (Pisces, Siluriformes) da bacia do rio Iguaçu. *VII Simp. Cit. Evol. Aplic. de Peixes Neot.* p19b.
- Buckup, P.A. (1991). *The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relations HIPS with other characiform fishes.* Doctoral thesis. The University of Michigan. pp. 391.
- Centofante, L. (2000). *Análise cariotípica no “complexo” Serrasalmus spilopleura (Characiformes, Serrasalmidae) da bacia Amazônica central.* Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA/Universidade do Amazonas. Manaus, AM., pp. 53.
- Cuellar, D. & Uyeno, T. (1972). Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics*, 11: 508-515.
- Dias, A.L., Oliveira, C. & Moreira-Filho, O., 1992 — Ocorrência de triploidia natural em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *IV Simp. Cit. Evol. Aplic. de Peixes Neot.*, Resumos, p25.
- Fauaz, G., Vicente, V.E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 17(2): 157-163.
- Fernandes, F.M.C., Almeida-Toledo, L.F. & Toledo-Filho, S.A. (1992). Ocorrência de triploidia natural em *Gymnotus carapo* (Pisces, Gymnotoidei). *IV Simp. Cit. Evol. Aplc. de Peixes Neot.*, Resumos, p41.

- Galetti Jr., P.M., Mestriner, C.A., Venere, P.C. & Foresti, F. (1991). Heterocromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenet. Cell Genet.*, 56: 116-121.
- Giuliano-Caetano, L. & Bertollo, L.A.C. (1990). Karyotypic variability in *Hopleryttrinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II Occurrence of natural triploidy. *Rev. Brasil. Genet.*, 13: 231-237.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolos organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kavalco, K.F. & Margarido, V.P. (2000). Descrição cariotípica de *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) coletados no rio Paraná, na região de Guaíra – PR, com ocorrência de triploidia natural. *Genet. Mol. Biol. Supplement*, 23(3) p58.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Maistro, E.L., Mata, E.P., Oliveira, C. & Foresti, F. (1998). Unusual occurrence of a ZZ/ZW Sex chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*, 104: 1-7.
- Maistro, E.L., Dias, A.L., Foresti, F., Oliveira, C. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia*, 47(3-4): 233-239.
- Malacrida, A.C.C.P., Shibata, O.A. & Giuliano-Caetano, L. (2000). Análise cromossômica de *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) Coletado no rio Claro-Tamarana-PR e ribeirão dos Apertados-PR. *VIII Simp. Cit. Genet. de Peixes Neot.* p43.

- Miyazawa, C.S. (1991). *Estudo cariotípico comparativo de espécies e populações distintas do gênero Characidium (Characidiinae, Characidae). Considerações citotaxonômicas e evolutivas*. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, SP. 82p.
- Miyazawa, C.S. & Galetti Jr., P.M. (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Cytologia*, 59: 73-79.
- Molina, W.F., Margarido, V.P. & Galetti Jr., P.M. (1996). Triploidia natural e variação cromossômica estrutural em *Leporinus* Tipo *elongatus* (Pisces, Anostomidae). *VI simp. Cit. Evol. Aplic. de Peixes Neot.*, p53.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. & Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of Sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46 (2-3): 115-125.
- Morelli, S., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). II. Occurrence of natural triploidy. *Caryologia*, 36: 245-250.
- Nakayama, C.M., Porto, J.I.R. & Feldberg, E. (2000). Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, Serrasalminidae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. *Act. Amaz.*, 30 (1): 149-154.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schroder, J.H., Zischler, H., & Epplen, J.F. (1990). Simple repetitive sequence are associated with differentiation of the sex chromosomes in guppy fish. *J. Mol. Evol.*, 30: 456-462.
- Purdom, C.E. (1983). Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33: 287-300.

- Scavone, M.D.P., Bertollo, L.A.C. & Cavallini, M.M. (1994). Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Cytobios*, 80: 223-227.
- Singh, L., Purdom, I.F. & Jones, K.W. (1980). Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma*, 79: 137-157.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75: 304-306.
- Valenti, R.J. (1975). Induced poliploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.*, 7: 519-528.
- Venere, P.C. & Galetti Jr., P.M. (1985). Natural triploidy and chromosomes B the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Rev. Brasil. Genet.*, 8: 681-687.
- Wasko, A.P., Venere, P.C. & Galetti Jr., P.M. (1996). Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Brazil. J. Genet.*, 19(2): 225-230.

## CAPÍTULO II

### **DIVERGÊNCIA CROMOSSÔMICA E MANUTENÇÃO DE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *Characidium* (CRENUCHIDAE, CHARACIDIINAE).**

Centofante, L., Bertollo, L. A. C., Buckup, P. A. & Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*, 138: 213-218.

## RESUMO

Estudos citogenéticos foram realizados em duas espécies sintópicas de *Characidium*, *C. lauroi* e *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, provenientes do ribeirão Grande, pertencente à bacia do rio Paraíba do Sul. As duas espécies apresentam número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, mas diferem quanto à forma dos cromossomos, padrão de bandas-C e localização das regiões organizadoras de nucléolos. Em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* foi detectado um tipo de sistema de cromossomos sexuais ZW ainda não descrito para o gênero *Characidium*, constituído por cromossomos metacêntricos de igual tamanho. As espécies de *Characidium* com sistema de cromossomos sexuais formam um grupo monofilético. Variações neste sistema são interpretadas como resultantes de isolamento geográfico entre espécies alopátricas.

## ABSTRACT

Cytogenetic studies were performed in two syntopic species of *Characidium*, *C. lauroi* e *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, from ribeirão Grande, Paraíba do Sul river basin. Both species have diploid number  $2n=50$  chromosomes, but differ in chromosome shape, C-banding pattern and location of nucleolar organizing regions. In *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* a new type of ZW sex chromosome system composed of equal sized metacentric chromosomes is reported for the first time in the genus *Characidium*. Species of *Characidium* with a sex chromosome system form a monophyletic group. Variations in this system are interpreted as resulting from geographic isolation among allopatric species.

## INTRODUÇÃO

Os Characidiinae compreendem um grupo de peixes de tamanho relativamente pequeno (geralmente menores que 10 cm) pertencentes à ordem Characiformes, sendo amplamente distribuídos em águas doces dos sistemas entre o Panamá até o leste da Argentina. Este grupo foi recentemente removido da família Characidae juntamente com os Crenuchinae e incluídos na família Crenuchidae (Buckup, 1998). Os Crenuchidae são uma unidade monofilética (Buckup, 1993a) incluindo 80 espécies nominais, das quais 71 são consideradas válidas. Uma hipótese filogenética está disponível para a maioria dos taxa (Buckup, 1993c). Estas hipóteses incluem representantes de 8 gêneros, mas os taxa descritos requerem uma evolução filogenética detalhada (ex. *Geryichthys* Zarske, 1997; *Skiotocharax* Presswell et al., 2000). *Characidium* é o gênero de maior diversidade e distribuição dentre os Characidiinae, inclui 59 espécies nominais, das quais 48 são consideradas válidas. Geralmente são encontrados nas cabeceiras de pequenos riachos. Este gênero é pouco conhecido (Buckup, 1993c), onde várias espécies ainda não foram descritas ou apenas recentemente estão sendo descritas (Zarke & Géry, 2001; Melo & Buckup, 2002).

Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* iniciaram-se na última década, onde pôde ser observado uma estabilidade cariotípica com relação ao número diplóide ( $2n=50$ ), porém com uma variabilidade na estrutura cariotípica envolvendo forma dos cromossomos, presença de cromossomos B, sistema de cromossomos sexuais e triploidia natural (Miyazawa & Galetti Jr., 1994; Maistro et al., 1998; Centofante et al., 2001).

No presente trabalho estamos apresentando dados cromossômicos para duas formas simpátricas e sintópicas de *Characidium*, uma identificada como *C. lauroi* e a

outra provavelmente representa uma espécie não descrita denominada provisoriamente como *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*. A estrutura cromossômica das espécies são descritas, incluindo uma nova forma para o sistema cromossômico sexual ZZ/ZW em *Characidium*. A evolução dos caracteres cromossômicos é discutida, levando-se em consideração a distribuição geográfica e evidências filogenéticas disponíveis.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram feitas análises cromossômicas em 930 metáfases (43 espécimes: 26 fêmeas e 17 machos) de *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* e 620 metáfases (22 espécimes: 14 fêmeas e 8 machos) de *Characidium lauroi* provenientes do córrego ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, localizado na região de Pindamonhangaba, Estado de São Paulo, Brasil (22°46'2.98"S e 45°26'7.05"W). Os exemplares foram depositados e catalogados no Museu Nacional do Rio de Janeiro, com os números MNRJ 22211 e MNRJ 22212, respectivamente.

Os espécimes previamente identificados como "*Characidium cf. fasciatum*" no trabalho de Maistro et al., (1998) e subsequentemente doados ao MNRJ foram reidentificados no presente estudo como *Characidium* sp. cf. *gomesi* e *Characidium* sp. cf. *zebra*. Estes foram catalogados com os números MNRJ 24025, MNRJ 24028 e MNRJ 24031.

As preparações para obtenção de cromossomos mitóticos seguiram a técnica descrita por Bertollo et al., (1978). Para obtenção do padrão de heterocromatina constitutiva utilizou-se o método descrito por Sumner (1972), e para a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) a técnica descrita por Howell & Black (1980). Para análises seqüenciais de preparações convencionais-bandamento

C, seguiram as recomendações descritas por Centofante et al., (2002a). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a razão de braços (Levan et al., 1964).

## RESULTADOS

O cariótipo de *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* ( $2n=50$ ) encontra-se constituído por 30 cromossomos metacêntricos e 20 submetacêntricos. Com número fundamental (número de braços)  $NF=100$  (Fig. 1).

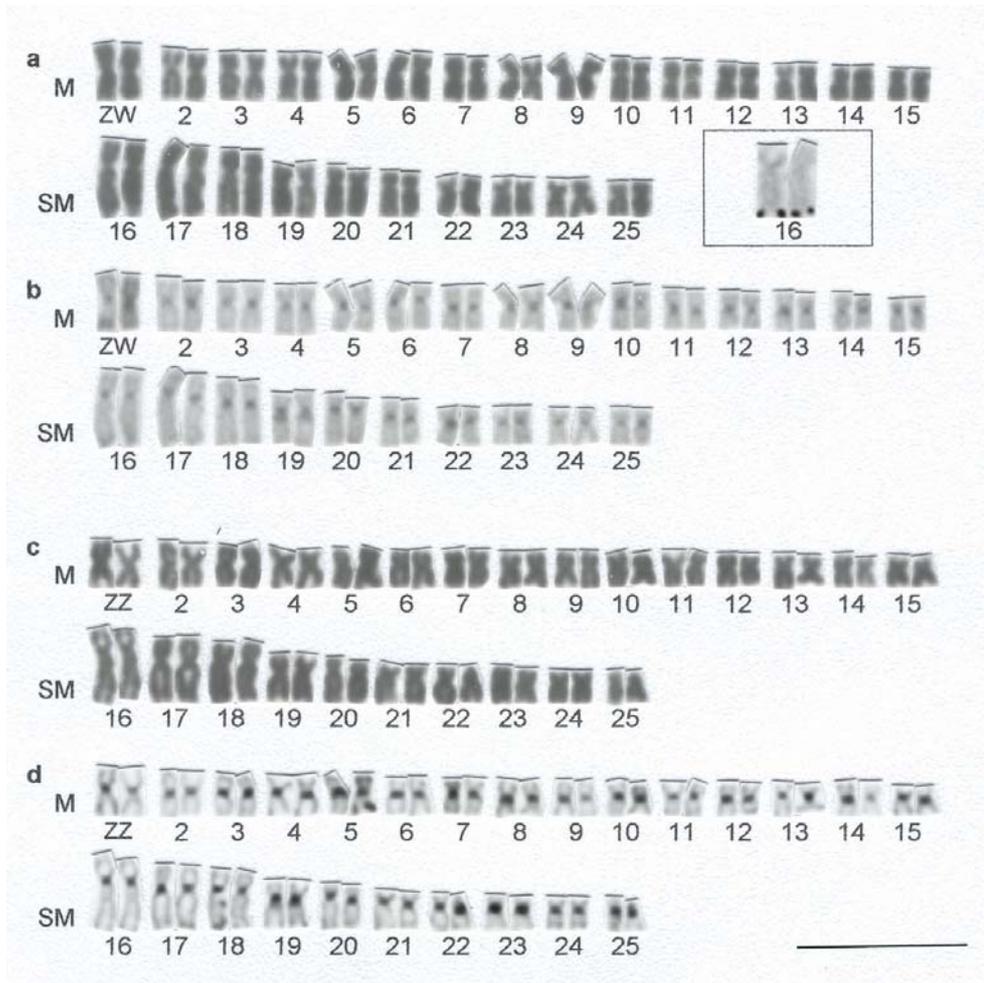
A heterocromatina constitutiva está presente nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, em ambos os sexos (Fig. 1b e d). Contudo, o primeiro par cromossômico diferencia-se entre machos e fêmeas no tocante ao padrão de bandas-C. Assim, nos machos, a heterocromatina encontra-se localizada nas regiões teloméricas deste par (Fig. 1d), enquanto que no cariótipo das fêmeas apenas um cromossomo possui esse padrão de distribuição de heterocromatina, juntamente com um outro cromossomo totalmente heterocromático (Fig. 1b). Dessa forma, embora haja uma similaridade na forma e no tamanho dos dois cromossomos em questão, ocorre uma diferenciação específica entre os sexos no tocante à distribuição da heterocromatina constitutiva, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) estão localizadas em um par de homólogos (par 16), na região terminal do braço longo (Fig. 1-box), sendo coincidentes com uma região heterocromática (Fig. 1b e d).

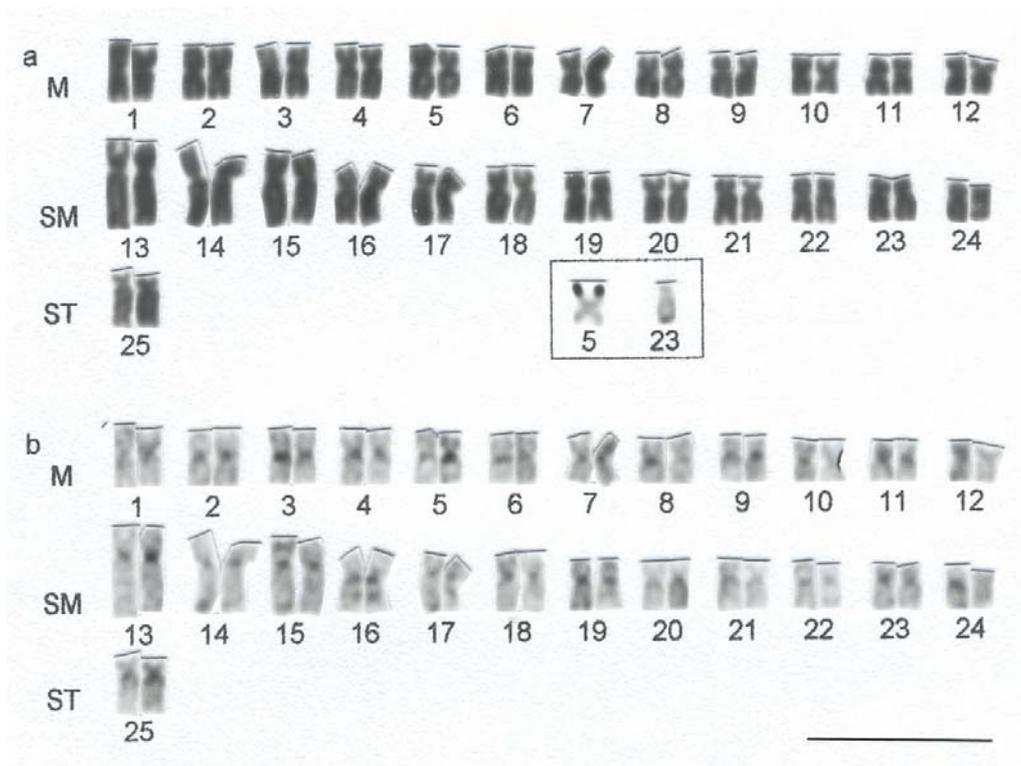
O cariótipo de *Characidium lauroi* ( $2n=50$ ) é constituído por 24 cromossomos metacêntricos, 24 submetacêntricos e 2 subtlocêntricos, sendo o  $NF=100$  (Fig. 2a).

A heterocromatina constitutiva também ocorre na região pericentromérica de todos os cromossomos e na região telomérica de alguns poucos pares (Fig. 2b). Nesta espécie, nenhum heteromorfismo cromossômico foi observado entre os sexos.

As Ag-NORs estão localizadas em dois pares distintos do cariótipo (par 5 e 23). No entanto, foi detectado um número máximo de três cromossomos portadores de sítios ribossômicos, com uma maior frequência para dois cromossomos não homólogos, sendo um metacêntrico do par 5, com marcação na região telomérica do braço menor, e um submetacêntrico do par 23, com marcação na região telomérica do braço maior (Fig. 2-box). Nesta espécie as Ag-NORs também foram coincidentes com pequenos blocos heterocromáticos (Fig. 2b).



**Fig. 1.** Cariótipo de *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, fêmea (a,b) e macho (c,d), com coloração Giemsa convencional (a,c) e bandamento-C (b,d). Em evidência (no Box) o par portador das NORs. A barra equivale a 5µm.



**Fig. 2.** Cariótipo de *Characidium lauroi* (a) coloração Giemsa convencional e (b) bandamento-C. Em evidência (no Box) os cromossomos portadores das NORs. A barra equivale a 5 $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

As duas espécies estudadas, *C. lauroi* e *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, apresentaram o mesmo número diplóide ( $2n=50$ ) e o mesmo número fundamental ( $NF=100$ ). Entretanto, diferenças significativas quanto à fórmula cromossômica, localização dos sítios ribossômicos (Ag-NORs) e distribuição do padrão de bandamento-C, puderam ser observadas entre estas espécies. Em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* também foi possível caracterizar um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, enquanto em *C. lauroi* nenhum heteromorfismo cromossômico foi observado entre os sexos.

Sistemas de cromossomos sexuais em peixes de água doce neotropical não são muito freqüentes, ocorrendo em apenas 6% das espécies citogeneticamente estudadas (Centofante et al., 2002b). Contudo, este grupo apresenta uma das maiores diversificações desses sistemas entre os vertebrados, ocorrendo sistemas simples como ZZ/ZW e XX/XY, ou múltiplos como ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y e XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> (Moreira-Filho et al., 1993). Casos de heterogametia feminina correspondem aproximadamente 65% das descrições (Centofante et al., 2002b).

Os sistemas de cromossomos sexuais múltiplos estão associados com números diplóides diferentes entre machos e fêmeas e formas distintas dos cromossomos. Por outro lado, a maioria dos sistemas simples já descritos evidenciam diferenças marcantes no tamanho e forma dos cromossomos Y ou W. Entretanto, os casos de sistemas simples onde a diferenciação morfológica entre estes cromossomos não é marcante, parecendo limitada a pequenos segmentos exclusivos do Y ou W, dificultam sua detecção e análise, requerendo o auxílio de bandamentos cromossômicos específicos (Haaf & Schmid, 1984; Almeida-Toledo et al., 1984; Sola et al., 1990; Nanda et al., 1990; Moreira-Filho et al., 1993).

Sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW já foram descritos para 3 espécies de *Characidium*. Maistro et al., (1998) primeiro descreveu um heteromorfismo cromossômico sexual em duas populações identificadas como “*characidium cf. fasciatum*” proveniente da bacia do Paranapanema (sistema Paraná-Plata). Baseado na morfologia externa identificamos a maioria dos espécimes analisados por Maistro et al., (1998) como *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* (ver Materiais e Métodos, acima). Nesta espécie os cromossomos sexuais são representados pelos cromossomos do par 19, que apresentam a mesma forma (submetacêntrico) e tamanho. Em *Characidium gomesi* proveniente das cabeceiras do rio Grande (sistema Paraná-Plata) no noroeste da encosta da Serra da Mantiqueira, o cromossomo Z é metacêntrico correspondente ao par n<sup>o</sup> 2 do complemento cariotípico, enquanto que o cromossomo W apresenta-se como submetacêntrico de tamanho menor em relação ao cromossomo Z (Centofante et al., 2001). Em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* (presente trabalho) os cromossomos Z e W são do mesmo tamanho e forma, correspondendo ao primeiro par do cariótipo. Nos três casos o cromossomo W é distinguido por ser completamente heterocromático.

*Characidium gomesi* a uma unidade monofilética derivada de Characidiinae que também inclui *C. fasciatum* (Buckup, 1992, 1993b). *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* é muito similar a *C. gomesi*, diferindo somente em poucas medidas morfométricas e detalhes na coloração, e parecem pertencer ao mesmo grupo monofilético. Maistro et al., (1998) refere-se a duas populações provenientes do Paranapanema como “*Characidium cf. fasciatum*”, também implicando como membro deste grupo. A distribuição do sistema cromossômico sexual ZW com o cromossomo W heterocromático sugere que dentro dos Characidiinae este tipo de mecanismo é restrito relativamente a uma pequena unidade de espécies estritamente relacionadas

com *C. gomesi*. Por outro lado, este sistema é ausente para outras espécies de *Characidium* até então estudadas, incluindo populações identificadas provisoriamente como *C. zebra* (Miyazawa & Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001). Espécies com a área do istmo completamente escamada como em *C. zebra* são morfologicamente primitivos e ocupam uma posição basal na filogenia de *Characidium* (Buckup, 1993b). A ausência de um sistema de cromossomos sexuais diferenciado é, portanto uma condição plesiomórfica para o gênero *Characidium*, enquanto que a presença do sistema de cromossomos sexuais ZW parece ser uma sinapomorfia de uma unidade relativamente restrita de espécies que incluem pelo menos alguns membros do Clade 2 como diagnosticado por Buckup (1993b).

A diferenciação na forma dos cromossomos para o sistema sexual ZW em *C. cf. gomesi* (citado como *C. fasciatum* por Maistro *et al.*, 1998), *C. gomesi* (Centofante *et al.*, 2001) e *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* (presente estudo), poderia ser associado com barreiras geográficas. Uma vez que, as formas se encontram isoladas uma das outras. A população de *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* proveniente da bacia do rio Paraíba do Sul é atualmente isolada das populações de *C. cf. gomesi* e *C. gomesi*, pertencentes à bacia do Paraná-Plata, pela serra da Mantiqueira ao norte e pela serra do Arujá ao sul. As populações de *C. cf. gomesi* do rio Paranapanema e de *C. gomesi* do rio Grande pertencem ao sistema do Paraná-Plata, contudo as cabeceiras onde se encontram estas populações são extremamente separadas por intervenções geológicas e bacias.

