

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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ALGUMAS ESPÉCIES DE PEIXES EM UMA  
REGIÃO DE DIVISOR DE ÁGUAS ENTRE RIACHOS DE BACIAS  
HIDROGRÁFICAS DISTINTAS**

Aluna: Maressa Ferreira Neto

São Carlos

2008

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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ALGUMAS ESPÉCIES DE PEIXES EM UMA  
REGIÃO DE DIVISOR DE ÁGUAS ENTRE RIACHOS DE BACIAS  
HIDROGRÁFICAS DISTINTAS**

Aluna: Maressa Ferreira Neto

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

São Carlos

2008

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

F383ac

Ferreira Neto, Maressa.

Análise citogenética em algumas espécies de peixes em uma região de divisor de águas entre riachos de bacias hidrográficas distintas / Maressa Ferreira Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Citogenética de peixes. 2. Cromossomos B. 3. Citogenética - peixes neotropicais. 4. Polimorfismo. I. Título.

CDD: 597.087322 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
Via Washington Luís, Km 235 - Caixa Postal 676  
CEP 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil  
<http://www.ppggev.ufscar.br>  
e-mail [ppggev@power.ufscar.br](mailto:ppggev@power.ufscar.br)  
Fone/Fax: (0XX16) 3351-8306

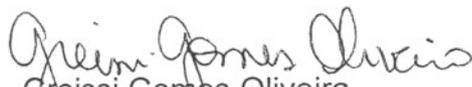


Assinalar se houver mudança de título sim( ) não (X)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Encerrou-se a reunião às 17h00, nada mais havendo a tratar, eu, Greissi Gomes Oliveira, secretariei a referida reunião, redigi e assino a presente Ata que, após lida e aprovada, será assinada pelo presidente e pelos demais membros da Banca Examinadora.

São Carlos, 25 de agosto de 2008.

  
Greissi Gomes Oliveira  
Assistente em Administração

  
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
(Presidente)



  
Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

  
Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano

  
Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

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

**“ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ALGUMAS ESPÉCIES DE PEIXES  
EM UMA REGIÃO DE DIVISOR DE ÁGUAS ENTRE RIACHOS DE  
BACIAS HIDROGRÁFICAS DISTINTAS”**

Dissertação de Mestrado de Maressa Ferreira Neto

Orientador: Orlando Moreira Filho

Co-orientador: Marcelo Ricardo Vicari

Dedico este trabalho aos meus pais Janete e Luiz Carlos

## AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos vão para todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, seja de ajuda profissional, financeira ou psicológica, direta ou indiretamente.

Primeiramente agradeço aos meus pais, Janete e Luiz Carlos, que sempre me incentivaram a crescer e vibraram com minhas conquistas, participando lealmente de todos os passos e investindo financeiramente em minha carreira.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, por ter depositado em mim sua confiança e dedicação e me oferecido a chance de iniciar uma fase importante em minha vida.

Ao meu amigo de trabalho Wellington, quem me ensinou tudo no começo, sendo um grande orientador, e a minha amiga Rosângela, quem me apoiou e me orientou muito principalmente nos passos finais. Aos demais colegas de trabalho e laboratório, Thaís, Daniel, Daniel Blanco, Elisângela, Viviane, Karina, Celeste, Débora, Ernani, Liano, Roberto, Marceléia, Juliana, Josiane, que me ajudaram e me ensinaram muito.

Ao meu namorado Pedro, pelos muitos finais de semana me ajudando no laboratório, pela paciência com os momentos de nervosismo e pelo apoio de todo dia. Aos meus amigos de infância, que sempre me incentivaram e me elogiaram por cada conquista.

Ao meu Co-Orientador Marcelo Vicari, por sua disposição em ajudar e por sua participação indispensável na confecção e término do meu trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e a todos os professores participantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), a qual foi muito importante durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e auxílio durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

...É na experiência da vida, que o homem evolui....

## Resumo

Estudos citogenéticos em peixes de rios de cabeceiras têm contribuído significativamente com a citotaxonomia e citossistemática. Entretanto, pouco se conhece sobre essa diversidade na grande maioria das bacias hidrográficas, principalmente entre populações de cabeceiras de bacias adjacentes, proximamente situadas, como ocorre na área de proteção ambiental (APA) de Corumbataí, São Carlos - SP. Dessa forma, procurou-se realizar uma análise cariotípica comparativa entre populações de diversas espécies de peixes do ribeirão do Feijão, afluente do rio Jacaré-Guaçu, bacia do Médio Tietê, e do ribeirão do Pântano, bacia do rio Mogi-Guaçu, associando os dados citogenéticos com aspectos evolutivos e dispersão de espécies na região. Foram estudadas espécies pertencentes a 5 famílias: Characidae (*Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus*, *Moenkhausia sanctafilomenae*); Curimatidae (*Cyphocharax modestus*); Prochilodontidae (*Prochilodus lineatus*); Cichlidae (*Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma facetum*); e Gymnotidae (*Gymnotus carapo*, *Eigenmannia* sp.). As espécies *Geophagus brasiliensis*, *Gymnotus carapo* e *Astyanax altiparanae* foram caracterizadas através de técnicas citogenéticas básicas e moleculares com o objetivo de verificar as semelhanças e/ou possíveis alterações cromossômicas ocorridas entre as espécies que se encontram em alopatria, enquanto em todas as outras foram abordados problemas específicos inerentes a apenas uma população. Foi constatada uma grande similaridade para a macroestrutura cariotípica entre as populações de *G. brasiliensis* e *Gymnotus carapo* nas duas regiões estudadas. No entanto, na espécie *A. altiparanae* diferenças puderam ser detectadas na fórmula cariotípica e no número dos sítios ribossomais 18S encontrados. Dessa forma, os dados obtidos para *G. brasiliensis* e *G. carapo* indicam que, apesar destas populações estarem separadas por um divisor de águas, ocorre uma manutenção da macroestrutura cariotípica, possivelmente sendo reflexo da estabilidade cariotípica desta espécie. Já em *A. altiparanae* pode ser observado um certo grau de divergência evolutiva entre as populações analisadas, resultado da restrição ao fluxo gênico.

## ABSTRACT

Cytogenetics studies in headwaters fishes have contributed significantly to the cytotaxonomy and cytosystematics of these organisms. However, little is known about this diversity in the vast majority of river basins, especially among populations of adjacent basin headwaters, as it occurs in the Corumbataí area of environmental protection (Área de Proteção Ambiental – APA – Corumbataí), São Carlos city, São Paulo state. This way, an attempt was made to perform a comparative karyotypic analysis among the populations of many fishes of the Feijão upstream, tributary of Jacaré-Guaçu river, Tietê basin, and the Pântano upstream, tributary of Mogi-Guaçu basin, associating the cytogenetic data with the evolutionary aspects and the dispersal of the species in the region. Were studied species belongs of five Pisces families: Characidae (*Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus*, *Moenkhausia sanctafilomenae*); Curimatidae (*Cyphocharax modestus*); Prochilodontidae (*Prochilodus lineatus*); Cichlidae (*Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma facetum*); and, Gymnotidae (*Gymnotus carapo*, *Eigenmannia* sp.). The *Geophagus brasiliensis*, *Gymnotus carapo* and, *Astyanax altiparanae* species were characterized using basic and molecular cytogenetics tools aiming to verify the similarities and/or the chromosomal changes occurred between allopatric species, while in the others were observed inherent specific problems only in one population. A great similarity of the karyotypic macrostructure was observed between *G. brasiliensis* and *Gymnotus carapo* populations in both regions studied. However, in *A. altiparanae* specie differences were detected in the karyotypic formulae and in the number of 18S ribosomal sites. So, the data obtained to *G. brasiliensis* and *G. carapo* indicate that despite they are separated by waters divisors, occurred the maintenance of a very similar karyotypic macrostructure, possibly reflecting a karyotypic stability of this specie. However, in *A. altiparanae* specie we can observe a certain degree of evolutionary divergence between the analyzed populations, resulted of a flow gene restriction.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 01 - Bacias do ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano.....  | 17 |
| Figura 02 - Figura 2: Espécies analisadas coletadas no ribeirão do Feijão: a) <i>Astyanax altiparanae</i> ; b) <i>Astyanax fasciatus</i> ; c) <i>Gymnotus carapo</i> d) <i>Geophagus brasiliensis</i> .....  | 19 |
| Figura 03 - Figura 3: Espécies analisadas coletadas no ribeirão do Pântano: a) <i>Astyanax altiparanae</i> ; b) <i>Ciclossoma facetum</i> ; c) <i>Cyphocharax modestus</i> d) <i>Eigenmannia sp.</i> ; e) <i>Geophagus brasiliensis</i> ; f) <i>Gymnotus carapo</i> ; g) <i>Moenkhausia sanctafilomenae</i> ; h) <i>Prochilodus lineatus</i> ..... | 20 |
| Figura 04 - Cariótipo de macho de <i>Astyanax altiparanae</i> do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....   | 28 |
| Figura 05 - Cariótipo de fêmea de <i>Astyanax altiparanae</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....  | 29 |
| Figura 06 - Cromossomos mitóticos de <i>Astyanax altiparanae</i> submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S (a) *metáfase incompleta e 5S (b) do ribeirão do Feijão.....   | 30 |
| Figura 07 - Cromossomos mitóticos de <i>Astyanax altiparanae</i> submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b) *metáfase ncompleta do ribeirão do Pântano.....  | 30 |
| Figura 08 - Cariótipo de fêmea <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....  | 33 |
| Figura 09 - Cariótipo de macho de <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....  | 34 |
| Figura 10 - Cromossomos mitóticos de <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Feijão submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....   | 35 |
| Figura 11 - Cromossomos mitóticos de <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....  | 35 |
| Figura 12 - Cariótipo de fêmea <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....   | 38 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 13 - Cariótipo de macho <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....                                      | 39 |
| Figura 14 - Cromossomos mitóticos de <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Feijão submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....  | 40 |
| Figura 15 - Cromossomos mitóticos de <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....   | 40 |
| Figura 16 - Cariótipo de macho de <i>Astyanax fasciatus</i> do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....                                 | 50 |
| Figura 17 - Cromossomos mitóticos de <i>Astyanax fasciatus</i> submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b) do ribeirão do Pântano.....  | 51 |
| Figura 18 - Cariótipo de macho de <i>Cichlasoma facetum</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....                                | 53 |
| Figura 19 - Cromossomos mitóticos de <i>Cichlasoma facetum</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....  | 54 |
| Figura 20 - Cariótipo de macho de <i>Cyphocharax modestus</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....                              | 57 |
| Figura 21 - Cromossomos mitóticos de <i>Cyphocharax modesta</i> submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) *metáfase incompleta e 5S (b) *metáfase incompleta do ribeirão do Pântano..... | 58 |
| Figura 22 - Cariótipo de fêmea de <i>Eigenmannia sp.</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....                                   | 61 |
| Figura 23- Cromossomos mitóticos de <i>Eigenmannia sp.</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....  | 62 |
| Figura 24 - Cariótipo de fêmea <i>Moenkhausia</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b).....  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25 - Cromossomos mitóticos de <i>Moenkhausia sanctafilomenae</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....      | 66 |
| Figura 26 - Cariótipo de fêmea de <i>Prochilodus lineatus</i> do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a), NOR (box) e distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C (b)..... | 68 |
| Figura 27 - Cromossomos mitóticos de <i>Prochilodus lineatus</i> do ribeirão do Pântano submetidos à hibridação fluorescente <i>in situ</i> com sondas de rDNA 18S(a) e 5S (b).....             | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 01 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Astyanax altiparanae</i> do ribeirão do Feijão.....         | 27 |
| Tabela 02 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Astyanax altiparanae</i> do ribeirão do Pântano.....        | 27 |
| Tabela 07 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Feijão.....       | 49 |
| Tabela 08 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Geophagus brasiliensis</i> do ribeirão do Pântano.....      | 52 |
| Tabela 09 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Feijão.....              | 56 |
| Tabela 10 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Gymnotus carapo</i> do ribeirão do Pântano.....             | 37 |
| Tabela 03 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Astyanax fasciatus</i> do ribeirão do Feijão.....           | 51 |
| Tabela 04 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Cyphocharax modestus</i> do ribeirão do Pântano.....        | 54 |
| Tabela 05 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Cichlasoma facetum</i> do ribeirão do Pântano.....          | 58 |
| Tabela 06 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Eingenmannia sp.</i> do ribeirão do Pântano.....            | 60 |
| Tabela 11 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Moenkhausia sanctafilomenae</i> do ribeirão do Pântano..... | 64 |
| Tabela 12 - Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de <i>Prochilodus lineatus</i> do ribeirão do Pântano.....        | 67 |