Heteromorfismo cromossômico feminino, na maioria dos casos, decorre em um aumento do cromossomo W devido ao acúmulo de heterocromatina, quando comparado com o cromossomo Z (Centofante *et al.*, 2001). O cromossomo W de *C.*

*gomesi* proveniente da bacia do rio Grande (sistema Paraná-Plata), contudo, é consideravelmente menor que o cromossomo Z (Centofante et. al., *op. cit.*). Entre os peixes neotropicais, esta forma de heteromorfismo é conhecida somente nos caracídeos do gênero *Triportheus*. Neste gênero todas as espécies estudadas apresentam um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde o tamanho e forma do W é bastante variável entre as espécies quando comparado com o cromossomo Z (Bertollo & Cavallaro, 1992; Artoni et al., 2001). A diferença no tamanho entre os cromossomos sexuais observado na população de *C. gomesi* proveniente da bacia do rio Grande (sistema Paraná-Plata) é mais parsimoniosamente interpretado como uma autapomorfia, uma vez que, esta espécie não é relacionada filogeneticamente com *Triportheus* (Buckup, 1998), e *C. gomesi* é mais estreitamente relacionada com as populações que apresentam os cromossomos sexuais de mesmo tamanho.

As regiões organizadoras de nucléolos, nas espécies de *Characidium* que apresentam cromossomos sexuais, estão presentes na região terminal do braço maior de um par cromossômico submetacêntrico grande, que poderia ser considerado homeólogo entre estas espécies. Entretanto, nas espécies que não apresentam cromossomos sexuais, as NORs estão localizadas em diferentes cromossomos. Este é o caso, por exemplo, de distintas populações de *C. cf zebra*, que apresentam as NORs na região intersticial no braço maior de um par cromossômico submetacêntrico pequeno (Miyazawa & Galetti Jr., 1994; Centofante et al., 2001) e de *C. lauroi*, onde as NORs são múltiplas e localizadas em pequenos cromossomos não homólogos meta-submetacêntricos (presente trabalho). Assim, os dados das NORs reforçam a idéia que as espécies portadoras de sistema ZZ/ZW são mais relacionadas entre si, quando comparadas com as outras espécies do gênero não portadoras deste sistema.

A ocorrência de espécies estreitamente relacionadas com e sem presença de cromossomos sexuais vivendo em sintopia, sugere que este sistema poderia ser um importante mecanismo para a manutenção do isolamento genético entre as espécies coexistentes. Tal ocorrência tem sido observada em *Apareiodon* (Moreira-Filho et al., 1985), *Leporinus* (Galetti Jr. et al., 1995), *Hoplias* (Scavone et al., 1994; Bertollo et al., 2000), *Characidium* (Centofante et al., 2001; presente estudo) e *Parodon* (Centofante et al., 2002b).

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela FAPESP (proc. 01-00713-0) e CNPq (proc. 523237/95-2).

## REFERÊNCIAS

- Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F. & Toledo-Filho, S. A. (1984). Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotyformes). *Genetica*, 64: 165-169.
- 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 Res.*, 9 (6): 449-456.
- Bertollo, L. A. C. & Cavallaro, Z. I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cyt. C. Genet.*, 60: 60-63.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 1: 103-120.
- Bertollo, L. A. C., Born, G. G., Fenocchio, A. S. & Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geografic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res.*, 8: 603-613.
- Buckup, P. A. (1992). Redescription of *Characidium fasciatum*, type species of the Characidiinae (Teleostei, Characiformes). *Copeia*, 4: 1066-1073.
- Buckup, P. A. (1993a). The monophyly of Characidiinae, a neotropical grup of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysii). *Zool. J. Linnean 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 (2), 97-154.
- Buckup, P. A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. & Lucena C. A. S., ed.), pp. 123-144. Porto Alegre: Edipurcs.
- 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 a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*, 55 (3): 253-260.
- Centofante, L., Porto, J. I. R. & Felberg, E. (2002a). Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon Basin. *Caryologia*, 55 (1): 37-45.
- Centofante, L., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2002b). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 55 (2): 139-150.
- Galetti Jr., P. M., Lima, N. R. W. & Venere, P. C. (1995) A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia*, 60: 375-382.

- Haaf, T. & Schmid, M. (1984). An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma*, 89: 37-41.
- 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.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Maistro, E. L., Mata, E. P., Oliveira, C. & Foresti, F. (1998). Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*, 104: 1-7.
- Melo, M. R. & Buckup, P. A. (2002). *Characidium stigmatosum* (Characiformes: Crenuchidae): a new species of characidiin fish from central Brazil. *Copeia*, 4: 988-993.
- Miyazawa, C. S. & Galetti Jr, P. M. (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Cytologia*, 59: 73-79.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. & Galetti Jr, P. M. (1985). Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). *Caryologia*, 38 (1): 47-55.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. & Galetti Jr., P. M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanism in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46: 115-125.

- Nanda, I., Feichinger, W., Schmid, M., Schroder, J. H., Zischler, H. & Epplen, J. F. (1990). Simple repetitive sequence are associated with differentiation of the sex chromosomes in guppy fish. *J. Mol. Evol.*, 30: 456-462.
- Presswell, B., Weitzman, S. H. & Bergquist, T. (2000). *Skiotocharax meizon*, a new genus and species of fish from Guyana with a discussion of its relationships (Characiformes: Crenuchidae). *Ichthyol. Explor. Freshw.*, 11 (2): 175-192.
- Scavone, M. D., Bertollo, A. C. & Cavallini, M. M. (1994). Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Cytobios*, 80: 223-227.
- Sola, L., Monaco, P. J. & Rasch, E. M. (1990). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NORs polymorphisms and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*. *Cyt. C. Genet.*, 53: 148-154.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Explor. C. Res.* 75: 304-306.
- Zarske, A. (1997). *Gerychthys sterbai* gen. Et spec. nov. und *Microcharacidium geryi* spec. nov.: Beschreibung einer neuen Gattung und zweier neuer Arten von Bodensalmlern aus dem Einzugsgebiet des rio Ucayali in Peru (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Zool. Abh Mus Tierkd*, 49 (9): 157-172.
- Zarske, A. & Géry, J. 2001. Beschreibung von drei neuen Arten der Gattung *Characidium* Reinhardt, 1866 aus Bolivien und Paraguay (Teleostei: Characiformes: Characidiinae). *Zool. Abh Mus Tierkd*, 51 (2): 229-246.

### **CAPÍTULO III**

## **SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS DO TIPO ZZ/ZW EM UMA NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Parodon* (PISCES, PARODONTIDAE).**

Centofante, L., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 55: 139-150.

## RESUMO

Foi realizada uma análise cromossômica em duas espécies simpátricas do gênero *Parodon*, *Parodon* sp. e *Parodon tortuosus*, pertencentes à bacia do Paraná, Estado de São Paulo, Brasil. Apesar das duas espécies apresentarem o mesmo número diplóide ( $2n=54$ ), foi detectada uma diversidade interespecífica com relação às formas cariotípicas e padrão de bandas C, além de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em *Parodon* sp., o qual foi caracterizado como uma nova espécie para este gênero. Em *P. tortuosus* não foi detectado heteromorfismo cromossômico sexual. Os dados são discutidos considerando a ictiofauna regional juntamente com os aspectos evolutivos.

## ABSTRACT

A chromosome analysis was carried out in two sympatric fish species of the genus *Parodon*, *Parodon* sp. and *P. tortuosus*, from the Paraná basin, São Paulo State, Brazil. Although both species showed the same diploid number ( $2n=54$ ), an interspecific diversity was detected concerning their karyotypic formulas and banding patterns, besides a ZZ/ZW sex chromosome system detected in *Parodon* sp., which was characterized as a new species for this genus. No heteromorphic sex chromosomes were found in *P. tortuosus*. These data are discussed concerning the characterization of the regional ictiofauna and its evolutionary aspects.

## INTRODUÇÃO

Os estudos sobre cromossomos sexuais em peixes neotropicais tem sido intensificados nos últimos anos, com a descrição de vários sistemas em diferentes espécies/populações (Moreira-Filho et al., 1993). Uma das primeiras citações sobre um possível caso de heterogametia masculina em peixes foi descrito por Nogusa, (1955; 1960) no Gobiidae *Mogruna obscura* (cit. em Ohno, 1974). Entretanto os estudos citogenéticos iniciais foram efetuados principalmente através de cortes histológicos ou “squash” de tecidos/órgãos, dificultando assim uma análise mais precisa. Assim, as primeiras descrições destacavam algumas características mais facilmente perceptíveis, tais como os diferentes números haplóides e/ou diplóides observados entre machos e fêmeas portadores de cromossomos sexuais múltiplos (Uyeno & Miller, 1971; 1972), ou o tamanho diferenciado dos cromossomos em alguns sistemas simples (XY ou ZW).

Na década de 70, os métodos de suspensão celular, originalmente empregados para estudos cromossômicos de vertebrados em geral, passaram a ser adaptados para peixes, com a consequente obtenção de cromossomos metafásicos de melhor qualidade, possibilitando assim um grande avanço para esta área. Neste mesmo período, Sumner (1972) descreveu o método de bandamento C, que foi posteriormente também aplicado nas análises cromossômicas em peixes. Esta nova metodologia não tardou a propiciar novas descobertas de sistemas de cromossomos sexuais, bem como a confirmação/invalidação de descrições já anteriormente efetuadas. Nas últimas décadas, com aprimoramento e desenvolvimento de novas metodologias, tais como o emprego de fluorocromos específicos e a indução de bandas múltiplas nos cromossomos, passaram a ter um papel importante na elucidação dos rearranjos cromossômicos envolvidos com a diferenciação e origem

dos sistemas de cromossomos sexuais. Mais recentemente, a utilização de hibridação fluorescente “*in situ*”, com sondas de DNA satélite, vem complementando o aperfeiçoamento destes estudos.

Sem a pretensão de fazer uma revisão mais detalhada sobre os sistemas de cromossomos sexuais em peixes, elaboramos uma lista dos diferentes casos já relatados, com o intuito de demonstrar a diversidade de sistemas encontrados em diferentes famílias, gêneros e espécies de peixes da região neotropical, evidenciando assim o contraste com outros vertebrados, tais como os mamíferos e as aves, onde respectivamente os sistemas de cromossomos sexuais XX/XY e ZZ/ZW são mais conservativos. Até o momento foram caracterizados 55 casos de sistemas de cromossomos sexuais em peixes neotropicais (Tabela 1), com uma frequência aproximada de 64% de heterogametia feminina e 36% de heterogametia masculina. Destes, 80% representam sistemas de cromossomos sexuais simples (77% do tipo ZZ/ZW e 23% do tipo XX/XY). Os sistemas cromossômicos múltiplos representam 20% dos casos, dos quais 91% mostram heterogametia masculina e 9% heterogametia feminina.

Além da diversidade, observa-se também uma variabilidade na forma e tamanho dos cromossomos sexuais. Em algumas espécies com heterogametia feminina, o cromossomo W é o maior do complemento, como observado em várias espécies do gênero *Leporinus*, em *Parodon hilarii*, *Semaprochilodus taenniurus* e *Microlepidogaster leucofrenatus*, entre outras. Já nas espécies do gênero *Triportheus*, o cromossomo Z é o maior do complemento, enquanto que o cromossomo W apresenta diferentes tamanhos entre as distintas espécies analisadas, mas sendo sempre menor que o Z. Em *Hypostomus* sp. o W corresponde ao menor cromossomo do complemento cariotípico. Ocorrências

idênticas são observadas em relação à heterogametia masculina. Assim, em *Pseudotocinclus tietensis*, o cromossomo Y é bem maior que o X, apresentando um grande bloco heterocromático, situação esta que se inverte em *Hoplias malabaricus*, onde o cromossomo X é maior que o Y, sendo este último o menor cromossomo do complemento cariotípico, com pouca heterocromatina. Outras situações de destaque podem ser observadas em alguns gêneros, como *Hypostumus* e *Eigenmannia*, onde o sexo heterogamético é o feminino (ZZ/ZW) em algumas espécies, ou masculino (XX/XY) em outras espécies. Além disso, sistemas de cromossomos sexuais distintos, como simples e múltiplos, podem também ser encontrados entre diferentes espécies de um mesmo gênero, como em *Hoplias* e *Eigenmannia* (Tabela 1).

A família Parodontidae está representada por 3 gêneros, *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*. Os 2 primeiros mostram uma ampla distribuição por quase todo continente Sul-americano, exceto do lado ocidental da Cordilheira dos Andes. Já o gênero *Saccodon* mostra uma distribuição mais restrita, somente ao norte do continente Sul-americano. Trata-se de um grupo com um pequeno número de espécies, quando comparado a outros grupos de Characiformes neotropicais. São peixes de pequeno porte, adaptados a ambientes de corredeiras de rios e pequenos riachos.

Estudos citogenéticos nessa família estão restritos a 7 espécies do gênero *Apareiodon* e a 4 do gênero *Parodon*, incluindo a espécie ora analisada. Quanto ao gênero *Saccodon*, nenhum estudo citogenético tem sido feito até o momento. Todas espécies desta família apresentam  $2n=54$  cromossomos. Dois distintos sistemas de cromossomos sexuais já foram descritos, um sistema múltiplo do tipo ZZ / Z W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>, em *Apareiodon affinis* (Moreira-Filho et al., 1980; Jesus et al., 1999; Jorge & Moreira-

Filho, 2000), e um sistema simples do tipo ZZ/ZW, em *Parodon hilarii* (Moreira-Filho et al. 1993; Jesus & Moreira-Filho, 2000). As NORs são conservadas, quanto ao número e localização cromossômica na maioria das espécies do gênero *Apareiodon* (Moreira-Filho et al., 1984). Já no gênero *Parodon*, as NORs tem se mostrado espécie específicas (Jesus & Moreira-Filho, 2000). Por outro lado, a ocorrência de cromossomo supranumerário já foi também relatado em *Apareiodon piracicabae* (Falcão et al., 1984). Como um todo estes estudos indicam, por um lado, uma conservação do número diplóide entre as diferentes espécies do grupo e, por outro lado, uma diversificação cariotípica quanto a outros caracteres cromossômicos.

O presente trabalho descreve um sistema ZZ/ZW, detectado em uma espécie ainda não descrita do gênero *Parodon*, abordando a sua caracterização, provável origem e evolução.

Tabela 1. Sistemas de cromossomos sexuais descritos em espécies de peixes neotropicais. **G** = coloração convencional com Giemsa; **C** = bandamento C; **M** = análise de meiose; **H** = hibridação in situ; **F** = fluorocromos; **B** = bandamento G e/ou R; **m** = macho; **f** = fêmea.

Famílias / Espécies	2n		Sistemas Cromossômicos	Tipo de Análise	Ref.
	f	m			
<b>ANOSTOMIDAE</b>					
<i>Leporinus elongates</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,F	14,15
<i>Leporinus obtusidens</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,F	14,15
<i>Leporinus reinhardti</i>	54	54	ZZ/ ZW	G,C,F	14,15
<i>Leporinus macrocephalus</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	15
<i>Leporinus trifasciatus</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,F	32,43
<i>Leporinus conirostris</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	43
<i>Leporinus cf. elongates</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,F	14
<i>Leporinus cf. brunneus</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,F	32
<b>CHARACIDAE</b>					
<i>Triportheus albus</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C	11
<i>Triportheus signatus</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C	11
<i>Triportheus elongatus</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C	11
<i>Triportheus cf. elongatus</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C,H,F	29,44
<i>Triportheus guentheri</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C,H,F	5,29,44
<i>Triportheus flavus</i>	52	52	ZZ/ZW	G,C	11
<i>Triportheus paranense</i> (MT)	52	52	ZZ/ZW	G,C,H,F	29,44
<i>Triportheus paranense</i> (MS)	52	52	ZZ/ZW	G,C,H,F	29,44
<i>Triportheus paranense</i> (Argentina)	52	52	ZZ/ZW	G,C	42
<b>GASTEROPELECIDAE</b>					
<i>Thoracocharax cf. stellatus</i>	52	52	ZZ-ZW	G,C	40
<b>CRENUCHIDAE</b>					
<i>Characidium cf. fasciatum</i>	50	50	ZZ/ZW	G,C	25
<i>Characidium gomesi</i>	50	50	ZZ/ZW	G,C	39
<b>ERYTHRINIDAE</b>					
<i>Erythrinus erythrinus</i>	52	51	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,M,C	50,51
<i>Hoplias cf. lacerdae</i> (rio Pardo)	50	50	XX/XY	G,C	6
<i>Hoplias cf. malabaricus</i> (V. R. Doce)	42	42	XX/XY	G,C,M,H,F,B	7,46

<i>Hoplias cf. malabaricus (rio Ribeira)</i>	42	42	XX/XY	G,M	7
<i>Hoplias cf. malabaricus</i>	40	39	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,C,M,B	8,9,45
<i>Hoplias cf. malabaricus</i>	40	41	XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	G,M	8
<b>PARODONTIDAE</b>					
<i>Apareiodon affinis</i>	55	54	ZZ/ZW <sub>1</sub> W <sub>2</sub>	G,C,F	17,48
<i>Parodon hilarii</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C,H,F,B	18,47
<i>Parodon sp.</i>	54	54	ZZ-ZW	G,C,H	41
<b>CURIMATIDAE</b>					
<i>Potamorhina squamoralevis</i>	102	102	ZZ/ZW	G,C	34
<b>PROCHILODONTIDAE</b>					
<i>Semaprochilodus taeniurus</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	12
<b>CHEIRODONTIDAE</b>					
<i>Cheirodon notomelas</i>	52	52	ZZ/ZW	G	33
<i>Cheirodon sp.</i>	52	52	ZZ/ZW	G	33
<i>Odontostilbe cf. microcephala</i>	52	52	ZZ/ZW	G	38
<b>LORICARIIDAE</b>					
<i>Hypostomus ancistroides</i>	68	68	XX/XY	G	16
<i>Hypostomus sp.</i>	64	64	ZZ/ZW	G,C	26
<i>Hypostomus macrops</i>	68	68	XX/XY	G	16
<i>Microlepdogaster leucofrenatus</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	4
<i>Microlepdogaster sp.</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	37
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	54	54	XX/XY	G,C	3
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	54	54	ZZ/ZW	G,C	27
<b>DORADIDAE</b>					
<i>Opsodoras sp.</i>	58	58	ZZ/ZW	G,C,F	31,32
<b>PIMELODIDAE</b>					
<i>Pimelodella sp.</i>	46	46	XX/XY	G	10
<b>STERNOPYGIDAE</b>					
<i>Eigenmannia virescens</i>	-	-	XX/XY	G,C	2
<i>Eigenmannia virescens</i>	38	38	ZZ/ZW	G,C	13
<i>Eigenmannia sp.</i>	32	31	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,C,M,F	1,49
<i>Brachyhypopomus pinnicaudatus</i>	-	-	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,C,H,F	36
<i>Hypopomus sp.</i>	42	41	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,C	28

**CYPRINODONTIDAE**

Espécies mexicanas anônimas	48	47	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,M	22
-----------------------------	----	----	--	-----	----

**GOBIIDAE**

<i>Awaous strigatus</i>	46	45	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,C	30
-------------------------	----	----	--	-----	----

**GOODEIDAE**

Espécies mexicanas anônimas	48	47	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,M	23
-----------------------------	----	----	--	-----	----

**POECILIDADE**

<i>Poecilia reticulata</i>	46	46	XX/XY	G,C,H	19
----------------------------	----	----	-------	-------	----

<i>Gambusia puncticulata</i>	48	48	ZZ/ZW	G,M	21
------------------------------	----	----	-------	-----	----

**ELEOTRIDIDAE**

<i>Dormitador maculatus</i>	48	48	XX/XY	G,M	20
-----------------------------	----	----	-------	-----	----

**CLUPEIDAE**

<i>Brevortia áurea</i>	46	45	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	G,M	24
------------------------	----	----	--	-----	----

Ref.: 1. Almeida-Toledo et al., (1984); 2. Almeida-Toledo et al., (1988); 3. Andreatta et al., (1992); 4. Andreatta et al., (1993); 5. Bertollo & Carvalho (1992); 6. Bertollo et al., (1978); 7. Bertollo et al., (1979); 8. Bertollo et al., (1983); 9. Bertollo et al., (1997); 10. Dias & Foresti (1993); 11. Falcão (1988); 12. Feldberg et al., (1987); 13. Foresti (1987); 14. Molina et al., (1998); 15. Galetti Jr. & Foresti (1986); 16. Michele et al., (1977); 17. Moreira-Filho et al., (1980); 18. Moreira-Filho et al., (1993); 19. Nanda et al., (1990); 20. Oliveira & Almeida-Toledo (1985); 21. Rab (1984); 22. Uyeno & Miler (1971); 23. Uyeno & Miler (1972); 24. Brum et al., (1992); 25. Maistro et al., (1998); 26. Artoni et al., (1998); 27. Scavone & Julio Jr. (1995); 28. Almeida-Toledo et al., (1995); 29. Artoni et al., (2001); 30. Souza et al., (1998); 31. Venere & Galetti Jr. (1998); 32. Venere (1998); 33. Nishiyama & Martins-Santos (1996); 34. Navarrete & Julio Jr. (1996); 35. Molina et al., (1996); 36. Almeida-Toledo et al., (1998); 37. Andreatta et al., (1999); 38. Sato & Martins-Santos (1999); 39. Centofante et al., (2001); 40. Carvalho (2001); 41. (presente estudo), 42. Sánchez et al., (1999); 43. Galetti Jr. et al., (1995); 44. Artoni (1999); 45. Bertollo & Mestriner (1998); 46. Born & Bertollo (2000); 47. Vicente (2001); 48. Jesus (1996); Jesus et al., (2000) 49. Almeida-Toledo et al., (2000); 50. Molina & Bertollo (1993); 51. Silvestro & Margarido (2001).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos cromossômicos foram realizados em duas espécies do gênero *Parodon*, uma delas representando uma nova espécie, ainda não descrita taxonomicamente, aqui denominada *Parodon* sp., e uma outra espécie identificada como *Parodon tortuosus* Eigenmann & Norris, 1900. Ambas espécies foram coletadas em condição de simpatria e sintopia, no córrego Paiol Grande (município de São Bento do Sapucaí, Estado de São Paulo–Brasil). Os exemplares encontram-se depositados no Museu de Zoologia do Rio de Janeiro (lote: MNRJ21446).

Foram analisadas 348 metáfases de *Parodon* sp. (12 espécimes: 8 fêmeas e 4 machos) e 780 metáfases de *Parodon tortuosus* (30 espécimes: 18 fêmeas e 12 machos).

As preparações para obtenção de cromossomos mitóticos seguiram a técnica descrita por Bertollo et al., (1978). Para a detecção de heterocromatina constitutiva utilizou-se o método descrito por Sumner (1972), com algumas adaptações para uma análise seqüencial (Giemsa convencional/bandamento C) sugerido por Centofante (2000). A localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) seguiu a técnica descrita por Howell & Black (1980). Para hibridação fluorescente “*in situ*” (FISH) utilizou-se o protocolo baseado em Pinkel et al., (1986), utilizando-se (1) sonda de DNA satélite pPh2004 (200 pb), clonado a partir do DNA genômico de *Parodon hilarii* (Vicente, 2001), (2) sonda de DNAr 18S, obtida por PCR usando os primers NS1 e NS2 (Vicente, 2001) e (3) sonda de DNAr 5S, obtida de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999). A morfologia dos cromossomos foi estabelecida a partir da razão de braços, conforme proposto por Levan et al., (1964).

## RESULTADOS

*Parodon* sp. (Fig. 1a), apresentou um número diplóide igual a 54 cromossomos meta-submetacêntricos e número fundamental igual a 108, para ambos os sexos, sendo o cariótipo organizado em ordem decrescente de tamanho. Os machos apresentam 27 pares de cromossomos meta-submetacêntricos, enquanto que as fêmeas apresentam 26 pares meta-submetacêntricos, mais um cromossomo metacêntrico grande e um submetacêntrico de tamanho médio, ambos sem homólogos (Fig. 2). Dessa maneira, pôde-se visualizar um heteromorfismo cromossômico em relação ao sexo, com heterogametia feminina. O cromossomo metacêntrico grande, semelhante em tamanho ao primeiro par do complemento, corresponde ao cromossomo W em um sistema sexual do tipo ZZ/ZW. O cromossomo Z é caracterizado pelo submetacêntrico médio, correspondente ao cromossomo 6, o qual se apresenta como um par de homólogos nos machos e um único cromossomo nas fêmeas (Fig. 2).

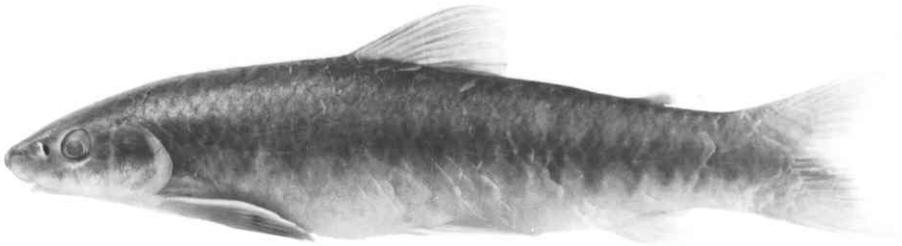
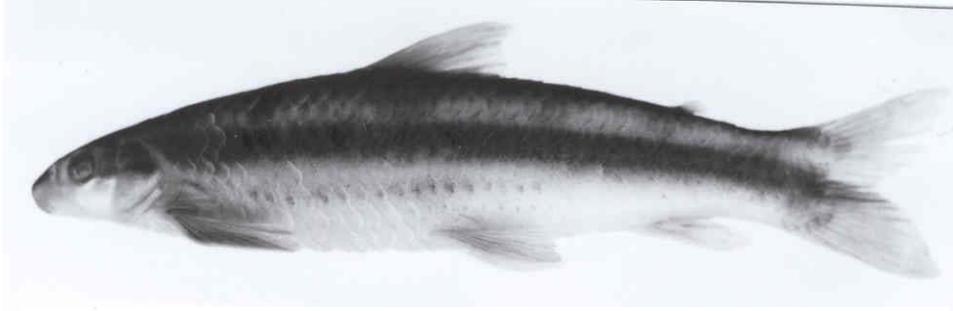
As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs), estão localizadas em um único par cromossômico submetacêntrico médio (par 15), na região terminal do braço longo (Fig. 2, box). A hibridação "*in situ*" (FISH), com DNAr 18S, confirmou os resultados observados com as Ag-NORs (Fig. 3a). Da mesma forma, a hibridação com sonda de DNAr 5S evidenciou apenas um par de cromossomos portadores desses cistrons, localizados no braço menor de um submetacêntrico de tamanho médio (Fig. 3b).

A análise da distribuição da heterocromatina mostra que o cromossomo Z possui uma região heterocromática conspícua terminal no braço longo, ao lado de uma marcação discreta no braço curto. Por sua vez, o cromossomo W evidencia um bloco terminal também conspícuo no braço curto, enquanto o braço longo encontra-

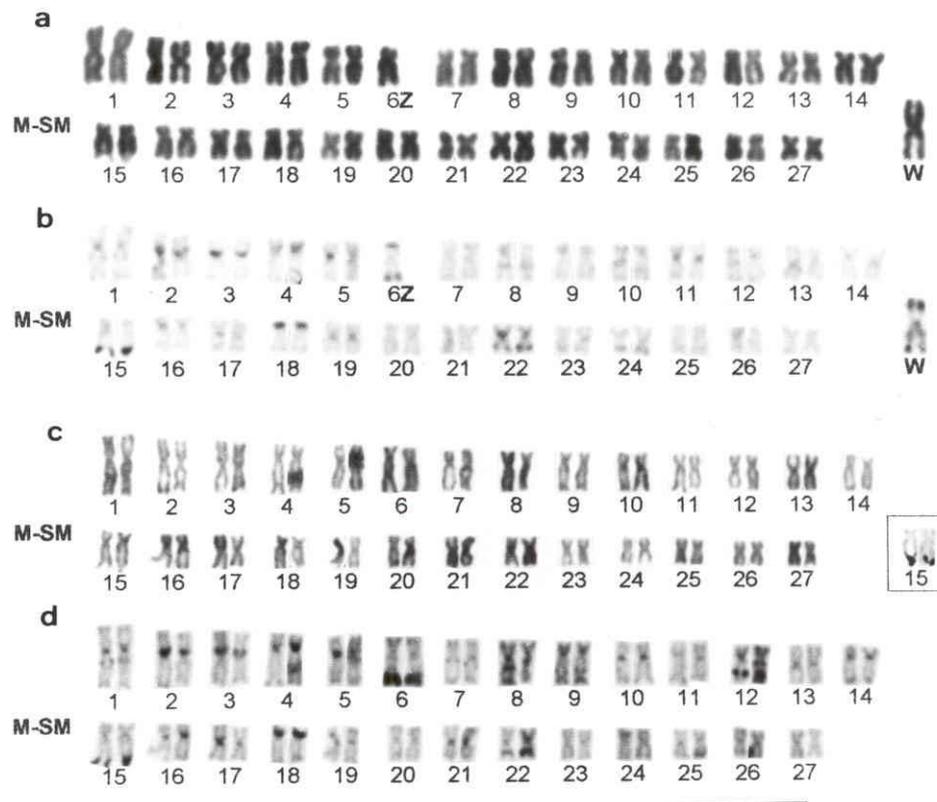
se totalmente heterocromático, porém evidenciando uma heterocromatina mais pálida em relação àquela presente no braço curto. Bandas C+ também ocorrem na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, além de algumas marcações mais conspícuas nos pares 2, 3, 4, 8, 12, 15, 18 e 22. No par 15, os blocos heterocromáticos terminais no braço longo são coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolos (Fig. 2b, d). A hibridação *in situ* com a sonda de DNA satélite pPh2004 mostrou que a heterocromatina localizada na região terminal do braço maior do cromossomo Z e na região terminal do braço menor do cromossomo W é composta por esta família de DNA repetitivo, bem como regiões pontuais observadas em outros dois pares de cromossomos metacêntricos pequenos (Fig. 3 c, d).

*Parodon tortuosus* (Fig. 1b) também apresentou um número diplóide igual a  $2n=54$  cromossomos, sendo 48 cromossomos meta-submetacêntricos e 6 cromossomos subtelocêntricos, com um número fundamental igual a 108. Nesta espécie não foi observado heteromorfismo cromossômico sexual (Fig. 4a).

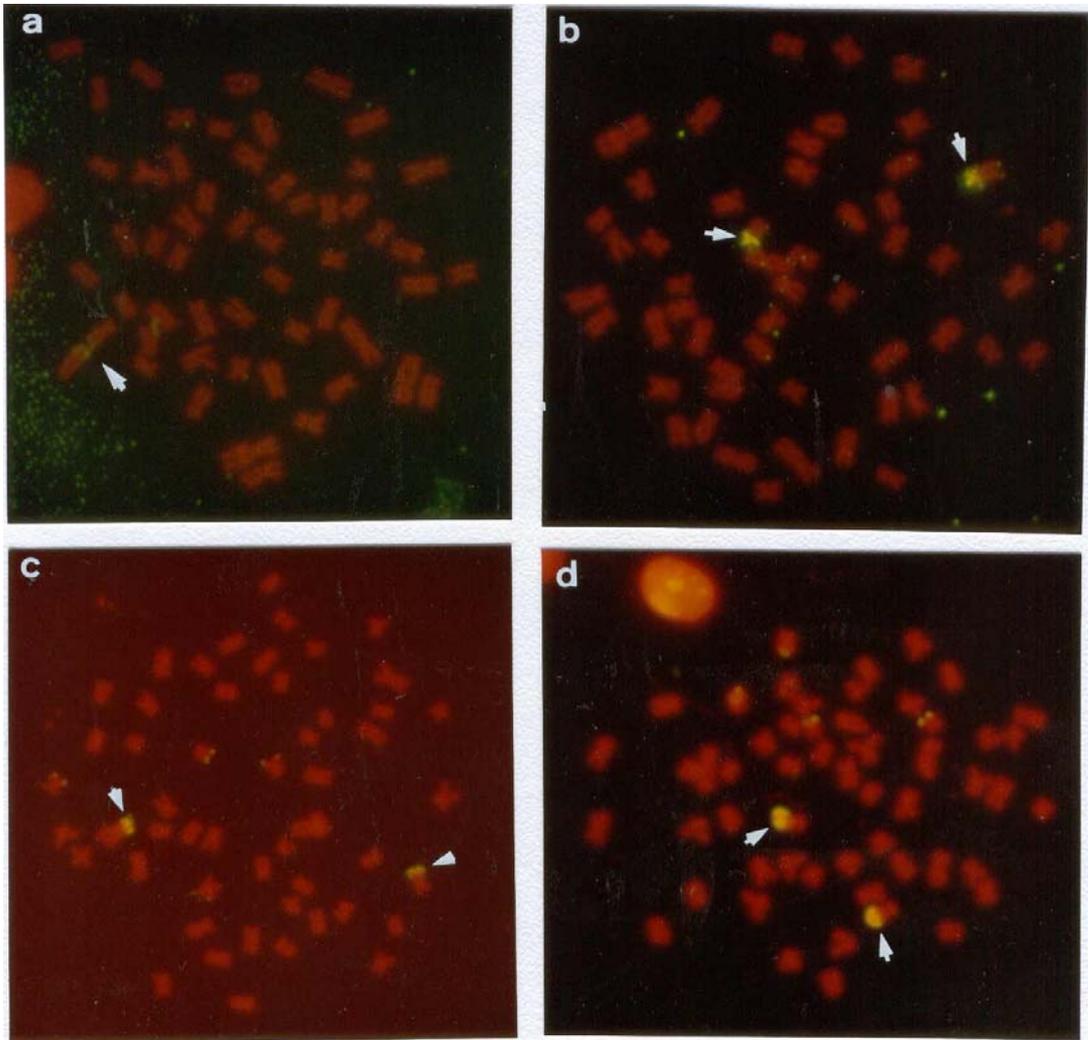
As regiões organizadoras de nucléolos são também do tipo simples, localizadas na região terminal do braço longo do par subtelocêntrico 25 (Fig. 4, box). A heterocromatina constitutiva está localizada na região pericentromérica de vários pares do cariótipo, destacando-se também outras bandas mais conspícuas nos pares cromossômicos 1, 3, 4, 12, 13, 14, 25, 26 e 27, coincidindo com as Ag-NORs no par 25 (Fig. 4b).



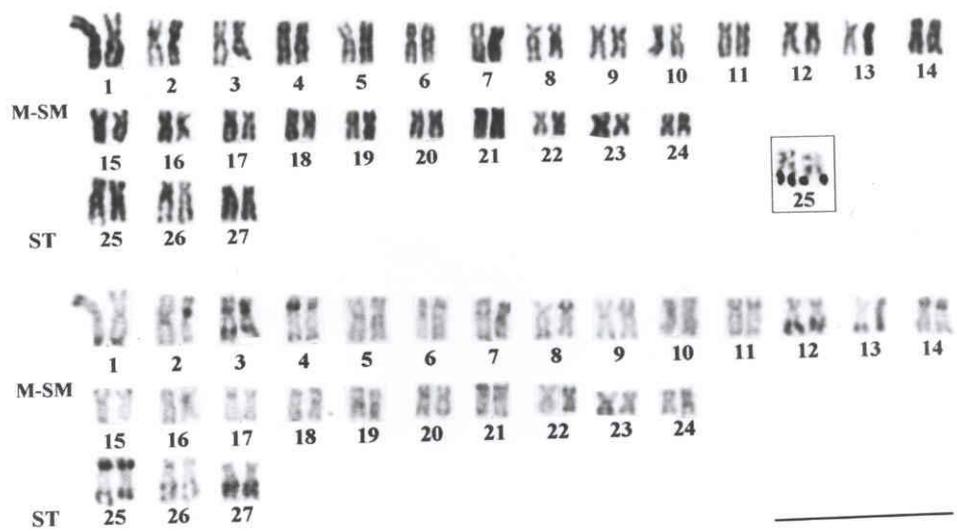
**Fig. 1.** (a) *Parodon* sp, 120mm SL; (b) *Parodon tortuosus*, 110mm SL; (MNRJ 21446).



**Fig. 2.** Cariótipo de *Parodon* sp., fêmea (a,b) e macho (c,d) com coloração convencional Giemsa (a,c) e bandamento-C (b,d). Em destaque o par 15 portador de Ag-NOR. A barra equivale 5 $\mu$ m.



**Fig. 3.** hibridação “*in situ*” (FISH) em *Parodon* sp. mostrando (a) 18S rDNA, (b) 5S rDNA, DNA satellite Pph2004 em fêmea (c) e em macho (d).



**Fig. 4.** Cariótipo de *Parodon tortuosus* com coloração convencional Giemsa (a) e banda-C (b). Em destaque o par 25 portador da Ag-NOR. A barra equivale 5µm.

## DISCUSSÃO

Exemplos de ocorrência de simpatria e sintopia entre espécimes cariotipicamente divergentes e morfologicamente semelhantes, sem a presença de formas híbridas, já foram relatados para alguns grupos de peixes neotropicais, como nos gêneros *Bryconamericus* (Wasko et al., 1996), *Hoplias* (Bertollo et al., 2000) e *Synbranchus marmoratus* (Torres, 2000). Estes casos sugerem que as diferenças cromossômicas podem ter contribuído significativamente para um isolamento reprodutivo, permitindo hoje a coexistência destas distintas formas, em um mesmo ambiente. Na família Parodontidae, casos de simpatria e sintopia também já foram descritos no gênero *Apareiodon* (Sazima, 1980; Moreira-Filho et al., 1985). Entretanto, para o gênero *Parodon*, nenhuma ocorrência anterior a este trabalho já havia sido registrada.

Diferenças morfológicas puderam ser observadas entre as duas espécies ora estudadas. As mais marcantes são a forma e a intensidade de coloração da faixa principal sobre a linha lateral, ou sobre a série de escamas imediatamente acima desta linha. Em *Parodon* sp., esta faixa apresenta-se escura e regular, prolongando-se sobre o pedúnculo caudal até a extremidade distal dos raios caudais medianos. Em *P. tortuosus*, essa faixa apresenta-se com projeções alternadamente oblíquas, conferindo-lhe um aspecto de zigue-zague (Fig. 1). Ressalta-se também que *P. tortuosus* representa a única espécie deste gênero até então conhecida na bacia do Alto Paraná. Embora as duas espécies possuam o mesmo número diplóide ( $2n=54$ ) e o mesmo número fundamental ( $NF=108$ ), algumas diferenças cariotípicas podem ser assinaladas. Assim sendo, *Parodon* sp. evidencia cromossomos apenas meta-submetacêntricos, enquanto que *P. tortuosus*, além destes dois tipos, apresenta também cromossomos subtelocêntricos. Os sítios ribossômicos em *Parodon* sp.

localizam-se no par submetacêntrico 15, enquanto que em *P. tortuosus* estes sítios estão localizados no par subteloentrico 25. Os padrões de bandamento C também mostram diferenças, com um menor número de regiões marcadas em *Parodon* sp. comparativamente a *P. tortuosus*. No entanto, a diferença mais marcante entre os complementos cariotípicos destas duas espécies refere-se à presença do sistema cromossômico sexual ZZ/ZW em *Parodon* sp. e a sua ausência em *P. tortuosus* (Figs. 2 e 4).

A diferenciação do cromossomo W em *Parodon* sp. pode ter ocorrido através de um processo de heterocromatinização, iniciada a partir do segmento heterocromático discreto presente no braço curto de um cromossomo W ancestral, provavelmente similar ao Z (par 6, nos machos). O prosseguimento da heterocromatinização deve ter possibilitado o aumento de tamanho deste braço, com a consequente diferenciação do braço longo do atual cromossomo W, heterocromático. Por sua vez, o padrão de bandas C e as marcações com a sonda de DNA satélite utilizado (pPh2004), apresenta uma clara correspondência entre as bandas teloméricas situadas no braço longo do cromossomo Z e no braço curto do cromossomos W, reforçando a hipótese de um cromossomo W ancestral homólogo ao Z. Tal hipótese foi também utilizada por Vicente (2001), para explicar a origem de um mesmo tipo de sistema cromossômico presente em uma outra espécie desse mesmo gênero, *P. hilarii*. Assim sendo, sugerimos que o processo de heterocromatinização, que deu origem ao sistema ZZ/ZW nestas 2 espécies, seja idêntico. Por sua vez, a região heterocromática do cromossomo W, marcada com a sonda de DNA satélite, corresponde à apenas parte dos segmentos heterocromáticos desse cromossomo, demonstra a existência de distintas famílias de DNA repetitivo. Coincidentemente, a heterocromatina presente no braço longo do

cromossomo W também se diferencia pelo próprio grau de coloração apresentada, mostrando-se como uma região bem mais clara do que o segmento heterocromático presente no braço curto desse cromossomo.

Estudos anteriores, com outras espécies da família Parodontidae (Moreira-Filho et al., 1985; Jesus & Moreira-Filho, 2000; Vicente, 2001), demonstram a constância de tamanho do 1º par cromossômico no cariótipo dessas espécies. Estes dados também servem como parâmetros comparativos entre o sistema ZZ/ZW de *P. hilarii* e *Parodon* sp. Em *P. hilarii* o cromossomo W é do tipo subtelocêntrico, apresentando um tamanho cerca de 30% maior quando comparado ao 1º par do complemento cariotípico, enquanto que o cromossomo W de *Parodon* sp. é metacêntrico, com tamanho similar ao do 1º par do cariótipo. Além disso, *Parodon hilarii* evidencia uma quantidade maior de DNA satélite presente no cariótipo, com regiões de hibridação evidentes em mais seis pares cromossômicos, além dos cromossomos sexuais (Vicente, 2001). Tal fato não ocorre em *Parodon* sp. uma vez que, além dos cromossomos sexuais, ocorrem hibridações pontuais em apenas 2 pares de cromossomos. Outras diferenças cariotípicas entre estas duas espécies podem ser encontradas na Tabela 2. Por outro lado, a única semelhança observada refere-se ao número e localização da Ag-NORs, situadas no mesmo par de cromossomos.

Entre os peixes neotropicais podem ser encontrados distintos sistemas de cromossomos sexuais (Tabela 1), mesmo entre espécies de uma mesma família, como em Parodontidae (Moreira-Filho et al., 1993), ou até mesmo entre espécies de um mesmo gênero, como em *Hoplias* (Bertollo et al., 2000), *Eigenmannia* (Almeida-Toledo et al., 1984), *Characidium* (Maistro et al., 1998; Centofante et al., 2001). Para a família Parodontidae dois diferentes sistemas de cromossomos sexuais já foram

descritos. O primeiro, em *Apareiodon affinis*, corresponde a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>, possivelmente originado através de rearranjos cromossômicos (Moreira-Filho et al., 1980; Jesus et al., 1999; Jorge & Moreira-Filho, 2000). O segundo, correspondente ao sistema ZZ/ZW, que deve ter se originado a partir de um processo de heterocromatinização, estando presente em *P. hilarii* (Moreira-Filho et al., 1993; Jesus et al., 2000; Vicente, 2001) e em *Parodon* sp. (presente trabalho). A diversidade e possíveis origens desses sistemas nos peixes neotropicais já foram anteriormente relacionadas à distribuição geográfica das espécies e a eventos geomorfológicos no continente Sul-americano, (Moreira-Filho et al., 1980; Bertollo et al., 2000; Almeida-Toledo et al., 2000; Artoni et al., 2001; Centofante et al., 2001).

Embora o presente trabalho tenha como enfoque principal uma análise citogenética, algumas semelhanças morfológicas puderam ser observadas entre *Parodon* sp. e *P. pongoensis* Allen, 1942 (localidade tipo: pongo de Manseriche, Peru). *Parodon pongoensis* (citado como *Parodon* sp.), do rio Araguaia (Brasil), já foi estudado cromossomicamente por Jesus & Moreira-Filho (2000), sendo recentemente melhor identificado a partir de uma revisão taxonômica da família Parodontidae (Pavanelli, 1999). No entanto, ao lado das similaridades, destacam-se também evidentes diferenças entre essas duas espécies. Essas análises morfológicas estão sendo efetuadas em conjunto com especialistas da área de taxonomia, para uma caracterização mais precisa de *Parodon* sp. e sua conseqüente denominação específica. Entretanto, os dados citogenéticos já mostram diferenças acentuadas entre essas espécies em relação à estrutura cromossômica, à localização das regiões organizadoras de nucléolos (par 2 em *Parodon pongoensis* e par 15 em *Parodon* sp.) e à ocorrência de um sistema de

cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Parodon* sp. e sua ausência em *P. pongoensis* (Tabela 2). Adiciona-se a isso as diferenças quanto à distribuição geográfica: *Parodon* sp. parece restrita a um segmento nordeste da bacia do Alto Paraná, enquanto *P. pongoensis*, segundo Pavanelli (1999), está presente nos rios da bacia Amazônica, ficando assim caracterizado um isolamento geográfico acentuado entre estas espécies.

Os resultados ora obtidos, evidenciando características cromossômicas exclusivas nessa espécie provisoriamente denominada *Parodon* sp., comparativamente às demais espécies do gênero *Parodon*, em adição à condição de simpatria e sintopia detectada no local de coleta com *P. tortuosus*, sem a detecção de formas híbridas, concluímos que *Parodon* sp. trata-se de uma nova espécie para este gênero, a qual deverá ser futuramente descrita seguindo as normas convencionais da taxonomia, após o término das análises morfológicas que se encontram em andamento nesse grupo.

Tabela 2. Espécies de *Parodon* estudadas e suas localidades. Estados Brasileiros: MG = Minas Gerais, SP = São Paulo, MT = Mato Grosso; Tipos cromossômicos: M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtlocêntrico; CS= cromossomos sexuais; NOR = regiões organizadoras de nucléolos; T = terminal; R = referências bibliográficas.