## SUMÁRIO

|   |  |
|---|--|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>   |
| 1.1. Estudos citogenéticos em peixes .....  | 1                                      |
| 1.2. Características das bacias hidrográficas do ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano.....  | 2                                      |
| 1.3. Estudos citogenéticos em Characidae.....   | 3                                      |
| 1.4. Estudos citogenéticos em Cichlidae.....  | 7                                      |
| 1.5. Estudos citogenéticos em Curimatidae.....  | 9                                      |
| 1.6. Estudos citogenéticos em Prochilodontidae.....   | 10                                     |
| 1.7. Estudos citogenéticos em Gymnotiformes.....  | 11                                     |
| 1.8. Estudos citogenéticos e de biodiversidade.....   | 12                                     |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.14</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>16</b>                              |
| 3.1. Locais de Coleta.....  | 16                                     |
| 3.2. As espécies estudadas.....   | 18                                     |
| 3.3. Metodologias.....  | 21                                     |
| 3.3.1. Indução de metáfase.....   | 21                                     |
| 3.3.2. Preparação de cromossomos mitóticos.....   | 21                                     |
| 3.3.3. Bandamento C.....  | 22                                     |
| 3.3.4. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs).....  | 23                                     |
| 3.3.5. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....   | 23                                     |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>25</b>                              |
| Capítulo I: Estudos citogenéticos comparativos entre espécies coletadas no ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano.....                | 25                                     |
| 4.1. <i>Astyanax altiparanae</i> .....  | 25                                     |
| 4.2. <i>Geophagus brasiliensis</i> .....  | 31                                     |
| 4.3. <i>Gymnotus carapo</i> .....   | 36                                     |
| Capítulo II: Estudos citogenéticos inerentes a apenas uma das duas localidades estudadas, ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano..... | 48                                     |
| 4.4. <i>Astyanax fasciatus</i> .....  | 48                                     |
| 4.5. <i>Cichlasoma facetun</i> .....  | 52                                     |
| 4.6. <i>Cyphocharax modestus</i> .....  | 55                                     |
| 4.7. <i>Eigenmannia sp.</i> .....   | 59                                     |
| 4.8. <i>Moenkhausia sanctafilomenae</i> .....   | 63                                     |
| 4.9. <i>Prochilodus lineatus</i> .....  | 67                                     |
| <b>5. CONCLUSÕES</b> .....  | <b>81</b>                              |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>84</b>                              |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Estudos citogenéticos em peixes**

Os peixes são um grupo entre os vertebrados que possuem enorme diversidade de formas e grande interesse para estudos de variabilidade genética e de evolução (NELSON, 1984). Recentemente, a citogenética de peixes neotropicais tem disponibilizado importantes informações a respeito da fixação de rearranjos cromossômicos que auxiliam na identificação de espécies crípticas por meio da análise citotaxonômica (BERTOLLO *et al.*, 1978; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; CENTOFANTE *et al.*, 2003). Até o final dos anos 70, pouco se conhecia sobre as características citogenéticas da ictiofauna neotropical. Os dados limitavam-se ao conhecimento do número cromossômico de algumas poucas espécies, muitas das quais obtidas de espécimes de origem geográfica desconhecida (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1978).

Nos últimos anos, houve um grande desenvolvimento dos estudos citogenéticos, principalmente no que se refere às espécies que habitam a calha principal de rios e ambientes lênticos, no entanto, são raros os trabalhos relativos a ambientes de cabeceiras de rios. Alguns poucos exemplos estão restringidos a levantamentos faunísticos, abordagens taxonômicas ou distribuição longitudinal de espécies (CARAMASCHI, 1986; GARUTTI, 1988; LANGEANI-NETO, 1989).

Os peixes Neotropicais possuem ampla variabilidade cariotípica (OLIVEIRA *et al.*, 1988). Recentemente os dados estimam ao redor de 2.600 espécies com cariótipos conhecidos (OZOUF-COSTAZ & FORESTI, 1992). Nas duas últimas décadas, a citogenética tem contribuído para o conhecimento dos nossos peixes, somando informações e descobertas

relativas a processos evolutivos nesse grupo como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies/populações (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Estudos citogenéticos comparativos entre populações de bacias hidrográficas distantes e proximamente situadas em região de divisores de águas tem possibilitado formular hipóteses de evolução cariotípica, dispersão de espécies, biogeografia, além de ter ampla aplicação em análises citotaxonômicas (CENTOFANTE *et al.*, 2003; VICARI *et al.*, 2006). Este tipo de análise, quando bem elaborada, tem apresentado uma maior sensibilidade na comparação cariotípica entre as populações por restringir a área estudada e realmente detectar as possíveis diferenças entre populações que evoluíram em bacias hidrográficas distintas, embora em um transecto geográfico estreito.

## **1.2. Características das bacias hidrográficas do ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano**

Dentre as bacias do alto rio Paraná, a sub-bacia do rio Mogi-Guaçu é uma das mais conhecidas tratando-se de sua ictiofauna. O local de coleta do presente trabalho, ribeirão do Pântano, se localiza no curso médio do ribeirão, próximo a Descalvado e Usina Ipiranga, a aproximadamente 560m de altitude. O local possui sombreamentos espaçados em virtude de a margem direita preservar árvores e arbustos remanescentes na vegetação ribeirinha, enquanto que na margem esquerda se encontra criação de gado no pasto. Fragmentos de vegetação nativa circundam a área e a profundidade do rio é

variável, estando entre 0,45m até 1,90m, apresentando trechos de sedimentação no fundo.

O ribeirão do Feijão, que nasce no alto da Serra do Cruzeiro, junto com o ribeirão do Lobo, forma o rio Jacaré-Guaçu. O principal uso da terra é em pastagens para criação de gado e agricultura com culturas de café, cana-de-açúcar, citrus e milho. Ocorrem algumas áreas de reflorestamento com Pinus e Eucalyptus e áreas cobertas por vegetação natural de campo e cerrado (TEIXEIRA, 1993).

### **1.3. Estudos citogenéticos em Characidae**

A família Characidae pertence à ordem Characiformes, que, sem dúvida, é a ordem notavelmente mais numerosa e diversa entre os Ostariophysi, e apresenta uma grande variedade na forma do corpo, estrutura mandibular, dentição e anatomia interna (NELSON, 1994). Está presente em praticamente todos os ambientes de água doce, desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul da Argentina (LUCENA, 1993).

Fazem parte desta família peixes que são vulgarmente conhecidos por pacus, dourados, lambaris, matrinchãs, peixe-cachorro entre vários outros. Tais peixes são de fácil captura devido à grande abundância de espécies. No território brasileiro estão descritas mais de 400 espécies de Characidae (BRITSKY *et al.*, 1988) de hábitos diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros), onde exploram uma grande variedade de habitats.