<b>Espécies</b>	<b>Cariótipo</b>	<b>CS</b>	<b>NOR</b>	<b>Bacia Hidrográfica</b>	<b>R</b>
<i>P. hilarii</i>	54 M-SM	ZZ/ZW	Par 15 (T)	São Francisco - MG	1-2
<i>P. pongoensis</i>	50 M-SM+4 ST	-	Par 2 (T)	Médio Araguaia - MT	3
<i>P. tortuosus</i>	48 M-SM+6 ST	-	Par 25 (T)	Alto Paraná - SP	4-5
<i>Parodon</i> sp.	54 M-SM	ZZ/ZW	Par 15 (T)	Alto Paraná - SP	6

1- Moreira-Filho et al., (1993); 2- Jesus & Moreira-Filho (2000); 3- Jesus & Moreira-Filho (2000); 4-Moreira-Filho et al., (1985); 5- Jesus & Moreira-Filho (2000); 6- Presente trabalho.

**Agradecimentos:** Os autores são gratos ao Dr. Paulo A. Backup e MsC. Filipe A. G. de Mello ( Museu Nacional do Rio de Janeiro) pela identificação taxonômica dos espécimes. Ao CNPq e a FAPESP (Proc. 01/00713-0) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Almeida-Toledo, L. F., Daniel-Silva, M. F. Z., Lopes, C. E. & Toledo-Filho, S. A. (2000). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an  $X_1X_2Y$  sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome. Res.*, 8:335-340.
- Almeida-Toledo L. F., Daniel-Silva M. F. Z., Foresti, F. & Toledo-Filho, S. A. (1998). Hibridação "in situ" com sonda telomérica (TTAGGG) e coloração por fluorocromos dos cromossomos sexuais de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Pisces, Gymnotiformes). In: *Res. 44<sup>o</sup> Cong. Nac. Genét.*, p.59.
- Almeida-Toledo L. F., Daniel M. F. Z., Foresti, F. & Toledo-Filho, S. A. (1995). Sistema de cromossomos sexuais com heterogametia masculina do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  em *Hypopomus* sp (Gymnotoidei, Hypopomidae). *Brazil. J. Genet.* (Supl): 465.
- Almeida-Toledo, L. F., Viegas-Piequignot, E., Foresti, F., Toledo-Filho, S. A. & Dutrillaux, B. (1988). BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 48: 117-120.
- Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F. & Toledo-Filho, S. A. (1984). Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces) Gymnotyformes). *Genetica*, 64: 165-169.
- Andreatta, A. A., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999). Evidência da ocorrência de um sistema cromossômico de determinação sexual em *Microlepdogaster* sp. (Pisces, Loricariidae, Hypoptomatinae). *Genet. Mol. Biol.* (Supl): 22(3) p. 67.
- Andreatta, A. A., Almeida-Toledo, L. F., Oliveira, C. & Toledo-Filho, S. A. (1993). Chromosome studies in Hypoptomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW Sex chromosome system, B chromosomes and constitutive

- heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63: 215-220.
- Andreato, A. A., Almeida-Toledo, L. F., Oliveira, C. & Toledo-Filho, S. A. (1992). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, 57: 369-372.
- 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. Res.* 9(6): 449-456.
- Artoni, R. F. (1999). *Citogenética do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero Triportheus (Pisces, Characidae)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- 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.
- 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. & Mestriner, C. A. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analysis. *Chromosome Res.*, 6: 141-147.
- Bertollo, L. A. C., Fontes, M. S., Fenocchio, A. S. & Cano, J. (1997). The X1X2Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res.*, 5: 493-499.

- Bertollo, L. A. C. & Cavallaro, Z. I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 60: 60-63.
- Bertollo L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1983). Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, 48: 1-12.
- Bertollo L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.*, II (1): 17-37.
- Bertollo L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 1: 103-120.
- 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.
- Brum, M. J. I., Galetti jr., P. M., Corrêa, M. M. O. & Aguilar, C. T. (1992). Multiple sex chromosomes in South Atlantic fish, *Brevortia aurea* (Clupeidae). *Brazil. J. Genet.*, 15(3): 547-553.
- Carvalho, M. L. (2001) *Avaliação do conteúdo de DNA nuclear em células de peixes Characiformes da região Neotropical*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.
- 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 a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*, 55(3): 253-260.

- Centofante, L. (2000). *Análise cariotípica no “complexo” Serrasalmus spilopleura (Characiformes, Serrasalmidae) da bacia Amazônica central*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, AM, Brasil.
- Cestari, A. N. (1973). Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. In Azevedo, J.L. de e Costa, S.O.P. da org. *Exercícios Práticos de Genética*: 29-31. Editora da Universidade de São Paulo, SP.
- Chen, T. R. (1969). Karyological heterogamety of deep-sea fishes. *Postilla* (Yale University), 130:1-29.
- Dias, A. L. & Foresti, F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazil. J. Genet.*, 16(3): 585-600.
- Falcão, J. N. (1988). *Caracterização cariotípica em peixes do gênero Triportheus (Teleostei, Characiformes, Characidae)*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Falcão, J. N., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1984) An additional chromosome in two fish species. *Brazil. J. Genet.* 1: 109-118.
- Feldberg, L., Bertollo, L. A. C., Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F. & Moreira-Filho, O. (1987). Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome*, 29:1-4.
- Foresti, F. (1987). *Estudos cromossômicos em Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi)*. Tese de Livre Docência. Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil.

- Galetti Jr., P. M., Lima, N. R. W. & Venere, P. C. (1995). A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia*, 60: 375-382.
- Galetti Jr., P. M. & Foresti, F. (1987). Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) and their relationships in the phylogeny of the group. *Brazil. J. Genet.*, 1: 135-140.
- 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.
- Jesus C. M. & Moreira-Filho O., (2000). Karyotypes of species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwater*, 11 (1): 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. (1996). *Contribuições aos estudos citogenéticos da família Parodontidae (Pisces, Characiformes)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, Brasil.
- Jorge, L. C. & Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosome and polymorphism. *Genetica*, 49: 1-7.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Maistro, E. L., Mata, E. P., Oliveira, C. & Foresti, F. (1998). Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex chromosome system and supernumerary chromosomes in

- Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*, 104: 1-7.
- Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5s rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363-367.
- Michelle, J. L., Takahashi, C. S. & Ferrari, I. (1977). Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*. 42: 539-546.
- Molina, W. F., Schimid, M. & Galetti Jr., P. M. (1998). Heterochromatin and sex chromosomes in neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios*, 94: 141-149.
- Molina, W. F., Margarido, V. P. & Galetti Jr., P. M. (1996). Triploidia natural e variação cromossômica estrutural em *Leporinus* Tipo *elongatus* (Pisces, Anostomidae). *VI Simp. Cit. Evol. Aplic. Peixes Neot.*, Resumos. p.53.
- Molina, W. F. & Bertollo, L.A.C. (1993). Cromossomos sexuais múltiplos em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae). *XXIV Congr. Argent. Genet.* p.126.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. & Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46 (2-3): 115-125.
- 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. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26: 564-568.

- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. & Galetti Jr., P. M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosomes system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 33: 83-91.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schimid, M., Schroder, J. H., Zischler, H. & Epplen, J. F. (1990). Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in guppy fish. *J. Mol. Evol.*, 30: 456-462.
- Navarrete, M. C. & Julio, Jr., H. F. (1996). Polimorfismo cromossômico e cromossomos sexuais em Curimatídeos do pantanal Sul-Matogrossense (Characiformes). *VI Simp. Cit. Evol. Aplic. Peixes Neot.*, Resumos. p. 57.
- Nishiyama, P. B. & Martins-Sanots, I. C. (1996). Provável mecanismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW em duas espécies do gênero *Cheirodon* (Pisces, Cheirodontinae) do rio Paraná. *VI Simp. Cit. Evol. Aplic. Peixes Neot.*, Resumos. p.26.
- Ohno, S. (1974). Sex chromosomes and sex determining mechanisms. *Animal Cytog.*, 4: 46-63.
- Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L. F. (1985). Caracterização cromossômica e regiões organizadoras de nucléolos de *Dormitador maculatus* (Bloch, 1790) (Perciformes, Eleotridae). *XII Cong. Brasil. Zool.*, Resumos. pp. 174-175.
- Pavanelli, C. S. (1999). *Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi: Characiformes)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Pinkel, A. M., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetics analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83: 2934-2938.

- Rab, P. (1984). Chromosome study of four poeciliid fishes from Cuba. *Folia Zool.*, 33: 229-234.
- Sánchez, S. & Jorge, L.C. (1999). A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus *Triportheus* (Pisces, Triporthinae). *Cytologia*, 64:395-400.
- Sato, L. R. and Martins-Santos, I. C. (1999). Análise citogenética em *Odontostilbe cf. microcephala* (Pisces, Cheirodontinae) do rio Paraná. *Genet. Mol. Biol. (Supl.)*, 22(3) p81.
- Sazima, I. (1980). Behavior of two brazilian species of parodontid fishes, *Apareiodon piracicabae* and *A. ibitiensis*. *Copeia* 1, 166-169.
- Scavone, M. D. & Julio Jr., H. F. (1995). Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae, Siluriformes). *Brazil. J. Genet.*, 18(1): 31-35.
- Silvestro, M. & Margarido, V.P. (2001). Sistema de cromossomos sexuais X1X1X2X2/X1X2Y em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae) do alto Paraná, com a descrição de cromossomos supranumerários restritos ao sexo feminino. In: Congresso Nacional de Genética, 47.,2001, Águas de Lindóia. *Anais...*[S.I.]: Tec Art, 2001. 1 CD.
- Souza, I. L., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1998). Contribuição citogenética em Gobiidae. *VII Simp. Cit. Evol. Aplic. Peixes Neot.*, Resumos, p.26.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.
- Torres, R. A. (2000). O gênero *Synbranchus* (Pisces, Synbranchinae, Synbranchidae): inter-relações citotaxonômicas, evolutivas e natureza da variabilidade cariotípica. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

- Uyeno, T. & Miller, R. R. (1972). Second discovery of multiple sex chromosome among fishes. *Experientia*, 28: 223- 225.
- Uyeno, T. & Miller, R. R. (1971). Multiple sex chromosomes in mexican cyprinodontid fish. *Nature*, 231: 452-453.
- Venere, P. C. (1998). *Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysa)*. Tese Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Venere, P. C. & Galetti Jr., P. M. (1998). Cromossomos sexuais em *Opsodoras* sp (Siluriformes, Doradidae) do médio rio Araguaia. *VII Simp. Cit. Evol. Aplic. Peixes Neot.*, Resumos. p.10.
- Vicente, V. E. (2001). *Estudos citogenéticos e moleculares em Parodon hilarii e correlações em outras espécies da família Parodontidae (Pisces, Characiformes)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Wasko, A. P., Venere, P. C. & Galetti Jr., P.M. (1996). Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Brazil. J. Genet.*, 19(2): 225-230.

## CAPÍTULO IV

### **CORRELAÇÃO DE CARACTERES CROMOSSÔMICOS E MORFOLÓGICOS EM DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE).**

Centofante, L., Bertollo, L. A. C., Justi, A. J. & Moreira-Filho, O. (2003). Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Pisces, Characidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 14(4): 361-368.

## RESUMO

Foi realizado um estudo citogenético comparativo em duas espécies alopátricas de *Astyanax* provenientes das bacias hidrográficas do rio Paraíba do Sul e do rio Paraná (Brasil). Ambas as formas apresentaram o mesmo número diplóide,  $2n=48$ , mas diferentes quanto à fórmula cariotípica, número fundamental e padrão de bandamento-C e Ag-NOR. Uma das formas, *A. parahybae*, foi recentemente promovida de subespécie para a categoria de espécie, enquanto a outra permanece, a priori, agrupada ao complexo *A. fasciatus*. Esta posição sistemática é corroborada pelas diferenças cromossômicas encontradas no presente estudo.

## ABSTRACT

A comparative cytogenetic study was carried out in two allopatric species of *Astyanax*, from the Paraíba do Sul and Paraná river basins (Brazil). Both forms have a same diploid number,  $2n=48$ , but differ in karyotypic formula, fundamental number, C-banding and Ag-NOR pattern. One of these forms, *Astyanax parahybae*, was recently promoted from subspecies to a species rank, while the other belongs to the *Astyanax fasciatus* species complex. This systematic position is corroborated by the chromosomal differences found in the present study.

## INTRODUÇÃO

*Astyanax* é um gênero relativamente comum, pertencente à subfamília Tetragonopterinae (Characidae), com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde a Argentina até a fronteira México-Estados Unidos (Britski, 1972). É composto por peixes de pequeno porte, conhecidos vulgarmente por “lambaris ou piabas”, caracterizados por uma linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a mais interna apresentando 5 dentes, e nadadeira caudal nua, com escamas apenas na base (Britski et al., 1988).

Eigenmann (1921) considerou 74 espécies e subespécies neotropicais pertencentes a esse gênero. No entanto, Garutti (1998) considera aproximadamente 100 espécies e subespécies nominais. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (Melo, 2001). De fato, Eigenmann (1921) já postulava que *“in southeastern Brazil, Astyanax fasciatus is found associated in the same rivers with A. taeniatus and its variations and with A. scabripinnis and its varieties. While in any particular stream, it is comparatively easy to distinguish between them, each undergoes so many modifications in different rivers that it is not possible to give a clear definition that will distinguish the species when specimens from all rivers are considered”*.

A espécie *Astyanax fasciatus* foi descrita por Cuvier (1819), embora não se conheça, com precisão, a localidade de origem do exemplar tipo, a qual é mencionada como “rios do Brasil”. Além disso, diferenças e/ou variações morfológicas podem ser encontradas em exemplares de distintos sistemas hidrográficos ou até mesmo de diferentes tributários de uma mesma bacia hidrográfica. Este é, por exemplo, o caso já constatado por Vanzolini et al., (1964),

analisando as proporções corporais de espécimes dos rios Mogi-Guaçu e Corumbataí, pertencentes à bacia do rio Paraná.

Eigenmann (1921) reconheceu 6 subespécies, *A. fasciatus fasciatus*, *A. fasciatus parahybae*, *A. fasciatus heterurus*, *A. fasciatus jequitinhonhae*, *A. fasciatus macrophthalmus* e *A. fasciatus aeneus*. Melo (2001), em uma revisão taxonômica de *Astyanax* na bacia do rio Paraíba do Sul, promoveu a subespécie *A. fasciatus parahybae* para a categoria de espécie. *A. parahybae* possui série de escamas interpoladas acima da nadadeira anal (Fig. 2), além de possuir de 29 a 32 raios na nadadeira anal (Melo, 2001), características estas que separam *A. parahybae* das demais formas pertencentes ao grupo *A. fasciatus*.

As análises citogenéticas em *Astyanax* evidenciam uma diversidade cariotípica acentuada, compreendida entre  $2n=36$  a  $2n=50$  cromossomos (Jim & Toledo, 1975; Foresti et al., 1977; Morelli et al., 1983; Paganelli, 1990; Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Justi, 1993; Fauaz et al., 1994; entre outros). Algumas espécies como *A. altiparanae* (citado como *A. bimaculatus*), apresentam uma estabilidade cariotípica inter-populacional, com um número diplóide igual a  $2n=50$  cromossomos para populações provenientes de diferentes bacias hidrográficas (Paganelli, 1990). No entanto, outras espécies mostram uma variação no número diplóide. Em *A. scabripinnis*, por exemplo, o número diplóide varia de  $2n=46$  a  $2n=50$  cromossomos entre distintas populações (Moreira-Filho & Bertollo, 1991).

Para *A. fasciatus* os dados cromossômicos demonstram uma diversidade numérica (Tabela 1). Este fato tornou claro as dificuldades para uma determinação mais precisa do “status” dessa espécie. Justi (1993), após análise de populações provenientes de diferentes locais, onde cada uma delas pôde ser caracterizada por um cariótipo particular, com diferenças no número diplóide e na fórmula cariotípica,

propôs que *A. fasciatus* corresponderia a um complexo de espécies. Esta proposta também tem sido suportada por estudos morfológicos (Garuti & Britski, 2000; Melo, 2001).

O presente trabalho mostra um estudo citogenético comparativo entre duas formas alopátricas de *Astyanax*, uma delas considerada como pertencente ao grupo *A. fasciatus*, da bacia do rio Paraná, e a outra reconhecida como *A. parahybae*, da bacia do rio Paraíba do Sul, sendo abordados aspectos ligados à diferenciação cromossômica e isolados geográficos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram analisadas 674 células de 26 espécimes de *Astyanax parahybae* (14 fêmeas e 12 machos), provenientes do rio Paraibuna (23°23'13"S 45°40'20"W), pertencente à bacia do rio Paraíba do Sul (Fig. 1 e 2a), e 420 células de 12 espécimes de *Astyanax fasciatus* (7 fêmeas e 5 machos), provenientes do rio Paiol Grande (22°40'34"S 45°41'00"W), pertencente à bacia do Rio Paraná (Fig. 1 e 2b). Os espécimes foram classificados e depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro, com os números de identificação MNRJ23225 e MNRJ23224 respectivamente.

As preparações de cromossomos mitóticos seguiram a técnica descrita por Bertollo et al., (1978). Para a análise da heterocromatina constitutiva utilizou-se o método descrito por Sumner (1972). As regiões organizadoras de nucléolos foram localizadas pela impregnação cromossômica com nitrato de prata (Ag-NORs), segundo Howell & Black (1980). A morfologia dos cromossomos foi determinada conforme a razão de braços (Levan et al., 1964). Os cromossomos foram arranjados em grupos de metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtlocêntricos (ST) e

acrocêntricos (A) e organizados em ordem decrescente de tamanho. O número de braços cromossômicos ou número fundamental (NF) foram fixados considerando cromossomos M, SM e ST com dois braços e cromossomos A com apenas um braço.

## RESULTADOS

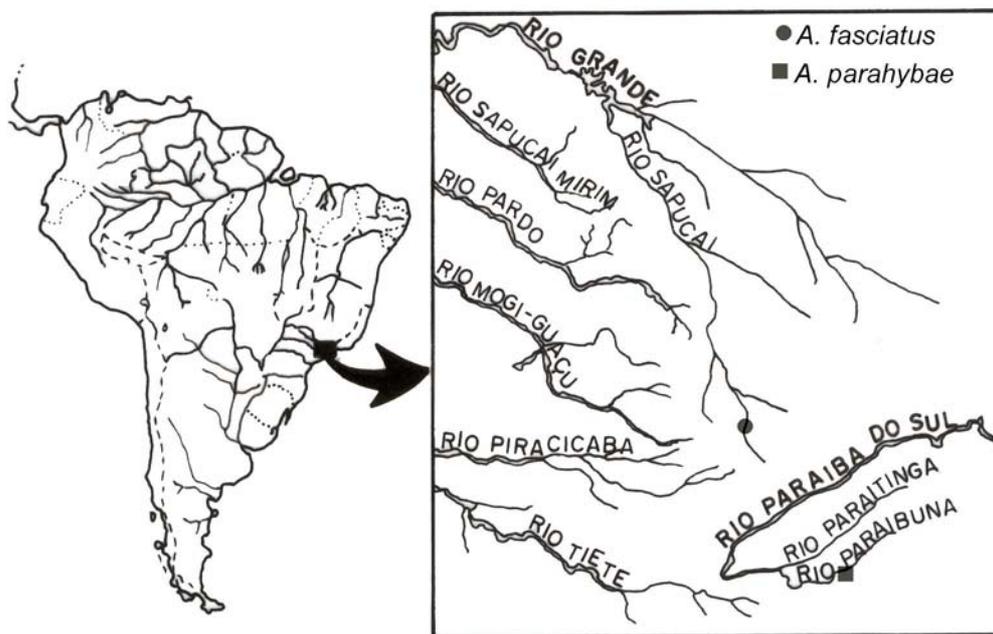
*Astyanax paraguayae* apresentou  $2n=48$  cromossomos, sendo 4 pares M, 9 pares SM, 6 pares ST e 5 pares A, com um NF igual a 86 (Fig. 3a). Não foi observado nenhum heteromorfismo cromossômico entre machos e fêmeas. A heterocromatina constitutiva está presente na região pericentromérica de todos os cromossomos, assim como na região telomérica de alguns poucos pares do cariótipo, destacando-se um bloco heterocromático conspícuo no braço menor do par metacêntrico número 3 (Fig. 3b). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) são múltiplas, variando de 1 a 6, sendo 3 o número cromossômico mais freqüentemente marcado pelo nitrato de prata (Fig. 3a - box).

*Astyanax fasciatus* apresentou  $2n=48$  cromossomos, sendo 4 pares M, 11 pares SM, 6 pares ST e 3 pares A, com um NF igual a 90 (Fig. 4a). Nesta espécie também não foi observado nenhum heteromorfismo cromossômico entre os sexos. A heterocromatina constitutiva concentra-se nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, destacando-se alguns blocos heterocromáticos teloméricos no braço curto dos pares 6 e 9 e no braço longo dos pares 10, 17, 18, 19, 22, 23 e 24 (Fig. 4b). As Ag-NORs caracterizam-se como do tipo simples, ou seja, apenas um par cromossômico evidenciando tais regiões, presentes na região telomérica do braço curto do par 9, coincidindo com um segmento heterocromático (Fig. 4a - box).

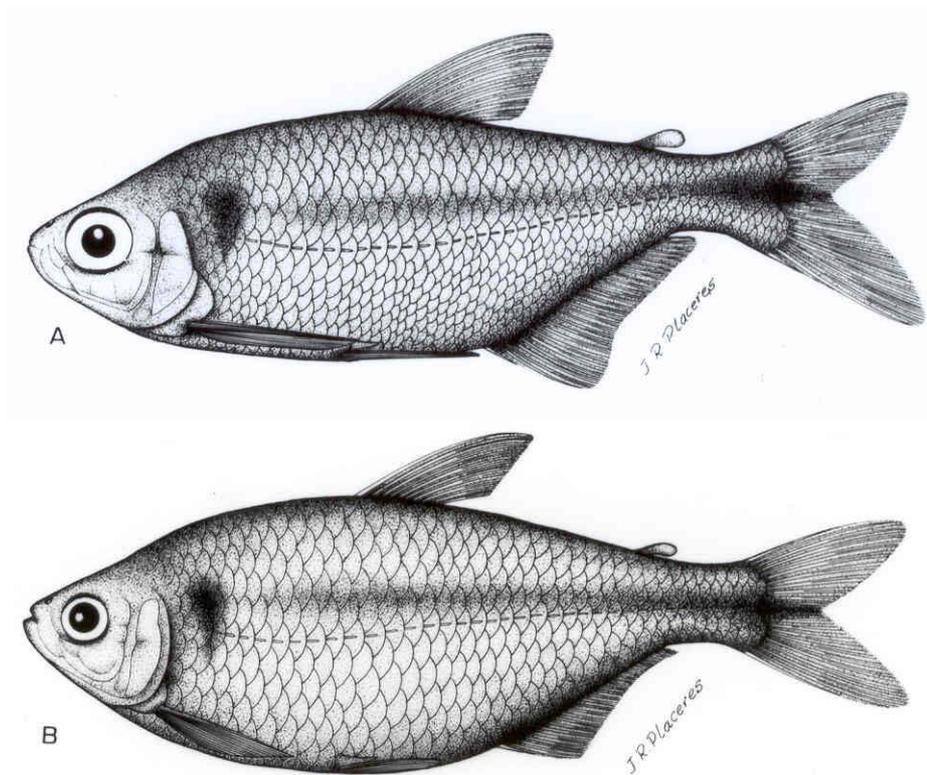
Tabela 1: Números diplóides (2n) por localidades de coleta de populações do complexo *Astyanax fasciatus*.

Espécies como originalmente descritas	Rios/Bacias hidrográficas	2n	Ref.
<i>A. fasciatus</i>	Rio Mogi Guaçu – Bacia do Paraná	45	4
<i>A. fasciatus</i>	Rio Mogi Guaçu – Bacia do Paraná	46	2,3,7,9,14
<i>A. fasciatus</i>	Rio Mogi Guaçu – Bacia do Paraná	47	4,14
<i>A. fasciatus</i>	Rio Mogi Guaçu – Bacia do Paraná	48	14
<i>A. fasciatus</i>	Rio Tietê – Bacia do Paraná	46	6
<i>A. fasciatus</i>	Córrego Paiol Grande- Bacia do Paraná	48	7,18
<i>A. fasciatus</i>	Rio Barra Funda – Bacia do Paraná	46	7
<i>A. fasciatus</i>	Rio Passa Cinco – Bacia do Paraná	46	7,14
<i>A. fasciatus</i>	Rio Paranapanema – Bacia do Paraná	46	8
<i>A. fasciatus</i>	Rio Paranapanema – Bacia do Paraná	50	12
<i>A. fasciatus</i>	Rio Sapucaí – Bacia do Paraná	48	10
<i>A. fasciatus</i>	Rio Araguari – Bacia do Paraná	46	11
<i>A. fasciatus</i>	Rio Piracicaba – Bacia do Paraná	48	13
<i>A. cf. fasciatus</i>	Rio Claro – Bacia do Paraná	48	16
<i>A. cf. fasciatus</i>	Rio Claro – Bacia do Paraná	50	16
<i>A. fasciatus</i>	Rio Juquiá – Bacia do Ribeira	48	2
<i>A. fasciatus</i>	Rio Paraíba – Bacia do Paraíba do Sul	48	5,6,7
<i>A. fasciatus parahybae</i>	Rio Paraibuna – Bacia do Paraíba do Sul	48	17
<i>A. fasciatus</i>	Rio São Francisco – Bacia do São Francisco	48	6
<i>A. fasciatus</i>	Rio São Francisco – Bacia do São Francisco	48	7,13
<i>A. fasciatus</i>	Rio São Francisco – Bacia do São Francisco	46	13
<i>A. fasciatus</i>	Rio Meia Ponte - Bacia Araguaia-Tocantins	46	1
<i>A. aff. fasciatus</i>	Córrego Fundo – Bacia Araguaia-Tocantins	50	15

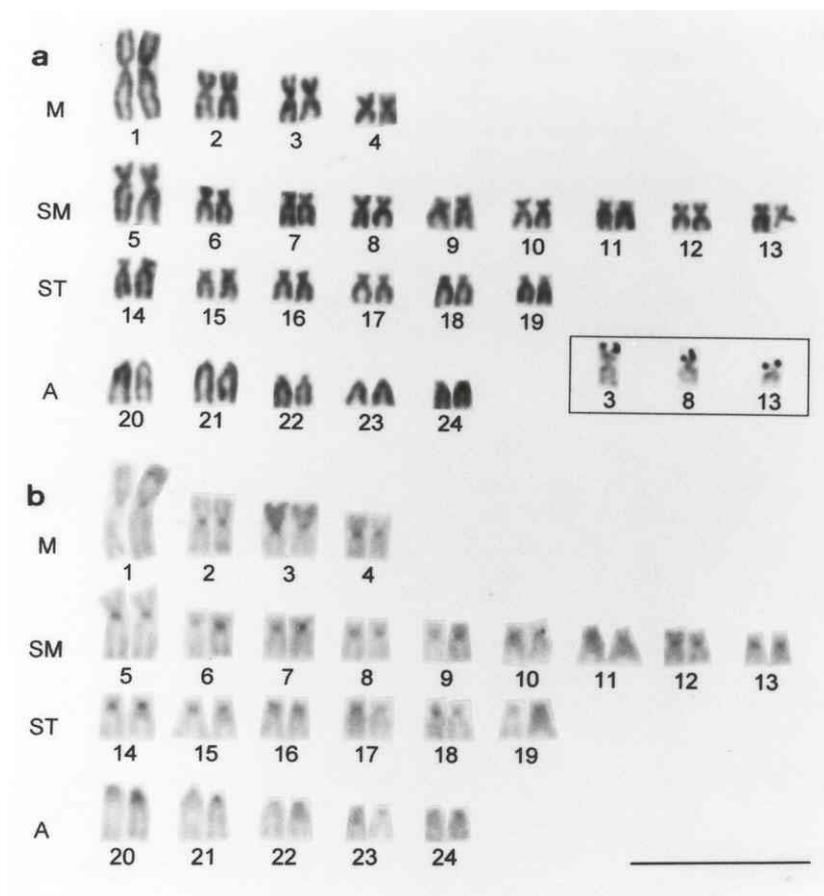
Referencias: 1- Jim & Toledo, 1975; 2- Morelli et al., 1983; 3- Paganelli, 1990; 4- Daniel & Almeida-Toledo, 1995; 5- Moreira-Filho & Bertollo, 1986; 6- Justi et al., 1990; 7- Heras & Moreira-Filho, 1996; 8- Reganhan & Giuliano-Caetano, 1990; 9- Daniel-Silva, 1996; 10- Swerts et al., 1998; 11- Torres-Mariano & Morelli, 2000; 12- Vale & Martins-Santos, 1999; 13- Justi, 1993; 14- Heras & Moreira-Filho, 1997; 15- Centofante & Vênere, 1995; 16- Malacrida et al., 2000; 17- Presente estudo.



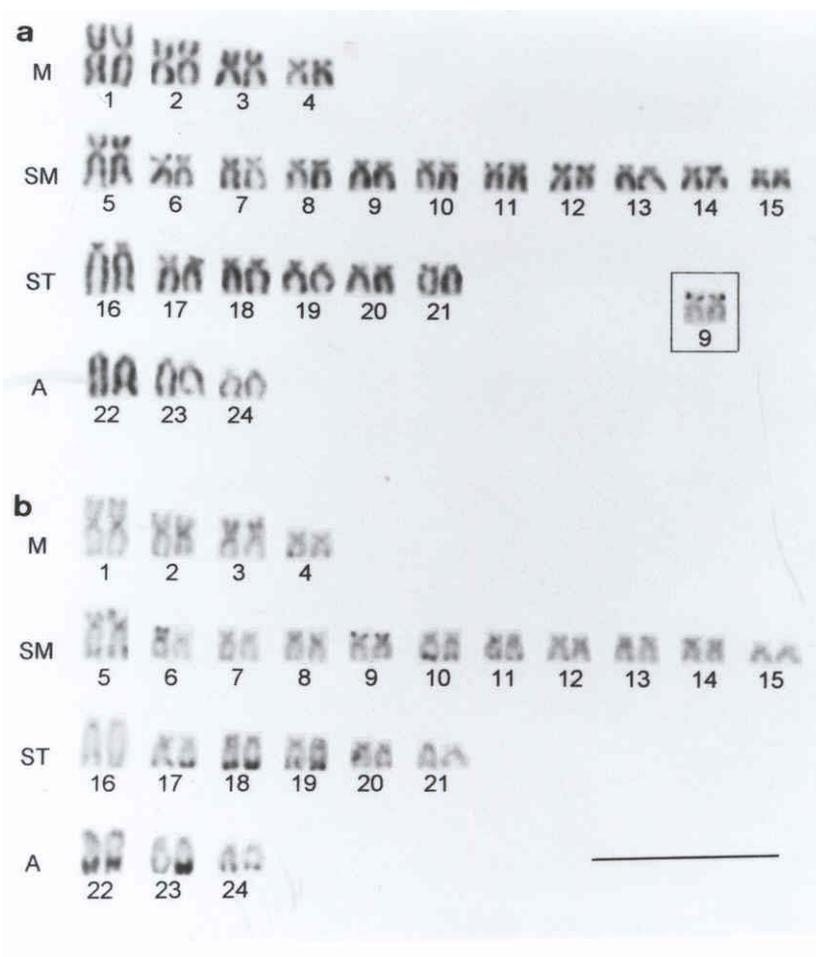
**Fig. 1.** Mapa indicando as bacias hidrográficas e os locais de coletas de *Astyanax parahybae* e *Astyanax fasciatus*.



**Fig. 2.** Desenho esquemático dos exemplares de *Astyanax paraguayae* (a) e *Astyanax fasciatus* (b), comparando a disposição das escamas abaixo da linha lateral.



**Fig. 3.** Cariótipo de *Astyanax paraguayae* com coloração convencional Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores de sítios ribossômicos (Ag-NORs). A barra corresponde 5µm.



**Fig. 4.** Cariótipo de *Astyanax fasciatus* com coloração convencional Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores de sítios ribossômicos (Ag-NORs). A barra corresponde 5um.

## DISCUSSÃO

Os primeiros estudos no gênero *Astyanax*, utilizando conjuntamente dados morfológicos e citogenéticos para a caracterização de possíveis espécies crípticas, foram realizados por Moreira-Filho & Bertollo (1991), em diferentes populações de *Astyanax scabripinnis*. Neste caso, os dados morfológicos foram suficientes para diferenciar algumas populações, enquanto algumas outras foram caracterizadas pelos dados citogenéticos e, ainda outras, tanto pelos dados morfológicos como cariotípicos. Logo após, seguiram-se outros estudos com essa mesma abordagem em novas populações de *A. scabripinnis* (Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Maistro et al., 1998).

*Astyanax parahybae* e *Astyanax fasciatus*, estudados no presente trabalho, possuem o mesmo número diplóide (48 cromossomos), mas diferem quanto à fórmula cariotípica e ao número fundamental (NF=86 e 90, respectivamente). Por sua vez, o padrão de bandas C e das regiões organizadoras de nucléolos também diferem nas duas espécies. Enquanto que *A. parahybae* apresenta apenas um par cromossômico portador de blocos heterocromáticos mais conspícuos e de 1 a 6 sítios de Ag-NORs, *A. fasciatus* apresenta 9 pares de cromossomos portadores de blocos heterocromáticos teloméricos conspícuos e apenas um par cromossômico portador de sítios de Ag-NORs. Assim sendo, rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos estariam possivelmente implicados na diferenciação cariotípica destas espécies, o que pode ter sido facilitado pelo isolamento geográfico, propiciando a fixação independente destes rearranjos. Estes caracteres cromossômicos, sendo exclusivos, são também perfeitamente diagnósticos para a caracterização e diferenciação dessas duas espécies distintas de *Astyanax*.

As Ag-NORs vem sendo usadas como um importante marcador cromossômico em peixes. O número e sua localização nos cromossomos permite a diferenciação de gêneros, espécies ou populações, como pôde ser verificado em *Leporinus* (Galetti Jr. et al., 1984), Cyprinidae (Amemiya & Gold, 1990), *Eigenmannia* (Almeida-Toledo et al., 1996), *Plagioscion* (Feldberg et al., 1999), Parodontidae (Jesus & Moreira-Filho, 2000). Por outro lado, as NORs também podem ser usadas em estudos filogenéticos como em Salmonidae (Phillips et al., 1989) e em Cyprinidae (Jenkin & Gold, 1992). Em *Astyanax scabripinnis*, um grupo formado por um provável complexo de espécies (Moreira-Filho & Bertollho, 1991), heterocromatina constitutiva e as Ag-NORs possibilitaram a diferenciação de várias populações (Souza & Moreira-Filho, 1995; Maistro et al., 1998; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Mantovani et al., 2000).

*A. fasciatus* apresenta uma diversidade cromossômica em populações de uma mesma bacia e entre bacias hidrográficas distintas (tabela 1). Cinco citótipos já foram encontrados considerando o número diplóide ( $2n=45, 46, 47, 48$  e  $50$ ). O citótipo  $2n=48$  é o de maior distribuição e observado nas bacias dos rios Paraíba do Sul, Ribeira, Paraná e São Francisco. O citótipo  $2n=46$  ocorre em vários afluentes da bacia do rio Paraná, bem como nas bacias do rio São Francisco e Araguaia-Tocantins. O citótipo  $2n=50$  está presente nas bacias do rio Paraná e do Araguaia-Tocantins. Foi observado também a ocorrência dos citótipos com números diplóides  $2n=45, 46, 47$  e  $48$  em simpatria no rio Mogi-Guaçu (bacia do rio Paraná). Além dos citótipos diferenciados pelo número diplóide, podem ser caracterizados outros quando comparado à fórmula cariotípica e os padrões de banda-C e Ag-NORs, como pôde ser observado nas espécies analisadas no presente estudo.

Os dados citogenéticos aqui apresentados reforçam a hipótese que *Astyanax fasciatus* corresponde a um complexo de espécies (Justi, 1993; Garuti & Britski, 2000; Melo, 2001), bem como corrobora com a proposta de Melo (2001), que eleva a subespécie *A. fasciatus parahybae* ao rank de espécie, *A. parahybae*.

**Agradecimentos:** Os autores são gratos ao Dr. Paulo A. Buckup e MsC. Filipe A. G. de Mello ( Museu Nacional do Rio de Janeiro) pela identificação taxonômica dos espécimes. Ao CNPq e a FAPESP (Proc. 01/00713-0) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Amemiya, C. T. & Gold, J. R. (1990). Chromosomal NOR phenotypes of seven species of North American Cyprinidae with comments on cystosystematic relationships of the *Notropis volucellus* species-group, *Opsopoeodus emiliae* and the genus *Pteronotropis*. *Copeia*, 1: 68-78.
- Almeida-Toledo, L. F., Stocker, A. J., Foresti, F. & S. Toledo-Filho, A. (1996). Fluorescence in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chrom. Res.*, 4: 301-305.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.*, 1: 103-120.
- Britski, H. A. (1972). Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, São Paulo, CIBPU, p. 79-108.
- Britski, H. A., Sato, Y. & Rosa A. B. S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco). CODEVASF, 3 ed., Minas Gerais, 115p.
- Centofante, L. & Vênere P. C. (1995). Descrição dos cariótipos e das RONS de três espécies de peixes do gênero *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) do Médio Araguaia. In: *Anais do 41º Congresso Nacional de Genética*, Caxambu, MG, Brazil, p. 455.

- Cuvier, G. L. C. F. D. (1819). Sur les poissons du sous-genre Hydrocyn, sur deux nouvelles especes de Serrasalmus, et sus l'Argentina glossodonta Forkahl, qui est l'Albula gonorhynchus de bloch. *Mem. Mus. Hist. Nat. Paris*, 5: 351-379.
- Daniel-Silva, M. F. Z. (1996). *Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero Astyanax (Pisces, Characidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, SP.
- Daniel, M. F. Z. & Almeida-Toledo, L. F. (1995). Variantes cromossômicas em *Astyanax fasciatus* do rio Mogi Guaçu. In: *Anais do 41º Congresso Nacional de Genética*, Caxambu, MG, Brazil, p. 451.
- Eigenmann, C. H. (1921). The americam characidae. *Mem. Mus. Comp. Zool.*, 43 (3): 227-310.
- Fauaz, G., Vicente, V. E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazil. J. Genet.*, 17 (2): 157-163.
- Feldberg, E., Porto, J. I. R., Santos, E. B. P. & Valentim, F. C. S. (1999). Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the central Amazon. *Genet. Mol. Biol.*, 22(3): 351-356.
- Foresti, F., Toledo-Filho, S. A. & Ribeiro, A. F. (1977). Estudos cromossômicos e genético-bioquímicos em *Astyanax* (Pisces, Characidae). In: *Anais Congresso Latino Americano de Genética*, Montevideo, Uruguai, p.28.
- Galetti Jr., P. M., Foresti, F., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (1984). Characterization of eigth species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the base of nucleolar organizing region. *Caryologia*, 37(4): 401-406.
- Garutti, V. (1998). Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. *Iheringia, Ser. Zool.*, 85: 115-122.

- Garuti, V. & Britski, H. A. (2000). Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. PUCRS*, Porto Alegre, 13: 65-88.
- Heras, M. P. & Moreira-Filho, O. (1996). Novos dados sobre a variabilidade cariotípica de *Astyanax fasciatus* ( Pisces, Characidae). In: *Anais do VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos, SP, Brazil, p.10.
- Heras, M. P. & Moreira-Filho, O. (1997). Diversidade cariotípica de *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) no Alto Paraná. In: *Anais do 43<sup>o</sup> Congresso Nacional de Genética*, Goiânia, GO, Brazil, p.99.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Jenkin, J. D. & Gold, J. R. (1992). Chromosomal NOR phenotypes of 2 species of north american cyprinid fishes (Cyprinidae, Teleostei). *Tex J. Sci.*, 44(2): 241-245.
- Jesus, C. M. & Moreira-Filho, O. (2000). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 11(1): 75-80.
- Jim, S. N. & Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciênc. Cult.*, 27 (10): 1122-1124.
- Justi, A. J. (1993). *Caracterização cariotípica de populações de Astyanax fasciatus, Cuvier 1819, (Pisces, Characidae) de três bacias hidrográficas*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

- Justi, A. J., Moreira-Filho, O., Salvador, L. B. & Galetti Jr., P. M. (1990). Caracterização citogenética de três populações do complexo *fasciatus* (Characiformes, Characidae). In: *Anais do III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Botucatu, SP, Brazil, p.11.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Maistro, E. L., Oliveira, C. & Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Mol. Biol.*, 21 (2): 201-206.
- Malacrida, A. C. P., Shibatta, O. A. & Giuliano-Caetano, L. (2000). Análise cromossômica de *Astyanax cf. fasciatus* (Pisces, Characidae) coletado no rio Claro-Tamarana e ribeirão dos Apertados, PR. In: *Anais do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Manaus, AM, Brazil, p. 49.
- 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.
- Melo, F. A. G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro*, 59: 1-46.
- Mizoguchi, S. M. H. N. & Martins-Santos, I. (1998). Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, 21 (1): 55-61.

- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1986). Estudo cariotípico nos grupos *fasciatus* e *scabripinnis* (Teleostei, Characiformes, Characidae). In: *Anais do Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos, SP, Brazil, p. 50.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazil. J. Genet.*, 14 (2): 331-357.
- Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Toledo-Filho, S. A. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia*, 36 (3): 235-244.
- Paganelli, H. H. (1990). Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus*, Linnaeus 1759. Considerações citotaxonômicas e evolutivas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 120 pp.
- Phillips, R. B., Pleyte, K. A., Ert, L. M. V. & Hartley, S. E. (1989). Evolution of nucleolar organizer regions and ribosomal RNA genes in *Salvelinus*. *Physiol. Ecol. Japan Spec.*, 1: 429-447.
- Reganhan, C. M. & Giuliano-Caetano, L. (1990). Estudo citogenético da espécie *Astyanax fasciatus* coletada no ribeirão Três Bocas – Londrina, PR. In: *Anais do III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Botucatu, SP, Brazil, p.12.
- Souza, I. L. & Moreira-Filho, O. (1995). Cytogenetics diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60: 1-14.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technic for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.

- Swerts, C. P., Castro, G. C., Maistro, E. L., Foresti, F. & Oliveira, C. (1998). Análises citogenéticas preliminares na espécie *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: *Anais 44º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP, Brazil, p. 66.
- Torres-Mariano, A. R. & Morelli, S. (2000). Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) do rio Araguaí – Uberlândia, MG. In: *Anais do 46º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP, Brazil, p.62.
- Vale, J. D. & Martins-Santos, I. C. (1999). Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes) da bacia do rio Paranapanema. In: *Anais do 45º Congresso Nacional de Genética*, Gramado, RS, Brazil, p. 95.
- Vanzolini, P. E., Rebouças, R. & Britski, H. (1964). Caracteres morfológicos de reconhecimento específico em três espécies simpátricas de lambaris do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Pap. Av. Zool.*, São Paulo, SP, 16 (27): 267-299.

## CAPÍTULO V

### DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS DE *Hyphessobrycon anisitsi* (PISCES, TETRAGONOPTERINAE).

Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Miyazawa, C.S. & Moreira-Filho, O. (2003).  
Chromosomal differentiation in allopatric population of *Hyphessobrycon anisitsi*  
(Pisces, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 68(3): 283-288.

## RESUMO

São apresentados, pela primeira vez, dados cromossômicos de *Hyphessobrycon anisitsi*, referentes a duas populações de bacias hidrográficas adjacentes (bacia do Alto Paraná e bacia do Paraíba do Sul), separadas pela Serra da Mantiqueira (divisor de águas). O número cromossômico e a fórmula cariotípica foi o mesmo para ambas populações. Contudo, foi possível diagnosticar cada uma delas pela localização dos sítios ribossômicos, utilizando-se a impregnação por nitrato de prata (Ag-NORs) e a hibridação *in situ* com sondas de rDNA 18S e 5S. São discutidos alguns aspectos relacionados a isolados geográficos e diferenciação cromossômica.

## ABSTRACT

Chromosomal data of *Hyphessobrycon anisitsi* are presented for the first time, comprising two populations from adjacent hydrographical basins (Upper Paraná basin and Paraíba do Sul basin), separated by Mantiqueira Hills (water divisor). The same diploid number and karyotype formula were observed in both populations. However, after silver nitrate staining (Ag-NORs) and fluorescent *in situ* hybridization with 18S rDNA and 5S rDNA probes, it was possible to identify each population by the location of ribosomal sites. Some aspects related to geographical isolates and chromosomal differentiation are approached.

## INTRODUÇÃO

Os Tetragonopterinae são considerados o grupo mais antigo entre os peixes Characidae (Eigenmann, 1917). São formados por espécies de pequeno porte, que apresentam um considerado grau de endemismo e uma elevada taxa de especiação, encontradas na América do Sul e América Central (Bohlke et al., 1978). É um grupo considerado artificial pelos problemas taxonômicos e filogenéticos que apresenta (Lucena, 1993).

*Hyphessobrycon* é um dos maiores gêneros dessa família, com cerca de 90 espécies nominais, em geral não ultrapassando 60 mm de comprimento (Lima & Gerhard, 2001). São caracterizados por uma linha lateral interrompida e os lobos da nadadeira caudal desprovidos de escamas (Britski, 1972). Muitas das suas espécies apresentam um colorido particular, despertando um grande interesse para a aquarofilia.