Apesar do grande número de espécies, muitas delas eram relatadas como abundantes em seus habitats naturais. Hoje, apresentam grande risco de desaparecer, sem ao menos serem feitos estudos com enfoque biológico e econômico. Diante disso, a destruição de habitat ou mesmo introdução de

espécies exóticas representam alguns dos principais fatores da diminuição da diversidade dos ambientes aquáticos na região Neotropical (SUNAGA & VERANI, 1991; ORSI & AGOSTINHO, 1999; BOJSEN & BARRIGA, 2002; LATINI & PETRERE JR., 2004).

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

Rearranjos Robertsonianos e não-Robertsonianos podem estar igualmente envolvidos nos processos de variação cariotípica em peixes (GALETTI *et al.*, 1994). Nos casos em que não ocorrem mudanças no número diplóide, inversões pericêntricas podem estar predominando na evolução cromossômica (CESTARI & GALETTI, 1992a), além das inversões paracêntricas, mais difíceis de serem identificadas pelas técnicas citogenéticas convencionais.

Em relação aos polimorfismos estruturais, poucos exemplos são referidos em *Serrasalmus spilopleura* (NAKAYAMA *et al.*, 2000; CENTOFANTE *et al.* 2002) em *Astyanax altiparanae* (PACHECO *et al.* 2001); *Bryconamericus aff. exodon* (PAINTER-MARQUES *et al.* 2002), *Moenkhausia sanctafilomenae* (FORESTI *et al.*, 1989), *Piabina argentea* (WASKO, 1993), em *Serrapinnus heterodon* (PERES *et al.* 2007) e *Tetragonopterus chalceus* (PORTELA *et al.* 1988).

Com relação a polimorfismo numérico, resultados similares têm sido encontrados principalmente em espécies do gênero *Astyanax* (MATOSO *et al.*, 2002; ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006, entre outros).

A ocorrência de cromossomos supranumerários em várias espécies é um aspecto bastante relevante para a família Characidae, como em *Astyanax bockmanni* (FAUAZ *et al.*, 1994), *Astyanax scabripinnis* (MAISTRO *et al.*, 1992; VICENTE *et al.*, 1996; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004), *Astyanax schubarti* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001) *Moenkhausia intermedia* (PORTELA *et al.*, 1988), *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI *et al.*, 1989; PORTELA-CASTRO *et al.*, 2000, DANTAS *et al.*, 2007), *Oligosarcus pinto* (FALCÃO *et al.*, 1984) e *Piabina argentea* (WASKO, 1993). Estes cromossomos demonstram considerável variação nesta ordem em relação ao tamanho, morfologia e número (CARVALHO, 2008).

Em peixes Neotropicais de água doce são encontradas mais de 61 espécies com a presença de cromossomos Bs supranumerários, distribuídos em 16 famílias de 7 diferentes ordens e inseridos em distintas bacias hidrográficas (CARVALHO, 2008). Os microcromossomos B são mais comuns em relação à presença de macrocromossomos supranumerários. No entanto, foram descritos macrocromossomos Bs para várias espécies do complexo *Astyanax scabripinnis*, variando tanto em morfologia quanto em número (MOREIRA –FILHO *et al.* 2004; CARVALHO, 2008).

A ocorrência de triploidia natural já foi descrita para algumas espécies da família Characidae, sendo encontrada no gênero *Astyanax* a maioria das recorrências, entre as quais *A. schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983), *A. scabripinnis* (DIAS *et al.*, 1992; FAUAZ *et al.*, 1994; MAISTRO *et al.*, 1994), *A.*

*fasciatus* (MALACRIDA *et al.*, 2000), *A. bockmanni* (FAUAZ *et al.*, 1994). Também tem sido visualizada em outros gêneros: *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* (CARVALHO *et al.*, 1990).

Cromossomos sexuais diferenciados não estão presentes na base da filogenia de peixes. A maioria das espécies são homomórficas em relação a cromossomos sexuais. A hipótese mais amplamente aceita é que uma espécie ou gênero que possui sistema de cromossomos sexuais diferenciado tem sua origem independente de outra espécie ou gênero diferente. Neste modelo, esta hipótese é corroborada pela ampla diversidade de sistemas de cromossomos sexuais em peixes, onde há ocorrência de sistemas simples e múltiplos com heterogametia masculina e feminina (BERTOLLO *et al.*, 2000; ARTONI & BERTOLLO, 2002; CENTOFANTE *et al.*, 2003; VICARI *et al.*, 2006a).

Sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados também já têm sido descritos na família Characidae. No gênero *Triportheus*, todas as espécies do gênero apresentam o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (BERTOLLO & CAVALLARO, 1992; ARTONI *et al.*, 2001; ARTONI & BERTOLLO, 2002; DINIZ *et al.*, 2008), em *Odontostilbe paranensis* (WASKO *et al.*, 2001) e recentemente em *Serrapinnus notomelas* (SANTI-RAMPAZZO *et al.*, 2007).

Em decorrência da grande variabilidade cariotípica em relação às regiões organizadoras de nucléolo (RONs), tanto no número como nos cromossomos portadores, podem ser estabelecidas diferenças evidentes entre espécies de Characidae (GALETTI, 1998), sendo marcadores amplamente utilizados na citotaxonomia.

Os fluorocromos base específicos são outros marcadores utilizados em citogenética comparativa de peixes. Nesse grupo, os sítios de RONS podem ser mitramicina ou cromomicina A<sub>3</sub> positivos por apresentar seqüências de DNA GC ricas interespaçadas aos genes do rDNA maior (PENDÁS *et al.*, 1993). Em Characidae, na grande maioria das vezes há uma coincidência na localização entre as marcações obtidas por fluorocromos GC específicos e as Ag-RONS (GALETTI & RASH, 1993; GALETTI *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 1996, VICARI *et al.*, 2008a). No entanto, alguns cuidados são requeridos ao afirmar que sinais Cromomicina A<sub>3</sub> ou Mitramicina são sítios de RONS, pois em alguns casos estes fluorocromos apresentam resultados discordantes e não se relacionam com Ag-NORs (ARTONI *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2001; VICARI *et al.*, 2008b).

#### **1.4. Estudos citogenéticos em Cichlidae**

Entre os Teleostei, Perciformes é a ordem mais abundante em espécies, sendo o principal habitat de 14% dessas espécies o ambiente de água doce. Atualmente foram obtidos dados cariotípicos apenas de 50 famílias dentre as 150 existentes em Perciformes (BRUM, 1995). O número diplóide 2n=48 cromossomos e número fundamental NF=48, composto por cromossomos acrocêntricos indicam ser características plesiomórficas em Perciformes (BRUM & GALETTI, 1997).

A família Cichlidae tem sido relativamente bem estudada em termos de cariótipo (FELDBERG & BERTOLLO, 1984). O cariótipo composto por 48 cromossomos acrocêntricos é o mais freqüente entre os ciclídeos, entretanto este número pode variar de 2n=32 a 2n=60 cromossomos (FELDBERG *et al.*,

2003). As inversões pericêntricas são consideradas os principais rearranjos a gerar diversificação no número fundamental ancestral dos Perciformes (GALETTI JR. *et al.*, 2000; AFFONSO & GALETTI Jr., 2005).

Em geral, Ciclídeos africanos possuem número diplóide de  $2n=44$  cromossomos, variando de 32 a 48 cromossomos e número fundamental de 44 a 88. Os Ciclídeos neotropicais por sua vez apresentam número diplóide de  $2n=48$  cromossomos, variando de 38 a 60 e número fundamental variando de 44 a 118 (FELDBERG *et al.*, 2003).

As espécies *Geophagus brasiliensis* e *Cichlasoma facetum* tratam-se de duas das espécies mais comuns de Ciclídeos no Sul e Sudeste do Brasil, sendo encontrada em grande diversidade de biomas e apresentando em alguns casos diferenças morfológicas marcantes entre populações a ponto de sugerir espécies diferentes, sugerindo um provável complexo de espécies para este grupo (BRUM *et al.*, 1998).

A família Cichlidae, com raras exceções possui a característica de apresentar apenas um par cromossômico portador de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) presentes em cromossomos relativamente grandes (FELDBERG *et al.*, 2003), indicando a um provável simplesiomorfismo para esse grupo (FELDBERG & BERTOLLO, 1985, VICARI *et al.*, 2006b). Polimorfismos estruturais em relação ao tamanho das RONs são encontrados em algumas populações de *Geophagus brasiliensis* (VICARI *et al.*, 2006b) e *Crenicichla iguassuensis* (MIZOGUCHI *et al.*, 2007).

### 1.5. Estudos citogenéticos em Curimatidae

A família Curimatidae compreende um conjunto de espécies extremamente abundantes de peixes Neotropicais (GIORA & FIALHO, 2003). Estão inclusos cerca de 8 gêneros e mais de 140 espécies (VARI, 1988). Estudos citogenéticos de peixes Neotropicais têm demonstrado grande diversidade cromossômica (GIORA & FIALHO, 2003). No entanto, Curimatidae trata-se de um grupo que apresenta estabilidade macro-estrutural que permite inferir um caminho evolucionário para a família (GALETTI Jr. *et al.*, 1994).

Alguns estudos sugerem que a família Curimatidae trata-se de um grupo diversificado com divergência evolucionária que não demonstra grandes transformações em sua estrutura cariotípica (VENERE & GALETTI, 1989). Mais de 70% das espécies estudadas apresentam número diplóide de 54 cromossomos, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e número fundamental igual a 108 (NAVARRETE & JULIO Jr., 1997)

Curimatidae, Anostomidae, Chilodontidae e Prochilodontidae, são considerados um grupo monofilético (VARI, 1983), apresentando um conservado número de 54 cromossomos, sugerindo ter vindo de um ancestral comum (BRUM & GALETTI, 1997; VENERE, 1998). Também possuem alta similaridade cariotípica, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e número fundamental (NF) =108 (NAVARRETE & JULIO Jr., 1997).

Algumas divergências relacionadas a rearranjos cromossômicos podem ser observadas em algumas espécies de Curimatidae (VENERE & GALETTI, 1989; FELDBERG *et al.*, 1992; NAVARRETE & JULIO Jr., 1997) onde podem ser observados diferentes padrões de distribuição de heterocromatina e RONS entre as diferentes espécies de Curimatidae (BRASSESCO *et al.*, 2004).

## 1.6. Estudos citogenéticos em Prochilodontidae

A família Prochilodontidae apresenta aproximadamente 35 espécies de peixes, 24 destas pertencendo ao gênero *Prochilodus* (NELSON, 1994). *Prochilodus lineatus* trata-se de uma espécie muito abundante no alto da bacia do rio Paraná, especialmente encontrados nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (GODOY, 1975). Dados citogenéticos obtidos por Paus & Bertollo (1990) demonstraram indivíduos de 10 espécies de *Prochilodus* contendo  $2n=54$  cromossomos meta/submetacêntricos. Estes dados citogenéticos demonstram uma estrutura cariotípica conservada, sendo encontrados cromossomos B em duas dessas espécies, *P. lineatus* e *P. cearensis*. A presença de cromossomos B é comumente reportada em algumas espécies de *Prochilodus* (PAULS & BERTOLLO, 1990, ARTONI *et al.*, 2006) e encontrados polimorfismos em populações analisadas por Cavallaro *et al.* (2000), apresentando variações intra e interindividuais (JESUS *et al.*, 2003)

Também são encontrados polimorfismos populacionais de RONS em *P. cearensis* (CAVALLARO *et al.* 2000) e em *P. lineatus* (VICARI *et al.*, 2006). Análises das regiões organizadoras de nucléolo no gênero *Prochilodus* revelam que a RON está localizada na região intersticial do braço longo de um par cromossômico metacêntrico grande (PAULS & BERTOLLO, 1990, VICARI *et al.*, 2006). Pauls & Bertollo (1990) também descrevem um terceiro cromossomo metacêntrico com sítios ativos de RON na região telomérica para as espécies *P. argenteus* e *P. costatus*.

### 1.7. Estudos citogenéticos em Gymnotiformes

A família Gymnotidae é uma das mais bem distribuídas na região Neotropical (MAGO-LECCIA, 1994), sendo bem conhecida na bacia Amazônica (ALBERT *et al.*, 1999).

Na subordem Gymnoidei têm sido realizados vários estudos citogenéticos com ampla diversidade cariotípica, apresentando diferenças de estrutura e número cromossômico, como encontrado em *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO, 1978; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1984; ALMEIDA-TOLEDO, 1998) e *Gymnotus* (FORESTI *et al.*, 1994). Sistema de cromossomos sexuais não é uma característica geral deste grupo, estando restrito somente a algumas espécies do gênero *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000), *Brachypopomus pinicaudatus* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000b) e *Gymnotus* (SILVA & MARGARIDO, 2005).

*Gymnotus* trata-se do gênero com uma distribuição geográfica bem mais ampla dentre os Gymnotiformes, existindo desde o Rio Salado nos Pampas da Argentina ao Rio San Nicolas no sudeste do México. Também está presente em águas continentais na região de países da América Central, exceto em Belize e no Chile na América do Sul (ALBERT, 2001). *Gymnotus* possui grande diversidade na Bacia Amazônica, onde 18 espécies são conhecidas, incluindo três formas não descritas (ALBERT *et al.*, 2005).

Uma única espécie de *Gymnotus* (*Gymnotus* sp.) foi descrita como contendo sistema de cromossomos sexuais múltiplos, e uma alta conservação citogenética intraespecífica foi observada em diferentes populações de *Gymnotus* (FORESTI *et al.*, 1994, FERNADES-MATIOLI *et al.*, 1998;

FERNANDES *et al.*, 2005, SILVA & MARGARIDO, 2005). Na espécie *G. carapo* foi descrito um caso de triploidia natural (FERNANDES-MATIOLI *et al.*, 1998) e uma ampla variabilidade de NORs algumas populações (FERNANDES-MATIOLI *et al.*, 1997). Recentemente, Albert e Cramptom (2003) redefiniram uma população de *Gymnotus* como uma nova espécie, denominada *G. paraguensis*.

### **1.8. Estudos citogenéticos e de biodiversidade**

Publicações a respeito da citogenética evolutiva de peixes têm aumentado consideravelmente, principalmente no que se refere às espécies habitantes da calha de rios e ambientes lênticos, porém, trabalhos relativos a ambientes de cabeceiras são raros (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Moreira-Filho & Bertollo (1991) realizaram estudos com *Astyanax scabripinnis* nas cabeceiras dos afluentes do Alto Paraná e do rio São Francisco, enfatizando a importância das regiões de cabeceiras de rios atuando como barreiras geográficas, proporcionando a restrição ao fluxo gênico e contribuindo na diversificação deste grupo.

Dessa forma, há uma lacuna relacionada a estudos nestes ambientes, de cabeceiras de rios. Assim sendo, existe uma necessidade de integrar diferentes áreas de estudo de forma a contribuir com o conhecimento do processo evolutivo e da diferenciação das espécies de peixes que ocorrem em regiões de cabeceiras de rios (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Lowe-McConnel (1969) ressalta a importância de se estudar ambientes de cabeceira dos rios, afirmando que sistemas de rios tropicais de grande porte permitem que algumas espécies de peixes sejam isoladas

geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras físicas, químicas ou bióticas. 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 tipo remanso. Tais alterações em condições ecológicas permitem um isolamento microgeográfico, com muitas espécies de alguns grupos de peixes ficando limitadas a diferentes trechos de um mesmo rio.

Algumas espécies de peixes que habitam uma região de divisores de águas entre as bacias dos rios Paraíba do Sul e Paraná foram estudadas citogeneticamente por Centofante *et al.* (2003) com o intuito de auxiliar com a citotaxonomia, evolução cromossômica e dispersão de espécies na região. Esta análise citogenética demonstrou que a Serra da Mantiqueira se constitui em um divisor de águas efetivo no isolamento geográfico de populações de peixes do rio Paraíba do Sul e Paraná. Desta forma, este isolamento geográfico deve ter contribuído significativamente para que as diferenças cromossômicas e morfológicas fossem fixadas independentemente dentro de cada uma das bacias hidrográficas, promovendo a diversificação cromossômica e propiciando um processo de especiação alopátrica das espécies ali residentes.

Em um estudo citogenético de peixes em outra região de divisores de águas, entre as bacias dos rios Tibagi, Jaguariúna e Ribeiro, Vicari (2006) verifica que possíveis mecanismos geográficos históricos de captura de cabeceiras de rios podem ter contribuído na dispersão de espécies de peixes entre cabeceiras dos rios Tibagi e Ribeiro, na região de Ponta Grossa, PR. Nesse modelo, espécies de peixes que ocorrem nos dois rios podem ter tido

momentos de fluxo gênico e diluição da variabilidade genética. Ainda, Vicari (2006) verificou que por mecanismos de captura de cabeceiras, algumas espécies originárias de apenas um destes dois rios podem ter sido transpostos ao outro.

O presente trabalho também foi usado na tentativa de propor um modelo de estudo para a análise da ictiofauna dos dois ribeirões selecionados, ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano, que são igualmente separados por um divisor de águas.

## **2. OBJETIVOS**

Através de ferramentas utilizadas na citogenética procurou-se realizar uma análise comparativa entre as estruturas cariotípicas de algumas espécies de peixes que são encontradas em ambos os ribeirões, com intuito de verificar as semelhanças e diferenças entre alguns representantes destas ictiofaunas, separadas geograficamente por um divisor de águas. Nas demais espécies que foram coletadas em apenas um local, foram abordados problemas específicos inerentes a apenas uma população, sendo comparadas com estudos já realizados por outros autores em diferentes localidades.

Os principais objetivos foram:

- 1- Caracterizar cromossomicamente espécies de peixes da região de divisores de águas entre os ribeirões do Feijão e do Pântano, São Carlos-SP, visando à obtenção de informações para o estudo da evolução cariotípica dos grupos de peixes ali residentes.
- 2- Comparar os dados cromossômicos obtidos com os já disponíveis na literatura e quando possível entre as duas populações, procurando ampliar o

conhecimento dos processos de diferenciação cromossômica nas espécies de peixes estudadas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Locais de Coleta**

O ribeirão do Feijão está inserido na região de São Carlos, oeste do Estado de São Paulo e trata-se de umas das principais sub-bacias do alto do Jacaré-Guaçu, sendo este a principal fonte de abastecimento de água da cidade. Nasce no alto da Serra do Cruzeiro, localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) de Corumbataí. O ribeirão do Feijão é tributário, afluente da Bacia Hidrográfica do Médio Tietê e escoar sobre a formação Botucatu. O clima é do tipo Cwa (clima quente de inverno seco) com temperaturas médias de 23,0°C no verão e 18,0°C no inverno e possui extensão aproximada de 133 Km (Figura 1).

O ribeirão do Pântano nasce na região de São Carlos, a cerca de 900m de altitude. Atravessa os municípios de São Carlos e Descalvado, percorrendo cerca de 45Km. Tem suas nascentes protegidas pela APA Estadual de Corumbataí, foi incluído em toda a extensão contida no município, até desembocar no Rio Mogi-Guaçu (Figura 1).