Muito pouco se conhece sobre a citogenética dos *Hyphesobrycon* visto que poucas espécies já foram cariotipadas, sendo geralmente citado apenas o número cromossômico haplóide (Scheel, 1973). Contudo, o número cromossômico é variável entre as espécies, de  $2n=46$  a  $2n=52$ , com uma maior frequência observada para  $2n=48$  e  $2n=50$  (Scheel, 1973; Arefjev, 1990; presente trabalho).

No presente estudo são apresentados, pela primeira vez, dados cromossômicos de *Hyphesobrycon anisitsi*, sendo consideradas duas populações alopátricas, provenientes de bacias hidrográficas adjacentes e separadas por um divisor de águas (Serra da Mantiqueira). Aspectos relacionados à alopatria e evolução cromossômica são discutidos no decorrer do trabalho.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 640 metáfases de *Hyphessobrycon anisitsi* (16 fêmeas e 13 machos) provenientes do rio Piracuama, afluente do rio Paraíba do Sul (22°43'18"S e 45°40'16"W) e 490 metáfases de *Hyphessobrycon anisitsi* (12 fêmeas e 8 machos) provenientes do ribeirão das Perdizes, afluente do rio Sapucaí, pertencente à bacia do Alto Paraná (22°44'43"S e 45°34'07"W). Os exemplares foram classificados e depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro, com os números de identificação MNRJ22205 e MNRJ22206, respectivamente.

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas segundo a técnica descrita por Bertollo et al., (1978). Para a localização da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foram utilizada as metodologias de Sumner (1972) e Howell & Black (1980), respectivamente, com pequenas modificações. Os bandamentos seqüenciais seguiram as sugestões propostas por Centofante et al., (2002). A localização cromossômica dos sítios de rDNA 18S e 5S foi obtida pela hibridação fluorescente "in situ" (FISH), conforme Pinkel et al. (1986), utilizando-se sonda de rDNA 18S, obtida de *Parodon hilarii* (Vicente 2001) e de rDNA 5S, obtida de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a razão de braços (Levan et al., 1964).

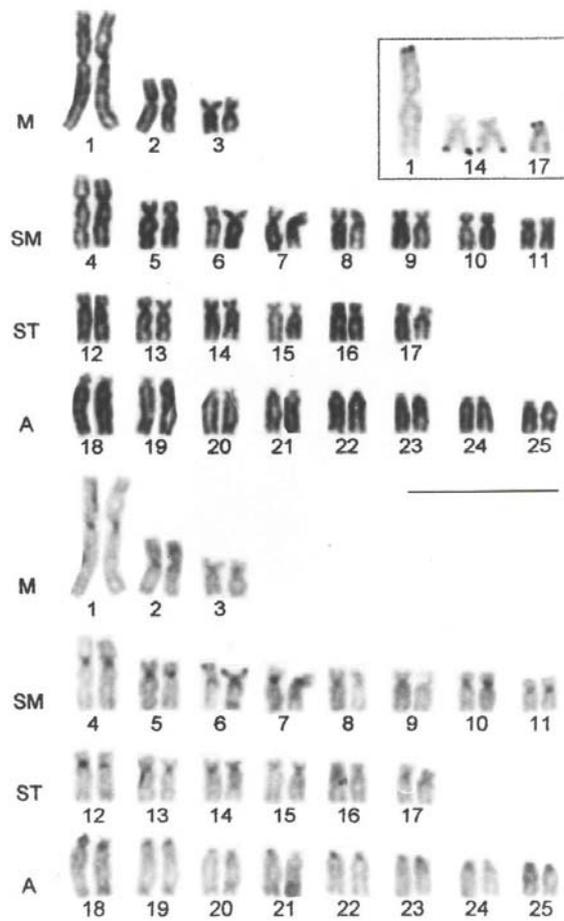
## RESULTADOS

O cariótipo da população de *Hyphessobrycon anisitsi* proveniente do rio Piracuama apresentou um número diplóide de  $2n=50$  cromossomos. O cariótipo é formado por 6 cromossomos metacêntricos (M), 16 cromossomos submetacêntricos (SM), 12 cromossomos subtlocêntricos (ST) e 16 cromossomos acrocêntricos (A),

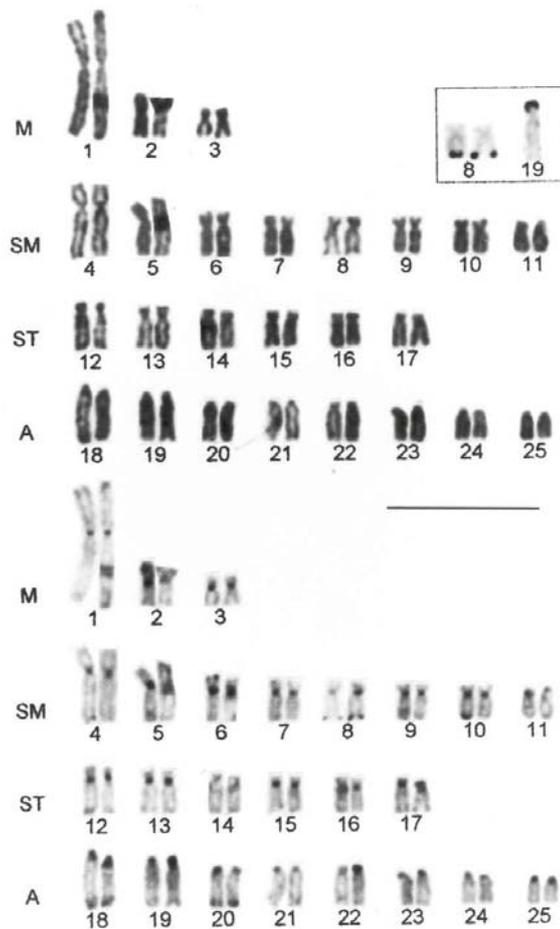
com número fundamental  $NF=84$ . Não foi observado heteromorfismo cromossômico sexual (Fig. 1a). A heterocromatina constitutiva (banda-C) foi evidenciada na região pericentromérica de todos os cromossomos, com algumas marcações terminais mais destacáveis no braço curto dos pares 1, 2, 6 e no braço longo dos pares 1, 4, 6, 12, 18, 19, 20 e 21 (Fig. 1b). Foram constatados até 4 sítios ativos de regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs), situados na região telomérica do braço longo do par 14 e do braço curto de um dos homólogos dos pares 1 e 17 (Fig. 1 box). A hibridação “*in situ*”, com sonda de rDNA 18S, identificou treze cromossomos portadores de sítios ribossômicos (Fig. 3 a). A utilização de sonda de rDNA 5S evidenciou quatro sítios gênicos, proximais ao centrômero, dois deles localizados em um par subtelocêntrico grande e dois em um par metacêntrico de tamanho médio (Fig. 3 c).

A população de *H. anisitsi* proveniente do ribeirão das Perdizes também apresentou um número diplóide  $2n=50$  cromossomos, sendo o cariótipo igualmente formado por  $6M+16SM+12ST+16A$ , com número fundamental  $NF=84$  (Fig. 2 a). Igualmente à população do rio Piracuama, não foi observado heteromorfismo cromossômico sexual. Bandas-C foram evidenciadas na região pericentromérica de todos os cromossomos, com alguns blocos terminais mais destacáveis no braço curto dos pares 1, 2, 6 e nos braços longos dos pares 1, 4, 8, 10, 12, 18, 19, 20 e 21 (Fig.2 b). Até três sítios ativos de Ag-NORs foram identificados, na região telomérica no braço longo do par 8 e na região telomérica no braço curto em um dos cromossomos homólogos do par 19 (Fig. 2 box). A hibridação “*in situ*” identificou dez sítios de rDNA 18S (Fig. 3 b) e cinco sítios de rDNA 5S, estes últimos localizados em um par subtelocêntrico grande, em um par metacêntrico médio e em um

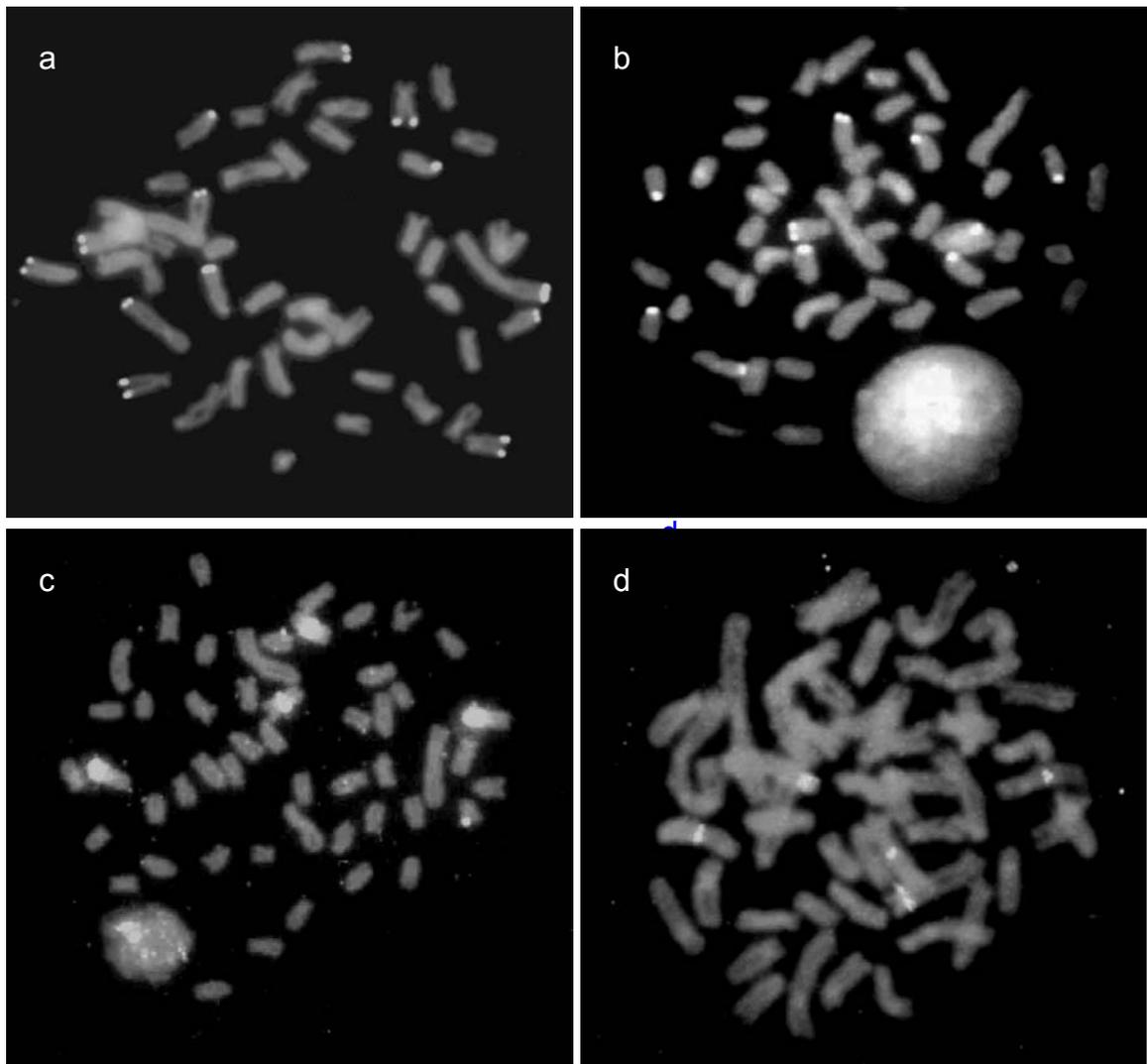
cromossomo submetacêntrico médio, sempre no braço maior e em região proximal ao centrômero (Fig. 3 d).



**Fig. 1.** Cariótipo de *Hyphessobrycon anisitsi* do rio Piracuama. (a) coloração convencional; (b) bandamento-C; (box) cromossomos portadores de Ag-NORs. A barra equivale a 5 $\mu$ m.



**Fig. 2.** Cariótipo de *Hyphessobrycon anisitsi* do Ribeirão das Perdizes. (a) coloração convencional; (b) bandamento-C; (box) cromossomos portadores de Ag-NORs. A barra equivale a 5 $\mu$ m.



**Fig. 3.** Hibridação *in situ* evidenciando a localização dos sítios de rDNA 18S em *Hyphessobrycon anisitsi* do rio Piracuama (a) e *Hyphessobrycon anisitsi* do Ribeirão das Perdizes (b). Hibridação *in situ* evidenciando a localização de sítios de rDNA 5S em *Hyphessobrycon anisitsi* proveniente do rio Piracuama (c) e *Hyphessobrycon anisitsi* proveniente do ribeirão das Perdizes (d).

## DISCUSSÃO

Estudos citogenéticos em peixes tem mostrado que populações isoladas por barreiras geográficas são mais propícias à fixação de alterações cromossômicas. As populações de *H. anisitsi*, analisadas no presente trabalho, estão isoladas por um divisor de águas, a Serra da Mantiqueira, a partir de eventos geomorfológicos que ocorreram no período terciário (Ab'Saber & Bernardes, 1956). Estas populações apresentaram o mesmo número diplóide e a mesma fórmula cariotípica, bem como um padrão similar de distribuição da heterocromatina constitutiva (bandas-C). Contudo, em relação à distribuição dos genes ribossômicos, ambas as populações mostraram padrões distintos e característicos para cada uma delas. Assim, na população do rio Piracuama, as Ag-NORs foram localizadas no par 14 e em um dos homólogos do par 1 e do par 17, o que foi posteriormente confirmado pela hibridação *in situ* com sonda de rDNA 18S, juntamente com mais nove cromossomos, totalizando treze sítios detectáveis. Por sua vez, na população do ribeirão das Perdizes as Ag-NORs foram localizadas no par 8 e em um dos cromossomos homólogos do par 19, também confirmados pela hibridação *in situ* com rDNA 18S, juntamente com mais sete cromossomos, totalizando dez sítios detectáveis.

É possível que tais diferenças na localização do rDNA entre essas populações seja devida à dispersão dos genes ribossômicos por transposições desses sítios nos cromossomos. Este tipo de rearranjo tem sido considerado como um dos eventos mais prováveis implicados na variação das NORs em peixes (Galetti Jr. et al., 1995; Almeida-Toledo et al., 1996; Mantovani et al., 2000; Souza et al., 2001). Assim sendo, a dispersão dos sítios ribossômicos estaria ocorrendo de uma

forma independente, contribuindo para a diferenciação genética entre essas duas populações isoladas de *H. anisitsi*.

Em populações de *Astyanax scabripinnis* também foram observadas diferenças no posicionamento dos genes ribossômicos entre os cromossomos, possivelmente também ocasionadas por transposições (Mantovani et al., 2000; Souza et al., 2001). De fato, a localização dos sítios ribossômicos vem se mostrando um instrumento valioso na caracterização de populações de várias espécies de peixes (Feldberg et al., 1999; Ferro et al., 2001). Em *A. scabripinnis*, a grande diversidade cromossômica apresentada por esse grupo pode ter sido corroborada pela condição de alopatria entre as espécies e/ou populações, devido a um isolamento geográfico e/ou biológico (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). É interessante destacar que as duas populações de *H. anisitsi* foram coletadas em simpatria com populações de *A. scabripinnis*. Contudo, as alterações cromossômicas nas populações de *H. anisitsi* não foram tão acentuadas como as observadas nas populações de *A. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza & Moreira-Filho, 1995; Mantovani et al., 2000; Ferro et al., 2001; Souza et al., 2001) mostrando que, apesar de estarem submetidas a uma condição similar de isolamento, cada uma dessas espécies/populações apresentam um padrão diferenciado e peculiar de evolução cariotípica.

O gene ribossômico rDNA 5S é considerado altamente conservado (Danna et al., 1996). Por ser um gene conservado e localizado em diferentes áreas do genoma, está sendo utilizado como ferramenta para estudos filogenéticos e como um marcador populacional (Martins & Galetti Jr., 2001). Entre os peixes, algumas espécies de Acipenseriformes, Anguiliformes, Salmoniformes, Cypriniformes, Perciformes e Characiformes já possuem estudos relacionados com a organização

e/ou localização do rDNA 5S. A população de *H. anisitsi*, do rio Piracuama, apresentou quatro locos de rDNA 5S localizados em dois pares de cromossomos, enquanto que a população do ribeirão das Perdizes apresentou cinco locos desse gene, quatro deles provavelmente presentes em dois pares de cromossomos homeólogos aos da população do rio Piracuama. Entre os Characiformes, a maioria das espécies estudadas apresenta um número máximo de quatro sítios de rDNA 5S, localizados preferencialmente em região intersticial, próxima ao centrômero, região esta que poderia ser considerada estratégica para a manutenção e preservação do gene, uma vez que estaria menos sujeita a rearranjos cromossômicos (Martins & Galetti Jr., 2001). Contudo, em populações de *Astyanax scabripinnis* puderam ser observados até oito sítios de rDNA 5S (Ferro et al., 2001). O aumento dos sítios de rDNA 5S nas populações de *A. scabripinnis* e *H. anisitsi* poderia estar também correlacionado com uma dispersão de dessas sequências gênicas, levando a um aumento da variabilidade genética para estas populações. Abel (2001), propõem que em populações isoladas em pequenos corpos de água, como *A. scabripinnis*, as alterações cromossômicas seriam eventos importantes para a manutenção de sua variabilidade genética.

Levando-se em consideração a distribuição dos genes ribossômicos 18S e 5S nas populações de *H. anisitsi*, podemos inferir que a situação de alopatria, condicionada pelo divisor de águas (Serra da Mantiqueira), está desempenhando um importante papel na fixação de rearranjos cromossômicos independentes entre essas populações. Assim sendo, apesar de uma macroestrutura cariotípica ainda bastante similar, essas populações já se caracterizam por uma diferenciação ao nível das regiões organizadoras de nucléolos, indicando um certo grau de divergência genética já em andamento.

**Agradecimentos:** Os autores são gratos ao Dr. Paulo A. Buckup e MsC. Filipe A. G. de Mello ( Museu Nacional do Rio de Janeiro) pela identificação taxonômica dos espécimes. Ao CNPq e a FAPESP (Proc. 01/00713-0) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Abel, L.D.S. 2001. A variabilidade do complexo de espécies scabripinnis (Pisces, Characidae) como estratégia adaptativa. Estudo da diversidade cariotípica do grupo com ênfase em populações da bacia do rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil.
- Ab'Saber, A.N. & Bernardes, N. 1956. Vale do Paraíba, Serra da Mantiqueira e arredores de São Paulo. *Eng. Min. Met.*, 24: 283-292.
- Almeida-Toledo, L.F., Bigoni, A.P., Bernardino, G., Foresti, F. & Toledo-Filho, S.A. 1996. Karyotype and NOR conservatism with heterocromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia*, 49: 35-43.
- Arefjev, V.A. 1990. Cytogenetics of aquarium fishes. 3. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for 6 species of tetras. *Caryologia*, 43(3-4): 305-319.
- Bertollo L.A.C., Takahashi C.S. & Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brasil. J. Genet.*, 1: 103-120.
- Bohlke, J.E., Weitzman, S.H. & Menezes, N.A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica*, 8:657-677.
- Britski, H.A. 1972. Peixes de água doce do estado de São Paulo – Sistemática. In: Poluição e Piscicultura, CIBPU-FSPUSP e IP-CPRN-SA, p. 79-108.
- Centofante, L., Porto, J.I.R. & Feldberg, E. 2002. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Pisces, Serrasalminae) from central amazon. *Caryologia*, 55: 37-45.

- Danna, K.J., Workman, R., Coryell, V. & Keim, P. 1996. 5S rDNA genes in tribe Phaseoleae: array size, number, and dynamics. *Genome*, 39: 445-455.
- Eigenmann, C.H. 1917. The american Characidae. *Mem. Mus. Camp. Zool.*, 53: 1-102.
- Feldberg, E., Porto, J.I.R., Santos, E.B.P. & Valentin, C.S. 1999. Cytogenetic studies of two freshwater scianids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the central Amazon. *Genet. Mol. Biol.*, 22: 351-356.
- Ferro, D.A.M., Néo, D.M., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.
- Galetti Jr., P.M., Mestriner, C.A., Monaco, P.J. & Rasch, E.J. 1995. Post-zigotic modifications and intra- and interindividual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome Res.*, 3: 285-290.
- 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.
- Levan A., Fredga K. & Sandberg A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lima, F.C.T. & Gerhard, P. 2001. A new *Hyphessobrycon* (Characiformes, Characidae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, with notes on its natural history. *Ichthyol. Explor. Freshwater*, 12(2): 105-114.

- Lucena, C.A.S. 1993. Estudos filogenéticos da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 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.
- Martins, C. & Galetti Jr., P.M. 2001. Two 5S arrays in neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111: 439-446.
- Martins, C. & Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.*, 7: 363-367.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Braz. J. Genet.*, 14: 331-357.
- Pinkel, A.M., Straume, T. & Gray, J.W. 1986. Cytogenetics analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83: 2934-2938.
- Scheel, J.J. 1973. Fish chromosome and their evolution. Internal Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Danmark, 22p.
- Souza, I.L., Galian, J., 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. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60: 1-14.

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

Vicente V.E. 2001. Estudos citogenéticos e moleculares em *Parodon hilarii* e correlações em outras espécies da família Parodontidae (Pisces, Characiformes). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

## CAPÍTULO VI

### **CROMOSSOMOS B E TRIPLOIDIA NATURAL EM *Rhamdia* sp. (PISCES, SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE).**

Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. & Centofante, L. (2003). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes). *Cytologia*, 68: pré-print.

## RESUMO

Foram realizados estudos citogenéticos em 13 espécimens de *Rhamdia* sp. provenientes do Ribeirão Grande (Bacia do rio Paraíba do Sul, Serra da Mantiqueira, Brasil). Os dados obtidos evidenciaram um número diplóide padrão  $2n=58$  cromossomos (46M/SM+12ST), além de 1 a 4 cromossomos Bs, presentes em 10 espécimes. Um indivíduo da amostra apresentou triploidia natural com ausência de cromossomos Bs. Hibridizações *in situ*, com sondas de rDNA 5S e 18S, foram utilizadas na complementação das análises cariotípicas convencionais. São feitas inferências sobre a presença de cromossomos Bs no gênero *Rhamdia*, considerando-se a evolução cariotípica do grupo, bem como sobre a re-ocorrência de triploidia natural na região da Serra da Mantiqueira.