A APA atinge apenas a área rural, e como na área se localizam indústrias e mineradoras de areia de grande porte, apresentam graus de alteração antrópica que dificultam a implantação de programas de conservação ambiental. Os benefícios ambientais trazidos pela implantação da APA devem atingir não somente a população rural residente no seu território, mas também a população urbana. Isso se deve não somente à proteção de recursos naturais que afetem a vida urbana, como a qualidade de água, mas por seus limites abrangerem os arredores da cidade, promovendo o uso racional das áreas passíveis de expansão urbana.

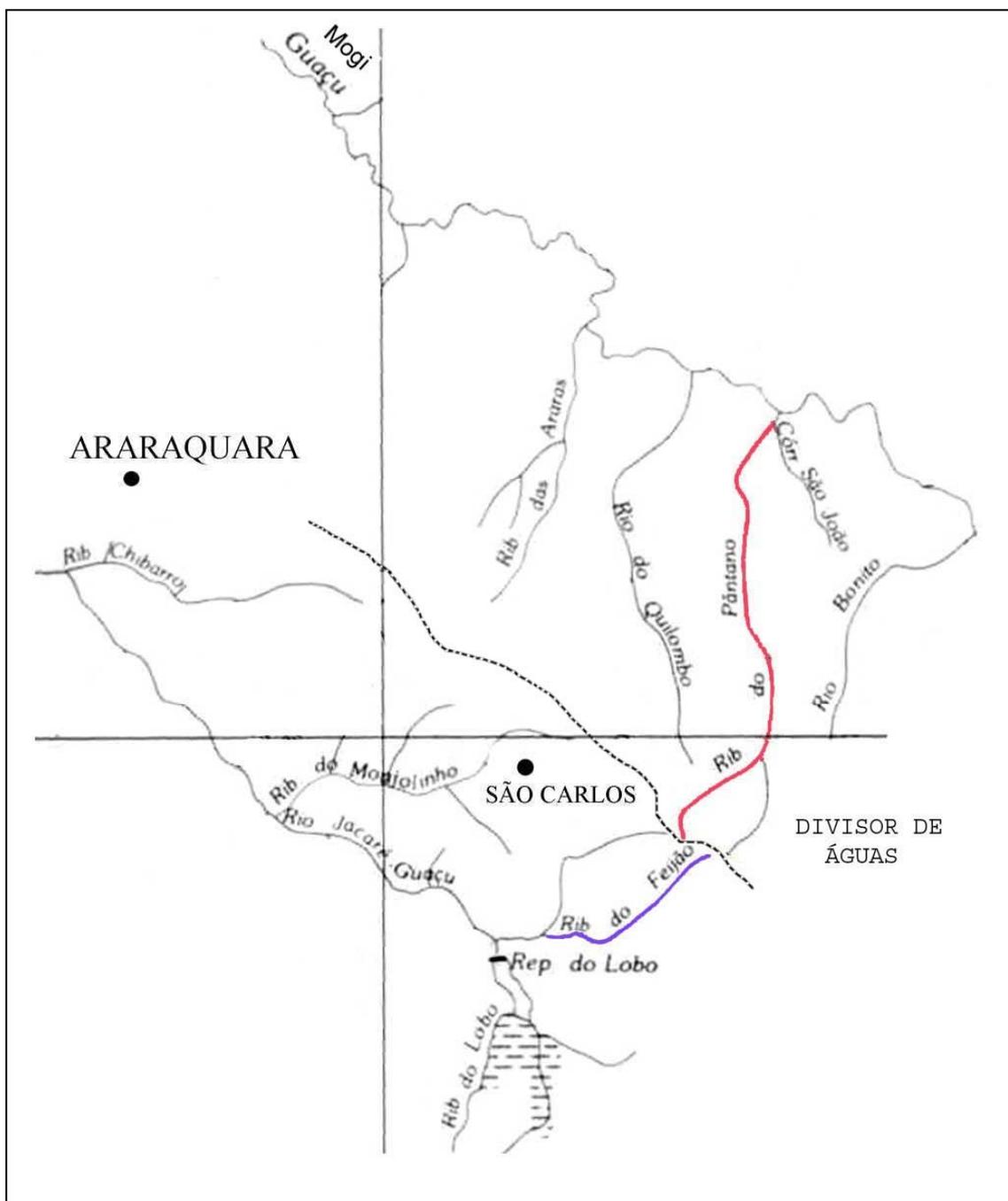


Figura 1 – Bacias do ribeirão do Feijão (em azul) e ribeirão do Pântano (em vermelho). Divisor de águas (Serra do Cruzeiro) representado pela linha pontilhada.

### **3.2. As espécies estudadas**

Para realizar os estudos propostos neste trabalho foram coletados exemplares de 5 famílias.

#### **Characidae**

*Astyanax altiparanae*

*Astyanax fasciatus*

*Moenkhausia sanctafilomenae*

#### **Curimatidae**

*Cyphocarax modestus*

#### **Prochilodontidae**

*Prochilodus lineatus*

#### **Cichlidae**

*Geophagus brasiliensis*

*Cichlasoma facetum*

#### **Gymnotidae**

*Gymnotus carapo*

*Eigenmannia sp.*;

Os espécimes coletados no ribeirão do Feijão foram: *Astyanax altiparanae*; *Astyanax fasciatus*; *Gymnotus carapo* e *Geophagus brasiliensis*.

No ribeirão do Pântano foram coletados os exemplares de: *Astyanax altiparanae*; *Cichlasoma facetum*, *Cyphocarax modestus*, *Eigenmannia sp.*, *Geophagus brasiliensis*, *Gymnotus carapo*, *Moenkhausia sanctafilomenae* e *Prochilodus lineatus*.

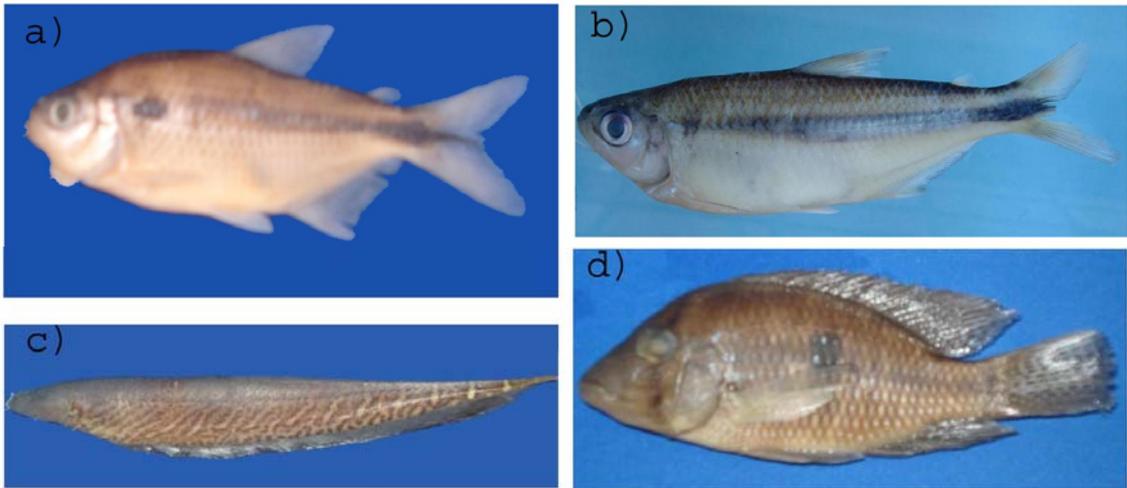


Figura 2: Espécies analisadas coletadas no ribeirão do Feijão: a) *Astyanax altiparanae* (7,5 cm); b) *Astyanax fasciatus* (9,5 cm); c) *Gymnotus carapo* (18 cm) d) *Geophagus brasiliensis* (13 cm).

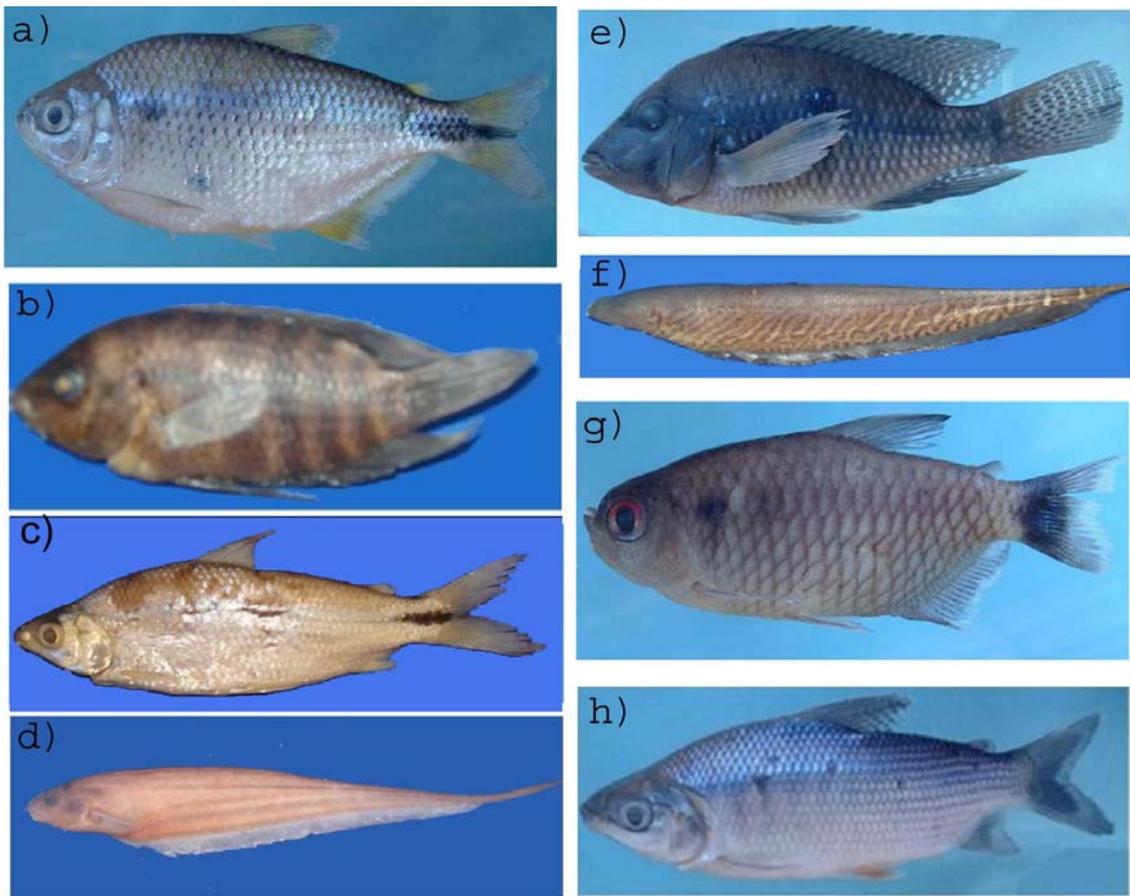


Figura 3: Espécies analisadas coletadas no ribeirão do Pântano: a) *Astyanax altiparanae*; b) *Cichlasoma facetum* (10,5 cm); c) *Cyphocarax modestus* (15,0 cm) d) *Eigenmannia sp.*(16,0 cm); e) *Geophagus brasiliensis* (11,5 cm); f) *Gymnotus carapo* (20,0 cm); g) *Moenkhausia sanctafilomenae* (7,5 cm); h) *Prochilodus lineatus* (13,0 cm).

### **3.3. Metodologias**

#### **3.3.1. Indução de metáfase**

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

#### **3.3.2. Preparação de cromossomos mitóticos**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim por meio da técnica de preparação direta (BERTOLLO *et al.*, 1978):

Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 1mL para cada 100g do animal.

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

Alternativamente, utilizar a técnica de Gold *et al.* (1990):

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

3. Incubar por 20min, em seguida, fazer as fixações como no protocolo anterior.

Para a análise cromossômica, três gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina de vidro e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 7min.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a razão de braços (LEVAN *et al.*, 1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico. Para a determinação do número fundamental (NF) (número de braço dos cromossomos) foram considerados com dois braços os cromossomos m, sm e st e com um único braço os cromossomos a.

### **3.3.3. Bandamento C**

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

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

### **3.3.4. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs)**

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

1. Mergulhar a lâmina em HCl 0,2mol/L a 42°C por 3min.
2. Lavar em água corrente e secar ao ar.
3. Pingar na lâmina 3 gotas de solução aquosa de gelatina (2%) com ácido fórmico (1%).
4. Pingar 6 gotas de AgNO<sub>3</sub> (50%), cobrir com uma lamínula e incubar na estufa a 60°C.
5. Quando a lâmina apresentar coloração castanha lavar em água corrente e secar ao ar.

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

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

#### **Marcação da sonda**

1. As sondas foram marcadas com biotina através de “Nick Translation” com o kit Bionick™ Labeling System, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen™).

2. Desidratar a lâmina em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100 v/v) por 5 min cada. Incubar as lâminas com RNase (0,1µg/mL em 2xSSC) em câmara úmida a 37°C por 1h.
3. Fixar os cromossomos com formaldeído 1%, PBS 1X, MgCl<sub>2</sub> 50mM por 10 min a temperatura ambiente.
4. Desidratar a lâmina em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100 v/v)
5. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5min.
6. Simultaneamente, desnaturar a sonda em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10%, 2xSSC, DNA de placenta humana 200µg/µL, sonda 3,75 ng/µL, volume final de 400µL) a 100°C por 10 min.
7. Colocar 50µL da solução de hibridação em cada lâmina e incubar em câmara umedecida com formamida 60% overnight.
8. Lavar com formamida 50% em 2xSSC a 42°C por 20min e com 0,1xSSC a 60°C por 15 min.
9. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM (No Fat Dry Milk 5%, 4xSSC).
10. Incubar as lâminas com 90µL de FITC 2,5ng/µL em NFDM por 30 min.
11. Lavar por 3x de 5 min cada em solução de 4xSSC/0,5% Tween.
12. Incubar as lâminas com 90µL de anti-avidina 1% em NFDM por 30 min.
13. Lavar por 3x de 5 min cada em solução de 4xSSC/0,5% Tween.
14. Repetir o passo 10 e 11. Repetir o passo 12 e 13.
15. Repetir o passo 10 e 11.
16. Desidratar em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100 v/v)
17. Montar a lâmina com 25 µL de antifade e 0,01µL de DAPI (0,2µL/mL).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo I: Estudos citogenéticos comparativos ente espécies coletadas no ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano

### 4.1. *Astyanax altiparanae*

#### 4.1.1. Cariótipo de *A. altiparanae*

Foram coletados 17 exemplares de *A. altiparanae*, sendo 8 provenientes do ribeirão do Feijão (5 machos e 3 fêmeas) (Tabela 1) e 9 provenientes do ribeirão do Pântano (5 machos e 4 fêmeas) (Tabela 2). Os espécimens de ambas as populações apresentaram um número diplóide de  $2n=50$  cromossomos para machos e fêmeas. Os cariótipos não apresentam diferenças de heteromorfismo sexual. A população do ribeirão do Feijão demonstrou uma estrutura cariotípica constituída por 6 m, 30 sm; 8 st e 6 a, e número fundamental  $NF= 94$  (Figura 4a). A população do ribeirão do Pântano demonstrou um cariótipo formando por 6 m; 28 sm; 10 st e 6 a e número fundamental  $NF= 94$  (Figura 5a).

A heterocromatina evidenciada pelo bandamento C foi localizada em blocos heterocromáticos na região centromérica e/ou pericentromérica da quase totalidade dos pares cromossômicos, nos pares 4 e 10 em região terminal, em em alguns pares na região intersticial do braço longo, tanto na população do ribeirão do Feijão (Figura 4b) quanto na a população do ribeirão do Pântano (Figura 5b).

As regiões organizadoras do nucléolo, evidenciadas pelo nitrato de Prata (Ag-RONs) foram localizadas na região telomérica do braço curto do par cromossômico número 4 submetacêntrico e em um dos homólogos de um par de cromossomos submetacêntricos marcado na região terminal do braço

longo, sendo correspondente a uma região heterocromática nesta região do par 4, nos exemplares do ribeirão do Feijão (Figura 4 box). Já os exemplares do ribeirão do Pântano apresentaram RON na região telomérica do braço curto do par cromossômico submetacêntrico número 4, também coincidindo com blocos de banda C (Figura 5 box).

A localização dos sítios ribossomais 18S por FISH na amostra do ribeirão do Feijão mostrou 1 par de cromossomos marcados na região terminal do braço curto de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio e em um cromossomo submetacêntrico de pequeno tamanho na região telomérica do braço longo, sendo as marcações correspondentes a NOR (Figura 6a). Já nos exemplares do ribeirão do Pântano foi encontrado 1 par de cromossomos submetacêntrico com sítios na região telomérica do braço curto, correspondente às regiões marcadas pelas Ag-RON (Figura 7a).

O sítio ribossomal 5S foi localizado na região intersticial do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico, para os espécimes do ribeirão Feijão e do ribeirão do Pântano (Figuras 6b e 7b).

TABELA 1 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Feijão

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |       |       |       |       | Total de Células |
|----------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|------------------|
|                      | 46              | 47    | 48    | 49    | 50    |                  |
| 18252 ♀              | 1               | 2     | 1     | 2     | 6     | 12               |
| 18254 ♂              | 2               | 1     | 1     | 1     | 7     | 12               |
| 18257 ♂              | 3               | 1     | 3     | 4     | 16    | 27               |
| 18259 ♂              | 1               | 3     | 2     | 3     | 9     | 18               |
| 18260 ♂              | 1               | 4     | 4     | 2     | 13    | 24               |
| 18279 ♂              | 2               | 3     | 2     | 1     | 12    | 20               |
| 18281 ♀              | 3               | 1     | 1     | 3     | 15    | 23               |
| 18307 ♀              | 2               | 1     | 5     | 2     | 11    | 21               |
| TOTAL                | 15              | 16    | 19    | 18    | 89    | 157              |
| %                    | 9,6%            | 10,2% | 12,1% | 11,5% | 56,7% | 100,0%           |

TABELA 2 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número Diplóide |      |       |       |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|-------|-------|-------|------------------|
|                      | 46              | 47   | 48    | 49    | 50    |                  |
| 17491 ♂              | 1               | 2    | 1     | 2     | 8     | 14               |
| 17492 ♂              | 2               | 0    | 3     | 3     | 7     | 15               |
| 17497 ♂              | 2               | 1    | 1     | 4     | 12    | 20               |
| 18120 ♀              | 1               | 2    | 1     | 3     | 15    | 22               |
| 18130 ♂              | 2               | 1    | 4     | 2     | 23    | 32               |
| 18143 ♀              | 4               | 3    | 4     | 6     | 8     | 25               |
| 18144 ♀              | 3               | 1    | 5     | 3     | 15    | 27               |
| 18149 ♀              | 2               | 1    | 2     | 3     | 13    | 21               |
| 18185 ♂              | 1               | 2    | 2     | 3     | 10    | 18               |
| TOTAL                | 18              | 13   | 23    | 29    | 111   | 194              |
| %                    | 9,3%            | 6,7% | 11,9% | 14,9% | 57,2% | 100,0%           |