## ABSTRACT

Cytogenetic studies were performed in 13 specimens of *Rhamdia* sp. from Ribeirão Grande stream (basin of the river Paraíba do Sul, Serra da Mantiqueira, Brazil). The results obtained evidence a diploid number  $2n=58$  chromosomes (46M/SM+12ST), beyond 1 to 4 Bs chromosomes presents in 10 specimens. One individual of the sample presented natural triploidy with absence of Bs chromosomes. *In situ* hybridization with 5S and 18S rDNA probe were use in the complementation of the karyotypic analysis conventionals. Suggestions about the presence of Bs chromosomes in the *Rhamdia* genus were performed, consider the Karyotypic evolution in the group, as well as about the relapse of natural triploidy in the Serra da Mantiqueira region.

## INTRODUÇÃO

Em vertebrados inferiores já foram descritas diversas ocorrências de poliploidia. Entretanto, para peixes neotropicais, a única forma de poliploidia natural relatada até o momento é a triploidia, com 14 casos já constatados (Centofante et al., 2001).

Dentre as hipóteses explicativas para a origem dos peixes triplóides, duas delas tem sido mais aceitas. A primeira considera a fertilização de um gameta que não sofreu dijunção meiótica ( $2n$ ) por um gameta haplóide (Cuellar & Uyeno, 1972), hipótese esta também sugerida para o surgimento de indivíduos triplóides em populações de *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1990), *Astyanax eigenmanniorum* (Fauaz et al., 1994), *Astyanax scabripinnis* (Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994), entre outros. Essa hipótese foi novamente considerada e reforçada em *Characidium gomesi*, espécie que apresenta um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde um exemplar triplóide evidenciou dois cromossomos Z e um cromossomo W (Centofante et al., 2001). A segunda hipótese considera a retenção do segundo corpúsculo polar durante a gametogênese na formação do ovócito (Magee & Phillip, 1982).

Tanto em animais como em plantas, já foram descritos diversos casos de cromossomos B ou supranumerários (Jones, 1975). Entre os peixes neotropicais, a ocorrência de cromossomos B vêm se mostrando relativamente freqüente, a partir do primeiro relato por Pauls & Bertollo (1983) em *Prochilodus lineatus* (citado como *P. scrofa*), englobando cerca de nove famílias distintas (Almeida-Toledo et al., 1985; Venere & Galetti Jr., 1985; Pauls & Bertollo, 1990; Fenocchio & Bertollo, 1990; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Dias & Foresti, 1993; Fauaz et al., 1994; Maistro et

al., 1994; Portella-Castro et al., 1999; Fenocchio et al., 2000; Néó et al., 2000; entre outros).

O presente estudo refere-se a uma análise cromossômica em *Rhamdia* sp. (Pimelodidae), proveniente da Serra da Mantiqueira (Brasil) onde, além de cromossomos B, foi também observado um caso de triploidia natural. Os dados são discutidos, levando-se em consideração a evolução cromossômica do gênero e o ambiente estudado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram analisados 13 exemplares (7 fêmeas e 6 machos) de *Rhamdia* sp. provenientes do Ribeirão Grande, afluente do rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil (22° 46' 2.98"S e 45° 26' 7.05"W). Os espécimes encontram-se depositados na coleção de peixes do Museu Nacional do Rio de Janeiro, com o número de registro MNRJ 23260.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim, por preparação direta (Bertollo et al., 1978). A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos, por impregnação pelo nitrato de prata (Ag-NORs), seguiu a metodologia de Howell & Black (1980). A coloração cromossômica por fluorocromos base-específicos (cromomicina A<sub>3</sub> combinada com distamicina A) e a localização da heterocromatina constitutiva foram realizadas conforme Schmid (1980) e Sumner (1972), respectivamente.

Sondas de rDNA 18S, obtida de *Parodon hilarii* (Vicente 2001) e de rDNA 5S, obtida de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr., 1999), foram utilizadas para a hibridação fluorescente *in situ*, conforme Pinkel et al., (1986).

A morfologia dos cromossomos (meta-, submetá-, subtelo- e acrocêntricos) foi determinada conforme a razão de braços (Levan et al., 1964).

## RESULTADOS

A espécie estudada apresentou um número diplóide padrão de  $2n=58$  cromossomos, sendo o cariótipo constituído por 46 cromossomos meta/submetacêntricos (M/SM) e 12 cromossomos subtelo-cêntricos (ST). Entre os indivíduos amostrados, 10 apresentaram uma variação cromossômica numérica atribuída à presença de cromossomos supranumerários metacêntricos, em número de zero a 4. Esses cromossomos podem ser caracterizados como microcromossomos ou pequenos, estes últimos não podendo ser diferenciados dos demais cromossomos do complemento por coloração convencional. Diferentes combinações de Bs (pequenos e microcromossomos) foram observadas, sendo que nas metáfases com  $2n=62$  cromossomos, sempre foram visualizados 2 Bs pequenos e 2 microcromossomos.

Um exemplar fêmea apresentou  $2n=3x=87$  cromossomos, caracterizando um triploide natural não portador de cromossomos supranumerários.

Um par bem evidente de Ag-NORs foi constatado no braço curto do cromossomo subtelo-cêntrico nº 27, com associações freqüentes entre estas regiões. Em alguns casos pôde-se observar um heteromorfismo no tamanho das NORs entre os dois homólogos. O espécime triploide apresentou de 1 a 3 Ag-NORs, igualmente presentes no cromossomo 27 do cariótipo.

Pôde-se observar blocos heterocromáticos em posição centromérica (ou pericentromérica) na maioria dos cromossomos, bem como bandas localizadas na região telomérica de alguns cromossomos. Os pares metacêntricos 10 e 22

evidenciaram blocos heterocromáticos na região telomérica de ambos os braços. As regiões correspondentes às NORs, no cromossomo 27, mostraram-se totalmente heterocromáticas, assim como os cromossomos B.

Bandas fluorescentes positivas, coincidentes com as Ag-NORs, foram observadas após o tratamento cromossômico com cromomicina A<sub>3</sub> no par 27. Em concordância, três dessas regiões foram detectadas no exemplar triploide. Nenhuma outra banda CMA<sub>3</sub> adicional foi observada no restante do cariótipo.

Um sinal fluorescente bem visível, coincidente com as Ag-RONs, foi observado após a hibridação fluorescente *in situ*, utilizando sonda de rDNA 18S. Por outro lado, o rDNA 5S foi localizado em um locus situado na região pericentromérica de um par de cromossomos meta/submetacêntricos. O indivíduo triploide também apresentou três dessas marcações, no cromossomo correspondente.

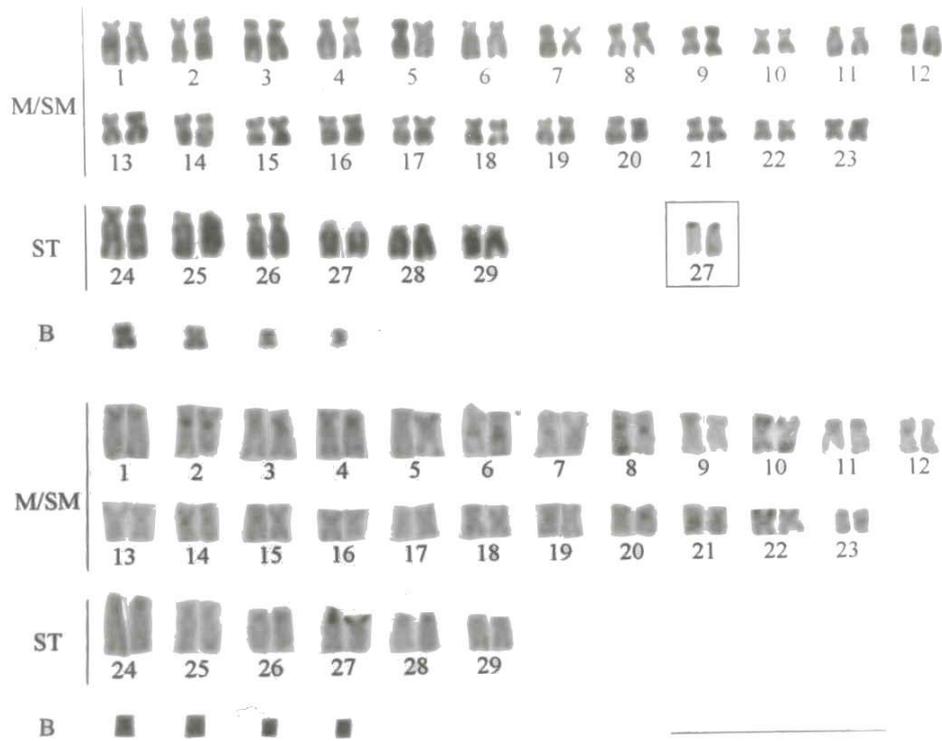
Tabela 1. Dados cromossômicos do gênero *Rhamdia*. **2n**= número diplóide; **NORs**= regiões organizadoras de nucléolos; **NF**= número fundamental; **Bs**= cromossomos supranumerários; **Ref** = referência bibliográfica.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NORs	NF	Bs	Ref
<i>R. branneri</i>	Rio Iguaçu – PR	58	22M+18SM+2ST+2 <sup>A</sup>		86	0-4 médios	1
	Rio Iguaçu – PR	58	30M+10SM+14ST+4 <sup>A</sup>	braço curto, ST	112	0-4 médios	2
<i>R. hilarii</i>	Rio da Onça – SP	62	36M+18SM+8 <sup>A</sup>		116		3
	Rep. Do Monjolinho – SP	58		braço curto, M/SM	100	0-5 médios	4
	Lagoa Nova e Jataí	58					5
	C. Hortelã – SP	58	30M+18SM+10ST	<u>braço curto, SM (par 19)</u>	106	0-3 pequenos	6
	Rep. do Lobo-SP, Rep. do 29 – SP, R. Mogi-Guaçu, Rep de Três Marias – MG, R. guapey – Argentina	58		braço curto, ST	≡ 108	0-5 médios	7
	R. Mogi-Guaçu – SP	58	58M/SM	braço curto, ST	16	0-2 médios	8
<i>R. quelen</i>	Lagoa dos Quadros, Rio Guaíba – RS	8	52M+6 <sup>A</sup>	braço curto, ST	10	0-4 médios	9
	Rio Mogi- Guaçu –SP, R. Iguaçu – SC, Rio Paraná – Argentina	58		<u>braço curto, ST</u>	≡ 108	0-1 médio	10
	Rio Tibagi – PR	58		<u>braço curto, SM</u>		0-4	11
	Rio Aguapei	58	26M+20SM+6ST+6 <sup>A</sup>	braço curto, ST	110	1-4 pequeno, um grande	12
	Rio Iguaçu – PR	58		braço curto, ST			
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires – Argentina	58	44M/SM+14ST/A		102	0-1 pequeno	13
<i>R. voulezi</i>	Rio Iguaçu – PR	58				0-4 médios	14
	Rio Iguaçu – PR	58	30M+10SM+14ST+4 <sup>A</sup>	braço curto, A	112		15

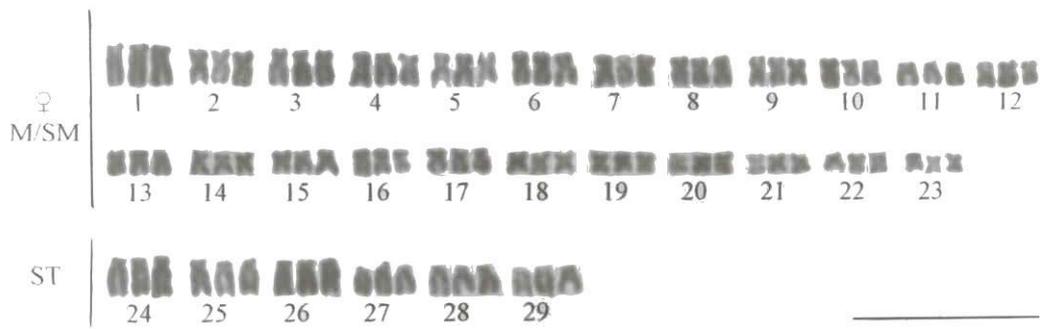
<i>Rhamdia</i> sp.	Rio Sapucaí – MG	58		braço curto, M e braço longo, SM		16
	Rio Iguaçu –PR	58			0-2, micro	14
	Rio São João – PR	58	26M+10SM+10ST+12 A	Telomérica braço menor (par 27)	104	15

---

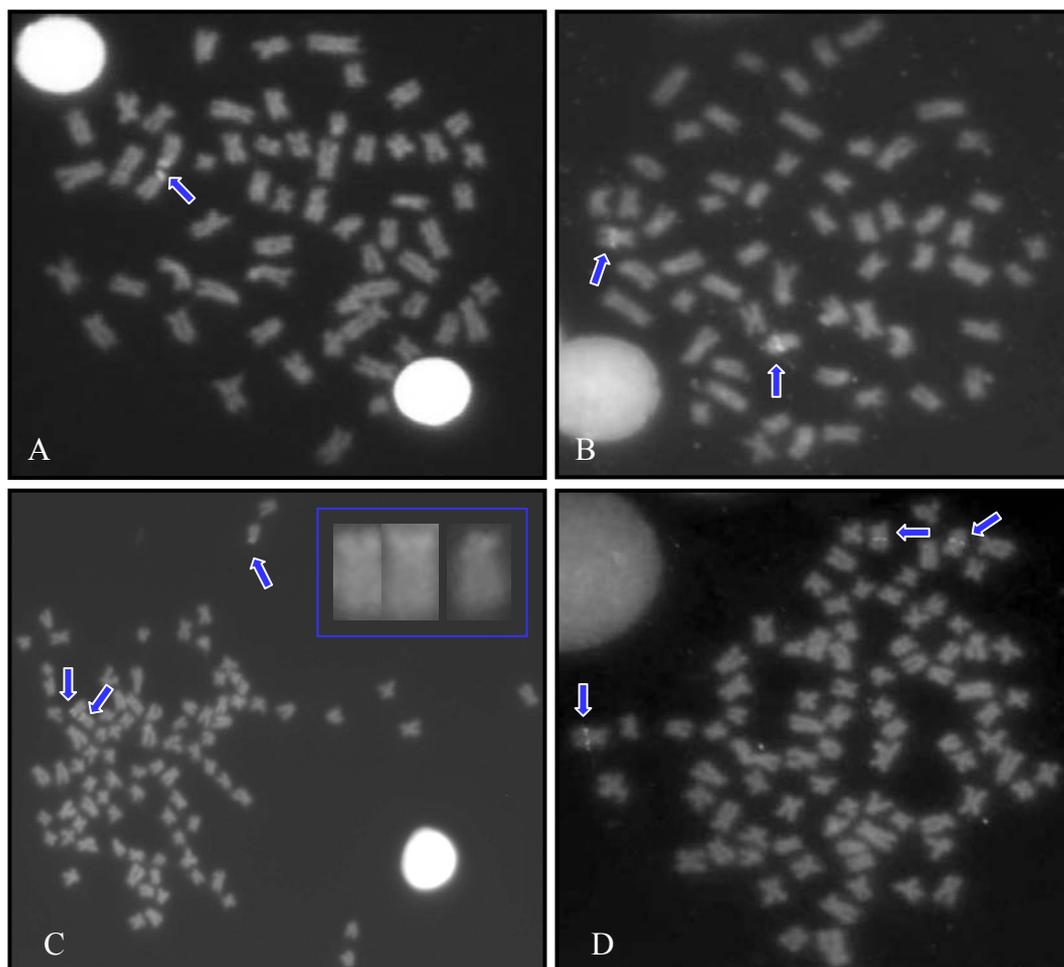
Ref.: 1) Abucarma & Martins- Santos (1996); 2) Roman et al., (2002); 3) Toledo & Ferrari (1976); 4) Fenocchio & Bertollo (1990); 5) Fenocchio (1993); 6) Vissoto et al., (1999, b); 7) Fenocchio et al., (2000); 8) Maistro et al., (2002); 9) Hochberg & Erdtmann (1988); 10) Fenocchio et al., (2000); 11) Carvalho & Dias (2001); 12) Stivari et al., (2002); 13) Varcacel et al., (1993); 14) Abucarma & Martins-Santos (1998); 15) Roman et al., (2001); 16) Andrade et al., (1998).



**Fig. 1.** Cariótipo de *Rhamdia* sp. (a) coloração convencional com Giemsa e (b) bandamento-C. Em destaque, o par 27 com sítios de Ag-NORs.



**Fig. 2.** Cariótipo do espécime triploide de *Rhamdia* sp.



**Fig. 3.** Metáfases de exemplares diplóides de *Rhamdia* sp. após hibridação fluorescente *in situ*, com sondas de rDNA 18S (**A**) e rDNA 5S (**B**). Metáfases do exemplar triplóide tratadas com o fluorocromo CMA3 (**C**) e após hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 5S (**D**).

## DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Tabela 1, o gênero *Rhamdia* apresenta um número diplóide padrão  $2n=58$ , com predominância de cromossomos com dois braços, o que confere um número fundamental relativamente alto para esse grupo. A presença de cromossomos supranumerários também é comum em várias espécies, apresentando uma grande variação de tamanho, forma e número (Tabela 1). Tais características cariotípicas estão também presentes na espécie ora estudada, além de um padrão de heterocromatina pálida, presente também em outras espécies do gênero. Por sua vez, a presença de bandas heterocromáticas mais conspícuas, em ambos os telômeros de cromossomos metacêntricos, é uma característica que pode estar associada aos cromossomos supranumerários de *Rhamdia*, conforme destacado por Fenocchio & Bertollo (1990), Abucarma & Martins-Santos (1998), Andrade et al., (1998), Fenocchio et al., (2000) e Maistro et al., (2002). Entretanto, no caso de *Rhamdia* sp., esse padrão de coloração foi observado em cromossomos do complemento padrão (A), enquanto que os cromossomos Bs, pequenos ou micros mostram-se heterocromáticos. Um caso semelhante foi constatado por Roman et al., (2001), em *Rhamdia voluezi*, onde os pares 1 e 10 do complemento padrão apresentam bandas-C biteloméricas, mas com ausência de cromossomos supranumerários. Este padrão de bandas já foi também observado em outros grupos aparentados, como nos Pimelodidae, *Pimelodus* SP. (Souza & Dias, 2001) e *Ieringichtys labrosus* (Carvalho & Dias, 2002), podendo ser uma simplisiomorfia no grupo.

Os heptapterídeos apresentam NORs simples, localizadas em diferentes posições e em distintos cromossomos, para os diferentes gêneros que compõem este grupo de peixes (Fenocchio, 1993, Dias & Foresti, 1993; Vasconcelos &

Martins-Santos, 2000; Stolf & Dias, 2001, entre outros). Entretanto, para o gênero *Rhamdia*, a localização e o número das NORs mostra-se praticamente constante entre as diferentes espécies e populações analisadas, com um par de NORs localizado no braço curto de cromossomos submetá- ou subtelocêntricos (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio & Bertollo, 1990, 2000; Vissoto et al., 1999; Carvalho & Dias 2001; Roman et al., 2001; Maistro et al., 2002). Raramente se observam NORs múltiplas nesse grupo (Abucarma & Martins-Santos, 1998; Andrade et al., 1998).

O espécime triploide apresentou células com duas ou três regiões organizadoras de nucléolos, em cromossomos correspondentes àqueles observados nos indivíduos diplóides. Situação similar foi também observada por Venere & Galetti Jr. (1985) para um exemplar triploide de *Curimata modesta*, indicando que esses genes estariam sendo submetidos a um controle de sua expressão. Contudo, uma situação oposta foi constatada em *Eigenmannia* sp., onde três Ag-NORs foram constantes num espécime triploide, indicando ausência de inativação desses cístrons (Almeida-Toledo et al., 1985).

A correspondência entre as regiões Ag-NOR positivas e CMA<sub>3</sub> positivas indica uma composição rica em bases GC na região das NORs, provavelmente presente nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre seqüências de DNA repetitivos adjacentes (Schmid, 1980). Coincidentemente, no espécime triploide sempre foram observados três cromossomos portadores de sinais CMA<sub>3</sub> positivos. Em peixes, fluorocromos AT específicos produzem pouca ou nenhuma banda positiva. Já os fluorocromos GC específicos vem sendo bastante utilizados no estudo das NORs, uma vez que, apresentam uma notável relação com estas regiões (Souza & Moreira-Filho, 1995). Tal correspondência já foi também observada em

algumas espécies de pimelodídeos, como *Pirinampus pirinampu* e *Zungaru zungaru* (Swarça et al., 2001 a, b). Contudo, este tipo de abordagem deve ser feito com certas ressalvas, visto que igualmente podem ocorrer regiões cromossômicas ricas em GC sem correspondência com as NORs (Artoni et al., 1999).

A coincidência constatada entre as Ag-NORs e os sítios de rDNA 18S, tanto nos espécimes diplóides como no triplóide, confirma um sistema de NOR simples para a espécie. Os dados obtidos com FISH utilizando sonda de rDNA 5S mostram também um único locus para essa região, localizada em um par de cromossomos meta/submetacêntricos, não ocorrendo assim sintenia entre os dois tipos de rDNA analisados. Embora dados com FISH em Heptapteridae ainda sejam escassos (Swarça et al., 2001; 2003; presente estudo), eles poderão vir a ser um importante marcador cromossômico espécie-específico, como já observado em algumas outras espécies de peixes (Vicente et al., 2001).

Os dados disponíveis sobre cromossomos supranumerários, em distintas espécies de *Rhamdia*, mostram diferenças de tamanho e nos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva. Assim, Fenocchio & Bertollo (1990), Fenocchio et al., (2000) e Maistro et al., (2002), analisando populações de *Rhamdia hilarii*, de diferentes localidades, constataram a presença de cromossomos adicionais metacêntricos com um padrão de bandamento-C bitelomérico característico, o mesmo ocorrendo para *Rhamdia quelen* (Hochberg & Erdtmann, 1988). Por outro lado, em *R. voulezi* e *Rhamdia SP.*, Abucarma & Martin-Santos (1998) encontraram cromossomos supranumerários pequenos e eucromáticos. No presente trabalho, assim como nos trabalhos de Vissoto et al., (1999, b) com *R. hilarii*, foram encontrados supranumerários de tamanho pequeno e na forma de microcromossomos, totalmente heterocromáticos, ocorrendo conjuntamente numa

mesma população. Segundo Fenocchio (1993), a presença de cromossomos Bs em populações de *Rhamdia* pertencentes a diferentes bacias hidrográficas, pode ser indicativo de que o surgimento desses cromossomos seria anterior aos possíveis eventos que promoveram o isolamento geográfico deste grupo. Estudos realizados por Salvador & Moreira-Filho (1992) e Pauls & Bertollo (1990), em *Astyanax scabripinnis* e *Prochilodus lineatus* (citado como *scrofa*), respectivamente, apresentam uma situação semelhante, onde um mesmo tipo de cromossomo supranumerário parece ser compartilhado por diferentes populações. Hochberg & Erdtmann (1988) propõem que os cromossomos B, em *R. quelen*, seriam isocromossomos com base no padrão de distribuição da heterocromatina, simetricamente localizada na extremidade dos dois braços de cromossomos metacêntricos.