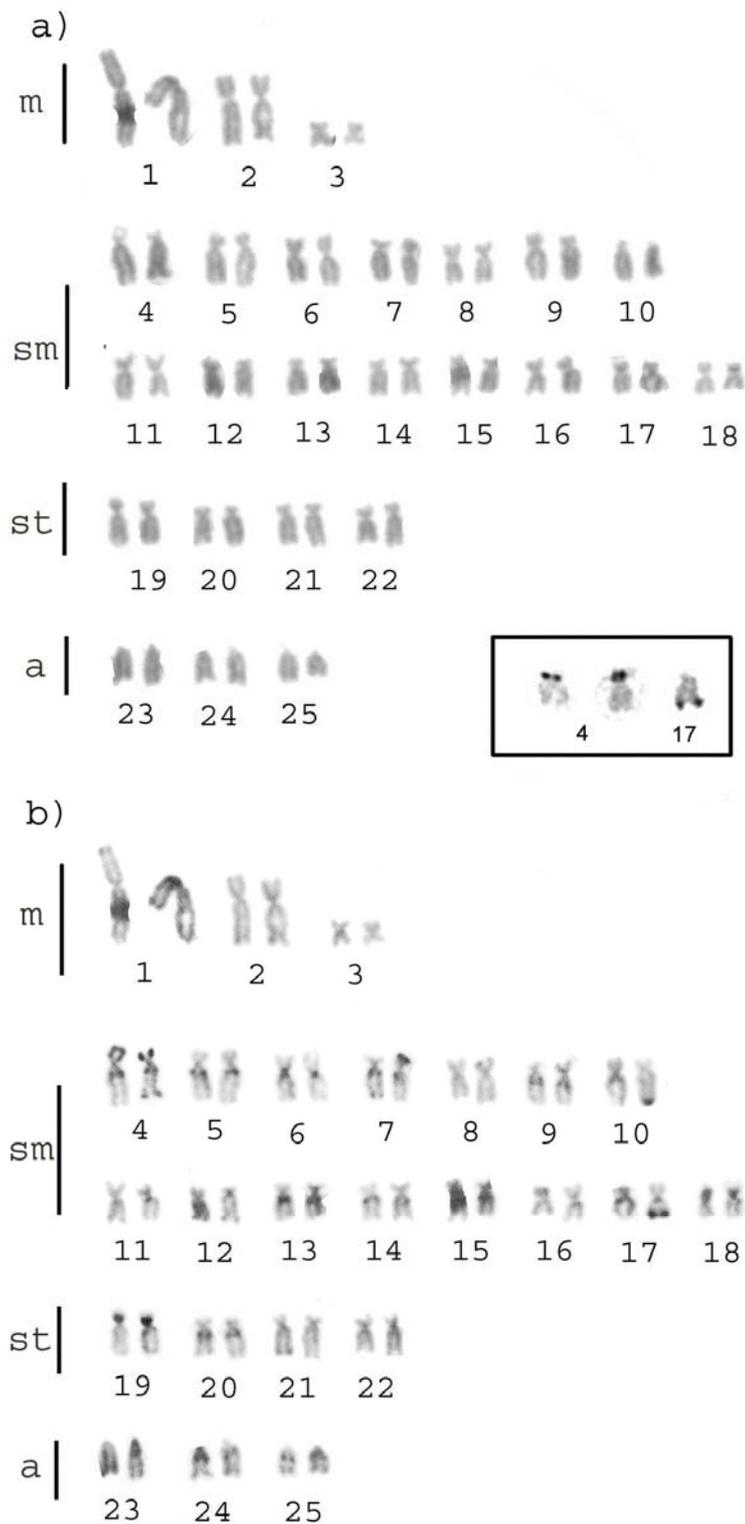


Figura 4: Cariótipo de macho de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), Ag-RON (box) e (b) distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C.

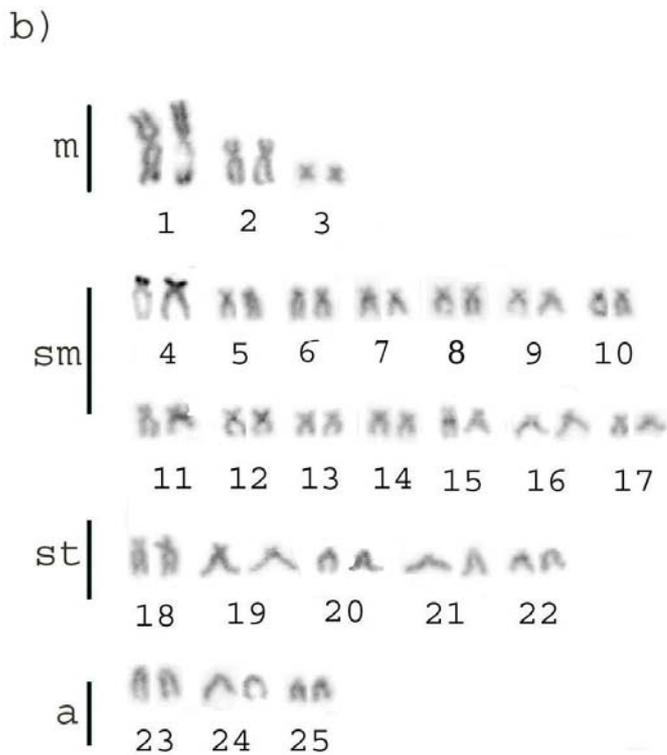
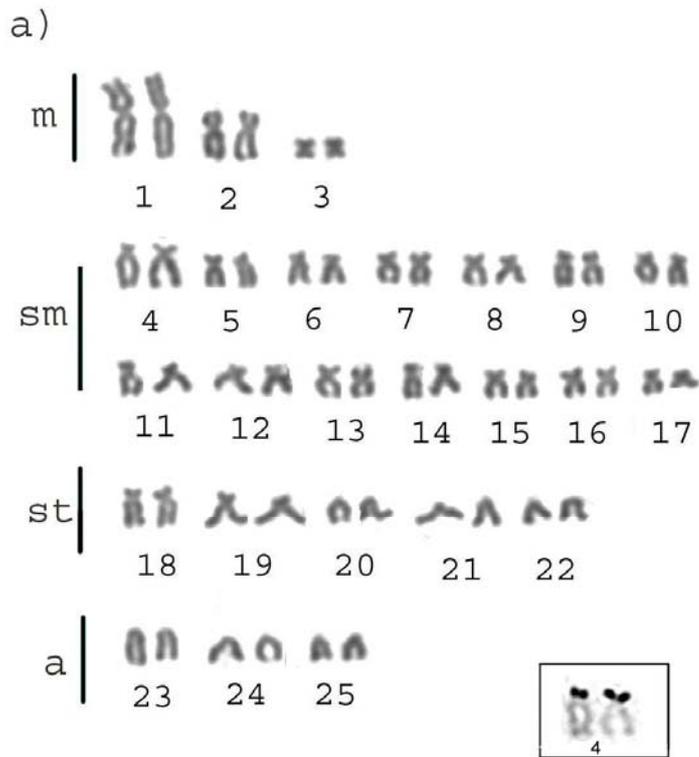


Figura 5: Cariótipo de fêmea de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Pântano corado com Giemsa em (a), Ag-RON (box) e, (b) distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C.

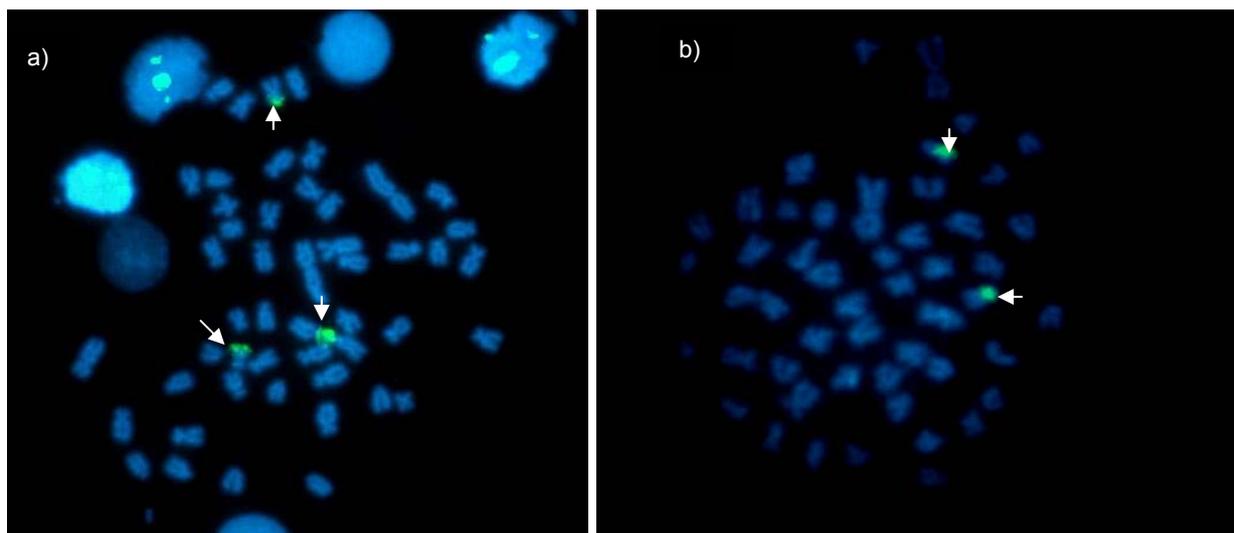


Figura 6: Cromossomos mitóticos de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Feijão. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