Nos Heptapteridae os cromossomos supranumerários apresentam uma variação numérica inter e intraindividual, conforme pode ser constatado na Tabela 1, demonstrando assim que estes cromossomos apresentam um comportamento irregular durante a divisão celular. Contudo, em outras espécies de peixes, como *Astyanax scabripinnis*, os Bs mantêm uma constância numérica entre as células dos indivíduos portadores, evidenciando uma estabilidade mitótica (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Néó et al., 2000).

Apesar da marcante presença dos Bs na população em estudo, esses cromossomos não foram observados no exemplar triploide, diferindo assim de alguns outros casos descritos em peixes, onde observou-se a ocorrência simultânea de triploidia e cromossomos adicionais (Venere & Galetti Jr., 1985; Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994).

Poliploidia é um evento comum em plantas (Galinsky, 1956), porém entre os mamíferos, a ocorrência de triploidia encontra-se freqüentemente relacionada com morte do embrião ou nascimento seguido por morte (Ohno, 1974). Nos vertebrados inferiores, a ocorrência de triploidia não parece ser incompatível com a viabilidade (Bogart, 1980). Entre os peixes Cyprinidae, por exemplo, há uma clara divisão em dois grupos: um maior, composto por representantes diplóides e outro menor composto por poliplóides, sendo sugerida a existência de um possível ancestral poliplóide para o grupo (Collares-Pereira & Coelho, 1989). Já em outros grupos de peixes a poliploidia parece ser um fenômeno de ocorrência aleatória e mais freqüente em espécies que apresentam formas hermafroditas ou reprodução partenogênica, como por exemplo, *Poecilia formosa* (Galetti Jr. & Rasch, 1993). A ocorrência deste fenômeno em grupos onde os dois sexos encontram-se presentes é relativamente mais baixa (White, 1978).

É conhecido o fato de que a poliploidia pode ser obtida artificialmente por diversos métodos, principalmente por agentes físicos como choque térmico ou pressão hidrostática em óvulos recém fertilizados, o que resulta na retenção do 2º corpúsculo polar (Carvalho et al., 1990). Em condições naturais, a temperatura parece ter também uma grande influência no caso dos peixes. Este grupo apresenta normalmente fertilização externa, e o término da divisão meiótica feminina só se dá após a desova. Desta forma as células gaméticas femininas estão mais sujeitas às variações do meio externo do que os espermatozóides (Fauaz et al., 1994), fato que poderia facilitar a retenção do 2º corpúsculo polar.

Coincidentemente, na região onde foram coletados os exemplares do presente trabalho, já foram descritos outros casos de triploidia natural para outras espécies de peixes, tais como *Astyanax scabripinnis*, (Fauaz et al., 1994; Maistro et

al., 1994) e *Characidium gomesi* (Centofante et. al., 2001). Assim, visto que a ocorrência de triploidia natural não é um evento tão esperado, quais seriam as razões para as recorrências observadas nas diferentes espécies de peixes dessa região? Acreditamos que as peculiaridades regionais, geomorfológicas e ambientais, sejam fatores relevantes nesses casos. Nessa região encontra-se a Serra da Mantiqueira, apresentando um relevo muito acidentado, formado por um conjunto de montanhas com altitudes variando de 600 a 2000 metros, onde situam-se inúmeros riachos de pequeno porte. Segundo Troppmair (2000), esta região encontra-se sujeita a variações de temperatura durante o ano, além de sofrer o impacto freqüente de chuvas de granizo. Como os riachos apresentam pouco volume de água nas suas cabeceiras, estas estariam facilmente sujeitas à redução da temperatura. A coincidência desses eventos com o período de desova propiciaria a ocorrência de um choque térmico gamético, facilitando assim a formação de triploides. Mudanças de temperatura são também possíveis causas explicativas para a triploidia natural em *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983), *Curimata modesta* (Venere e Galetti Jr., 1985) e *Astyanax scabripinnis* (Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994).

Concluindo, o gênero *Rhamdia* pode ser caracterizado por uma conservação do conjunto cromossômico diplóide padrão ( $2n=58$ ), acrescida de uma variabilidade numérica devida à presença de cromossomos Bs, além de uma acentuada variação estrutural causada por rearranjos não-Robertsonianos. Os dados ora apresentados visam, pois contribuir para um melhor conhecimento da constituição cromossômica e da biodiversidade desse grupo amplamente distribuído pela região neotropical, com problemas de natureza taxonômica ainda por serem resolvidos.

**Agradecimentos:** Os autores são gratos ao CNPq e à FAPESP (Proc. 01/00713-0) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Abucarma, M. & Martins-Santos, I. C. (1996). Caracterização cromossômica de duas espécies da família Pimelodidae (Pisces, Siluriformes). *VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos, SP, p. 73.
- Abucarma, M. & Martins-Santos, I. C. (1998). Cromossomos B em espécies do gênero *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes) endêmicas da bacia do Rio Iguaçu. *VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Londrina, PR, p 25.
- Almeida-Toledo, L. F. & Toledo-Filho, S. A. (1985). Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eignmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the amazon basin. *Genetica*, 66: 85-88.
- Andrade, S. F., Maistro, E. L, Oliveira, C. & Foresti, F. (1998). Caracterização cromossômica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces, Pimelodidae), proveniente do Rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. *Resumos do 44º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP, p. 66.
- 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.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.*, 1: 103-120.
- Bogart, J. P. (1980). Evolutionary implications of polyploidy in amphibians and reptiles. In: *Polyploidy*, Ed. Plenow. Nova York, 341-378.

- Carvalho, E. D., Oliveira, C. & Foresti, F. (1990). Indução de triploidia natural em tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e sua avaliação pela análise cromossômica. *III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, Botucatu, SP, p. 49.
- Carvalho, R. A. & Dias, A. L. (2001). Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) proveniente da Bacia do Rio Tibagi/PR. *Resumos do Congresso Nacional de Ictiologia*, p. 73.
- Carvalho, R. A. & Dias, A. L. (2002). Padrões de bandamento cromossômico em *Iringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) com especial ênfase à ocorrência de cromossomos supranumerários. *IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá, PR, p. 64
- 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 a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*, 54: 3: 253-260.
- Collares-Pereira, M. J. & Coelho, M. M. (1989). Polyploidy versus diploidy: a new model for the karyological evolution of Cyprinidae. *Arquivos do Museu Bocage*, 26: 375-383.
- Cuelar, D. & Uyeno, T. (1972). Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics*, 11: 508-515.
- Dias, A. L. & Foresti, F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazil. J. Genet.*, 16: 585-600.
- Fauaz, G. Vicente, V. E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazil. J. Genet.*, 17: 157-163.

- 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, SP.
- Fenocchio, A. S. & Bertollo, L. A. C. (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193- 198.
- Fenocchio, A. S., Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. Camacho, J. P. M. (2000). B chromosomes in two fish species genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biol.*, 48: 105-109.
- Galetti Jr. P. M., & Rasch, E. M. (1993). NOR variability in diploid and triploid forms of the amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A3 staining. *Brazil. J. Genet.*, 16 (4): 927-938.
- Galinski, I. (1956). Difference in response of animal and plant cells to mitotic poisons. *J. Frankling Inst.*, 262: 155-156.
- Giuliano-Caetano, L. & Bertollo, L. A. C. (1990). Karyotypic variability in *Hoplerytinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II Occurrence of natural triploidy. *Brazil. J. Genet.*, 13: 231-237.
- Hochberg, V. B. M. & Erdtmann, B. (1988). Cytogenetical and morphological considerations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – the occurrence of B chromosomes and polymorphical NOR regions. *Brazil. J. Genet.*, 11, 3 : 563-576
- Howell, W. M & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

- Jones, R. N. (1975). B chromosome system in flowering plants and animal species. *Int. Rev. Cytol.*, 40: 1-100.
- LeGrande, 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, H. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Magee, S. & Phillip, D. P. (1982). Biochemical genetic analyses of the grass carp female x bighead carp male F1 hybrid and the parental species. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111 (5): 593-602.
- Maistro, E. L., Dias, A. L., Foresti, F., Oliveira, C. Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia*, 47: 233-239.
- Maistro, E. L., Oliveira, C. & Foresti, F. (2002). Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, silver nitrate and CMA<sub>3</sub> staining and restriction endonuclease banding. *Cytologia*, 67: 25-31.
- Martins, C. & Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.*, 7: 363-367.
- Morelli, S. & Bertollo, L. A. C. (1983). Cytogenetic consideration on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). II Occurrence of natural triploidy. *Caryologia*, 36: 245-250.
- Néo, D. M., Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108 : 211-215.

- Ohno, S. (1974). *Animal cytogenetics*, vol 4. Gebruder Borntraeger. Berlin.
- Pauls, E. & Bertollo, L. A. C. (1983). Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36 : 307-314.
- Pauls, E. & Bertollo, L. A. C. (1990). Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, 81 : 117-123.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2934-2938.
- Portela-Castro, A. L. B., Júlio Jr., H. F. & Nishiyama, P. B. (1999). Ocorrência de cromossomos supranumerários restritos aos machos de *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Paraná (PR): análise do complexo sinaptonêmico. *Resumos do 45º Congresso Nacional de Genética*, Gramado, RS. p.33.
- Roman M. P., Pegararo, J. L. & Margarido, V. P. (2001). Análises citogenéticas em quatro espécies de siluriformes (Pisces), com ênfase ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. CD-ROM, *47º Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia, SP.
- Roman, M. P., Moreira-Filho, O. M. & Margarido, V. P. (2002). O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguaçu e um caso de triploidia natural.. *IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá, p 76.
- Salvador, B. & Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69 : 50-56.

- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and AT rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- Souza, L. & Dias, A. L. (2001). Dados cariotípicos de *Pimelodus* sp. (Pimelodidae, Siluriformes), do Rio Iguaçu, Salto Segredo - PR. CD-ROM, 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia – SP.
- Souza, I. L. & Moreira-Filho, O. (1995). Cytogenetics diversity in the *Astyanax scabripinnis* Species Complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60: 1-11.
- Stivari, M. K. & Martins-Santos, I. C. (2002). Estudos citogenéticos e ocorrência de cromossomo B em *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae) do rio Aguapei, SP, Brasil. IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, PR, p.80.
- Stolf, R. & Dias, A. L. (2001). Análise de bandamento cromossômico de *Imparfinis schubarti* (Pisces, Pimelodidae) de duas populações pertencentes à bacia do Rio Tibagi/PR. CD-ROM, 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp. Cell*, 75: 304-306.
- Swarça, A. C., Giuliano-Caetano, L., Vanzela, A. L. L. & Dias, A. L. (2001, a). Heteromorphism of rDNA size in *Pirinampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) detected by *in situ* hybridization. *Cytologia*, 66 : 275-278.
- Swarça, A. C., Cestari, M. M., Giuliano-Caetano, L. & Dias, A. L. (2001, b). Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaru zungaru* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Science*, 5 : 51-55.

- Swarça, A. C. (2003). Contribuição à citogenética dos Pimelodidae de grande porte: estudos cariotípicos de 4 espécies do “subgrupo” Surubinae. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 149p.
- Toledo, V. & Ferrari, I. (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella sp.* e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. *Científica*, 4: 120-123.
- Troppmair, H. (2000). *Geossistemas e geossistemas paulistas*. EdUNESP, Rio Claro, SP, 107p.
- Vasconcelos, C. & Martins-Santos, I. C. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132: 103-109.
- Varcacel, A., Brunner, P. & Maggese, M. C. (1993). B Chromosome polymorphism in South America catfish *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, 110 : 111-118.
- Venere, P. C. & Galetti Jr., P. M. (1985). Natural triploidy and B chromosome in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae). *Brasil. J. Genet.*, 8 : 681-687.
- 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*, 4: 365-369.
- Vicente, V. E. (2001). *Estudos citogenéticos e moleculares em Parodon hilarii e correlações com outras espécies da família Parodontidae (Pisces, Characiformes)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Vissoto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999, a). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3:1-7.

Vissoto, P. C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999, b). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Telostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 9-13.

White, M. J. D. (1978). *Models of speciation*. W.H. Freeman and Company, São Francisco.

## **5. DISCUSSÃO GERAL**

No presente estudo, foram realizadas análises citogenéticas em 10 espécies pertencentes a 4 famílias de peixes.

Nos riachos Paiol Grande e Ribeirão das Perdizes, afluentes do rio Sapucaí (bacia do Alto Paraná) foram estudadas as seguintes espécies:

### **Parodontidae**

*Parodon tortuosus*

*Parodon sp.*

### **Characidae**

*Astyanax fasciatus*

*Hyphessobrycon anisitsi*

### **Crenuchidae**

*Characidium gomesi*

*Characidium cf. zebra*

Nos riachos Ribeirão Grande e Piracuama, afluentes do rio Paraíba do Sul, foram estudadas as seguintes espécies:

### **Characidae**

*Astyanax parahybae*

*Hyphessobrycon anisitsi*

### **Crenuchidae**

*Characidium lauroi*

*Characidium cf. C. alipioi*

### **Heptapteridae**

*Rhamdia sp.*

No gênero *Characidium*, foram detectadas duas espécies simpátricas no riacho Paiol Grande, pertencente a bacia do alto Paraná (*C. gomesi* e *C. cf. zebra*). Situação semelhante, também foi encontrada para outras duas espécies desse gênero no riacho ribeirão Grande da bacia do Rio Paraíba do Sul (*C. lauroi* e *C. cf. C. alipioi*), todas apresentando cariótipos exclusivos, portanto servindo para caracterizar cada uma dessas espécies. Os estudos também demonstram que o gênero *Characidium* apresentou uma distribuição em pares de espécies equivalentes para as duas bacias hidrográficas estudadas (Capítulo I e II).

Os estudos sobre os Parodontideos demonstraram a inexistência de representantes desse grupo na Bacia do rio Paraíba do Sul. Já para a bacia do rio Paraná, os registros indicavam a existência de apenas uma espécie para o gênero *Parodon* (*P. tortuosus*). No presente estudo, duas formas distintas desse gênero foram descobertas em condições de simpatria e sintopia nos riachos pertencentes à sub-bacia do rio Sapucaí (bacia do Paraná). As análises citogenéticas comparativas mostraram que as estruturas cariotípicas das duas formas são exclusivas. Os estudos taxonômicos nessas duas formas também mostraram diferenças morfológicas significativas entre elas. Assim, os estudos citogenéticos associados aos taxonômicos puderam caracterizar duas espécies, uma identificada como *P. tortuosus* e a outra considerada uma nova espécie, denominada provisoriamente de *Parodon* sp. (Capítulo III).

Estudos comparativos entre duas formas de *Astyanax*, que apresentam pequenas diferenças morfológicas, também apresentaram divergências cromossômicas, como pôde ser observado em *Astyanax fasciatus* da bacia do Alto Paraná e *Astyanax parahybae* (elevada recentemente à espécie) da bacia do rio Paraíba do Sul (Capítulo IV).

A única espécie comum, encontrada no presente estudo, para as duas bacias hidrográficas, foi *Hyphessobrycon anisitsi*. Estudos de sistemática nas populações coletadas nessas distintas bacias considerou os exemplares morfologicamente semelhantes, porém as análises cariotípicas apresentaram alguns marcadores cromossômicos distintos entre as populações, indicando um início de uma diferenciação entre elas (Capítulo V).

Ingenito & Buckup (2003) realizaram um levantamento sistemático e taxonômico da ictiofauna das cabeceiras dos riachos da região sudoeste da Serra da Mantiqueira afluentes do rio Paraíba do Sul e do rio Sapucaí, onde caracterizaram 49 espécies nativas, distribuídas em 11 famílias (Characidae, Crenuchidae, Erythrinidae, Parodontidae, Heptapteridae, Trichomictoridae, Callichthyidae, Loricariidae, Gymnotidae, Poeciliidae e Cichlidae). Para os afluentes do rio Paraíba do Sul foi registrada a presença de 32 espécies pertencentes a 10 famílias e para os afluentes do rio Sapucaí foram registradas 22 espécies pertencentes, também, a 10 famílias. Este levantamento mostrou uma taxa de endemismo de aproximadamente 78%. Das espécies registradas, cerca de 90% não é compartilhada pelas duas bacias e 10% é constituída por espécies de ampla distribuição.

Através da associação dos resultados descritos acima, pelas duas áreas de conhecimento (citogenética e taxonomia) puderam demonstrar que a Serra da Mantiqueira é um divisor de águas muito efetivo e contribuiu significativamente para que as diferenças cromossômicas e morfológicas fossem fixadas independentemente dentro de cada uma dessas bacias hidrográficas, promovendo a diversificação cromossômica e propiciando uma especiação alopátrica.

Após a formação da Serra da Mantiqueira, ocorreram movimentos tectônicos em diferentes épocas, criando novas situações para a fauna ictiológica da região,

tais como: capturas de cabeceiras de pequenos riachos nas bacias hidrográficas ou ainda a quebra de isolamento ecológico ou geográfico que poderiam ter possibilitado o contato de espécies ou populações que estavam em alopatria durante longo período (alopatria transitória). Isto pode ser reforçado com a presença de pares de espécies aparentadas e equivalentes vivendo em condição de simpatria, com presença de caracteres exclusivos, como observado nos casos descritos em *Characidium gomesi* e *Characidium cf. zebra* para a bacia do Alto Paraná (Capítulo I), em *Parodon tortuosus* e *Parodon sp.* para a bacia do Alto Paraná (Capítulo III) e *Characidium lauroi* e *Characidium cf. alipioi* para a bacia do Paraíba do Sul (Capítulo II). Para todos os casos relatados acima, uma das formas que compõe o par de espécies, apresenta um sistema de cromossomos sexuais, o que poderia ter desempenhado um importante papel para o isolamento genético entre elas. Esses dados podem ser indicativos de que uma diversificação cromossômica pode ter ocorrido alopatricamente entre espécies de diferentes riachos de uma mesma bacia hidrográfica e/ou bacias diferentes e posteriormente a quebra do isolamento ecológico e/ou geográfico poderia ter colocado estas espécies em uma condição de simpatria e sintopia.

No presente trabalho também foram descobertos dois novos casos de triploidia natural, um em *Characidium gomesi* (Capítulo I) e outro em *Rhamdia sp.* (Capítulo VI). Na região onde foi realizado esse estudo, já existiam descrições de triploidia natural em *A. scabripinnis* (Fauaz et al., 1994 e Maistro et al., 1994). Assim, visto que a triploidia natural não é um evento tão comum em peixes neotropicais, uma provável hipótese para explicar este evento seria as peculiaridades geomorfológicas e ambientais da região onde estes exemplares foram coletados. Nesta região encontra-se a Serra da Mantiqueira formada por um conjunto de

montanhas, originando um relevo muito acidentado cujas altitudes podem variar de 600 a 2000 metros de altitudes, onde se encontram inúmeros riachos de pequeno porte. Segundo Troppmair (2000), esta região encontra-se sujeita a variações de temperatura durante o ano, além de ser uma região que apresenta um alto grau de chuvas de relevo com granizo. As cabeceiras dos riachos apresentam pouco volume de água, assim a chuva de granizo poderia baixar rapidamente a temperatura da água. Coincidentemente, estas chuvas são frequentes durante o período que ocorre à época de reprodução destas espécies, podendo provocar um choque térmico durante a desova, criando condições para a formação de triploídes naturais, como sugerido para experimentos artificiais.

Portanto, o presente estudo propiciou a descoberta e caracterização cromossômica de uma nova espécie de peixe para os rios do Estado de São Paulo, descrições de três novos casos de sistemas de cromossomos sexuais (ZZ/ZW), dois casos de triploidia natural, na contribuição da caracterização da ictiofauna regional, além de fornecer um modelo de estudo para ictiofaunas de regiões limítrofes de bacias hidrográficas adjacentes.

## 6. CONCLUSÕES

Através dos estudos citogenéticos, realizados no presente trabalho, pode-se concluir que:

- as ictiofáunulas são exclusivas para cada uma das bacias hidrográficas;
- a Serra da Mantiqueira representa uma efetiva barreira biogeográfica para as ictiofáunulas das bacias do rio Sapucaí e do rio Paraíba do Sul;
- os isolamentos geográfico e genético contribuíram para que as bacias hidrográficas adjacentes tivessem seus pares de espécies equivalentes;
- os sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, provavelmente desempenham um importante papel para a manutenção da condição de simpatria detectada para algumas espécies;
- as baixas repentinas da temperatura dos riachos, ocasionadas por chuvas de relevo com granizo, pode estar influenciando na incidência de casos de triploidia natural.
- a descoberta e caracterização cromossômica de uma nova espécie de peixe para o rio Sapucaí, denominada provisoriamente de *Parodon* sp.;

## 7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerde* (Pisces, Erythrinidae). *Brasil. J. Genet.* (1): 103-120.
- Bohlke, J. E., Weitzman, S. H. & Menezes, N. A. (1978). Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica* 8 (4): 657-677.
- Caramaschi, E. M. P. (1986). Distribuição da ictiologia de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43: 53-73.
- Carvalho, G. R., Shaw, P. W., Magurram, A. E. & Seghers, B. H. (1991). Marked genetic divergence revealed by allozymes among populations of the guppy *Poecilia reticulata* (Poeciliidae), in Trinidad. *Biol. J. Linnean Soc.* 42: 389-405.
- Fauaz, G. Vicente, V. E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 17: 157-163.
- Garutti, V. (1988). Morfologia, reprodução e aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do rio Paraná. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of the nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

- Ingenito, L. F. S. & Buckup, P. A. (2003). A ictiofauna do sudoeste da Serra da Mantiqueira. *XV Encontro Brasileiro de Ictiologia*, São Paulo, UPM SB1, 1 CD.
- Klinkhard, M., Tesche, M. & Greven, H. (1995). Database on fish chromosomes. *Westarp Wissenschaften*. 237p.
- Langeani-Neto, F. (1989). *Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): Taxonomia*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da USP, São Paulo,
- Lima, R. S. Ictiofauna do alto curso do rio Paraíba do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 222p.
- Lowe-McConnell, R. H. (1969). Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol. J. Linnean Soc.* 1: 51-75.
- Lowe-McConnell, R. H. (1987). Ecological studies in tropical fish communities diversity: its maintenance and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maistro, E. L., Dias, A. L., Foresti, F., Oliveira, C. Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia* 47: 233-239.
- Martins C. & Galetti Jr. P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363-367.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazil. J. Genet.* 14 (2): 331-357.
- Nelson, J. S. (1994) Fishes of the world. John Wiley & Sons, New York. 600p.
- Ozouf-Costaz, C. & Foresti, F. (1992). Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. *Netherlands J. Zoology* 42(2-3): 277-290.

- Pinkel, D., Straume T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2934-2938.
- 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.; R.E.Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipurcs, 603.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosome and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma (Berl.)* 80: 69-96.
- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 27: 190-193.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.
- Troppmair, H. (2000). *Geossistemas e geossistemas paulistas*. EdUNESP, Rio Claro, SP, 107p.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, London. P.315-322.