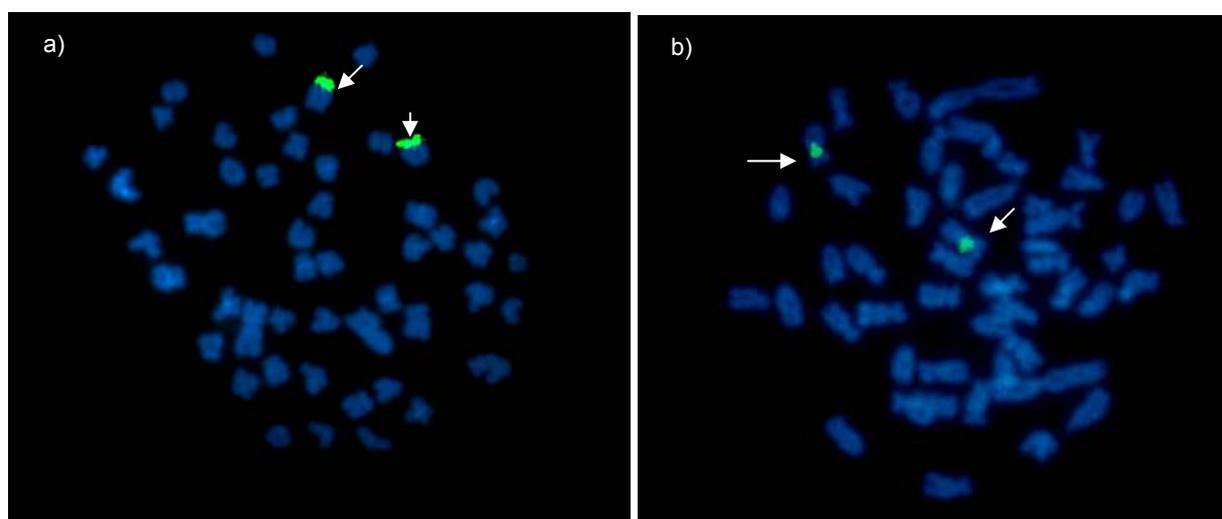


Figura 7: Cromossomos mitóticos de *Astyanax altiparanae* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

## **4.2. *Geophagus brasiliensis***

### **4.2.1 Cariótipo de *G. brasiliensis***

Foram coletados 8 espécimens (3 machos e 5 fêmeas) de *Geophagus brasiliensis* provenientes do ribeirão do Feijão (Tabela 3) e 10 exemplares (4 machos e 6 fêmeas) provenientes do ribeirão do Pântano (Tabela 4). As duas populações apresentaram composição cromossômica composta por número diplóide de  $2n = 48$  cromossomos com ausência de sistema de cromossomos sexuais. As fórmulas cariotípicas foram semelhantes, compostas de 6 sm e 42 st/a e número fundamental  $NF=54$ , para ambos os sexos, nos indivíduos do ribeirão do Feijão (Figura 8a) e do ribeirão do Pântano (Figura 9a).

A heterocromatina constitutiva teve marcações próximas aos centrômeros na maioria dos pares cromossômicos e algumas marcações intersticiais, para ambas as populações (Figuras 8b e 9b).

A localização das RONS por nitrato de Prata demonstrou marcações na região telomérica do braço curto do cromossomo subtelo/acrocêntrico número 6, na população do ribeirão do Feijão (Figura 8 box) e na do ribeirão do Pântano (Figura 9 box). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S apresentou marcações em um par cromossômico subtlocêntrico na região telomérica, correspondendo à marcação obtida pela Ag-RON, observados para o ribeirão do Feijão (Figura 10a) e do ribeirão do Pântano (Figura 11a).

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S apresentou sítios marcados na região intersticial de um par cromossômico acrocêntrico, tanto para os indivíduos do ribeirão Feijão (Figura 10b) quanto do ribeirão do Pântano (Figura 11b).

TABELA 3 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Feijão

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |       |      |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|-------|------|-------|------------------|
|                      | 44              | 45   | 46    | 47   | 48    |                  |
| 18220 ♀              | 0               | 1    | 1     | 3    | 21    | 26               |
| 18222 ♂              | 1               | 1    | 1     | 1    | 23    | 27               |
| 18223 ♀              | 1               | 1    | 4     | 0    | 22    | 28               |
| 18256 ♂              | 0               | 1    | 2     | 1    | 20    | 24               |
| 18261 ♀              | 2               | 1    | 2     | 2    | 13    | 20               |
| 18268 ♀              | 2               | 3    | 2     | 1    | 12    | 20               |
| 18270 ♀              | 1               | 1    | 4     | 2    | 18    | 26               |
| 18282 ♀              | 0               | 1    | 3     | 2    | 10    | 16               |
| TOTAL                | 7               | 10   | 19    | 12   | 139   | 187              |
| %                    | 3,7%            | 5,3% | 10,2% | 6,4% | 74,3% | 100,0%           |

TABELA 4– Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |       |       |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|-------|-------|-------|------------------|
|                      | 44              | 45   | 46    | 47    | 48    |                  |
| 18123 ♀              | 3               | 1    | 4     | 2     | 12    | 22               |
| 18160 ♂              | 2               | 1    | 3     | 2     | 10    | 18               |
| 18443 ♂              | 1               | 0    | 3     | 2     | 14    | 20               |
| 18447 ♀              | 1               | 3    | 2     | 3     | 9     | 18               |
| 18485 ♂              | 1               | 1    | 4     | 2     | 6     | 14               |
| 18486 ♀              | 0               | 2    | 2     | 1     | 8     | 13               |
| 18487 ♀              | 3               | 1    | 4     | 1     | 15    | 24               |
| 18489 ♂              | 0               | 2    | 5     | 3     | 7     | 17               |
| 18490 ♀              | 2               | 1    | 5     | 2     | 12    | 22               |
| TOTAL                | 13              | 12   | 32    | 18    | 93    | 168              |
| %                    | 7,7%            | 7,1% | 19,0% | 10,7% | 55,4% | 100,0%           |

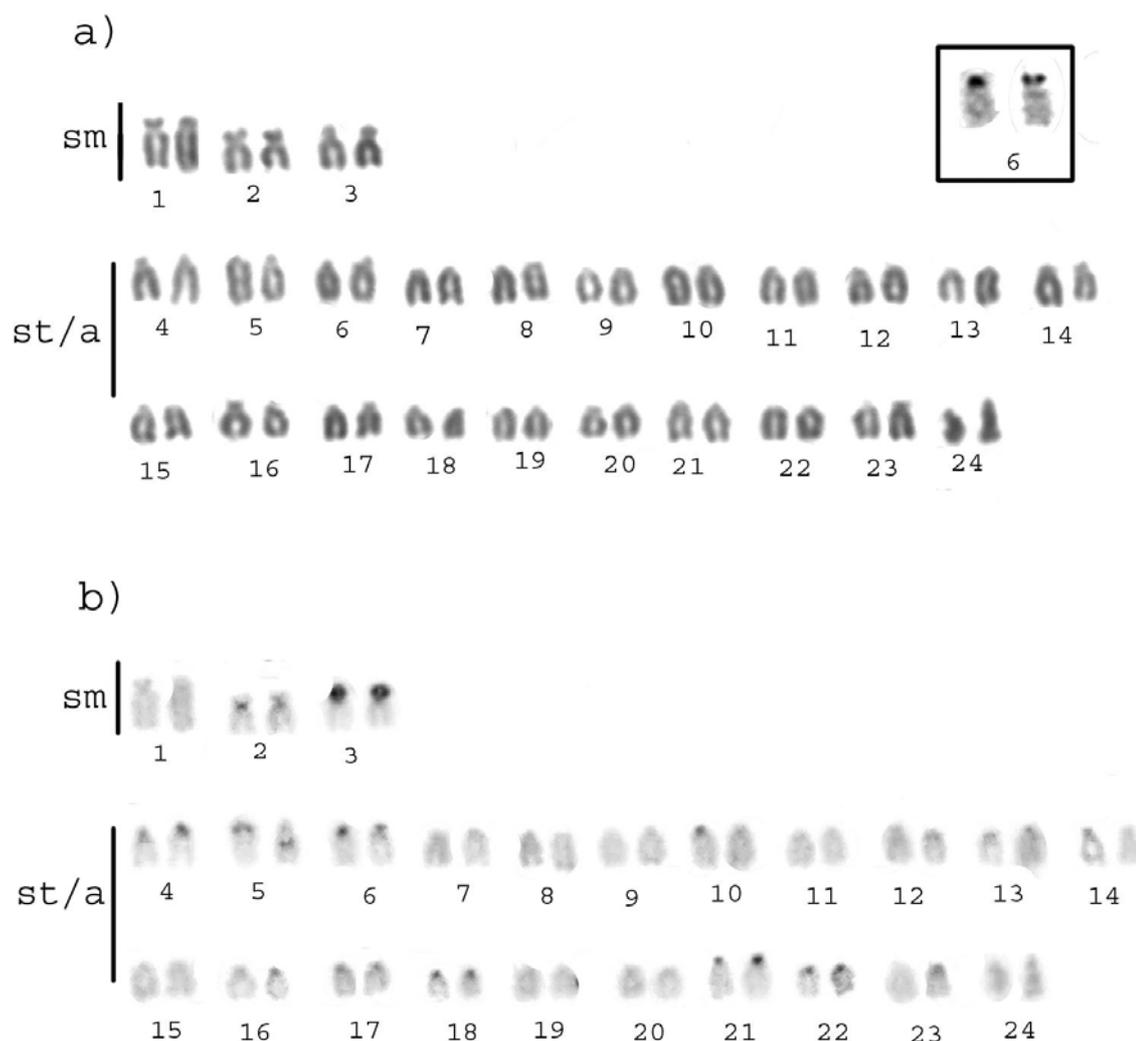


Figura 8: Cariótipo de fêmea de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Feijão. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

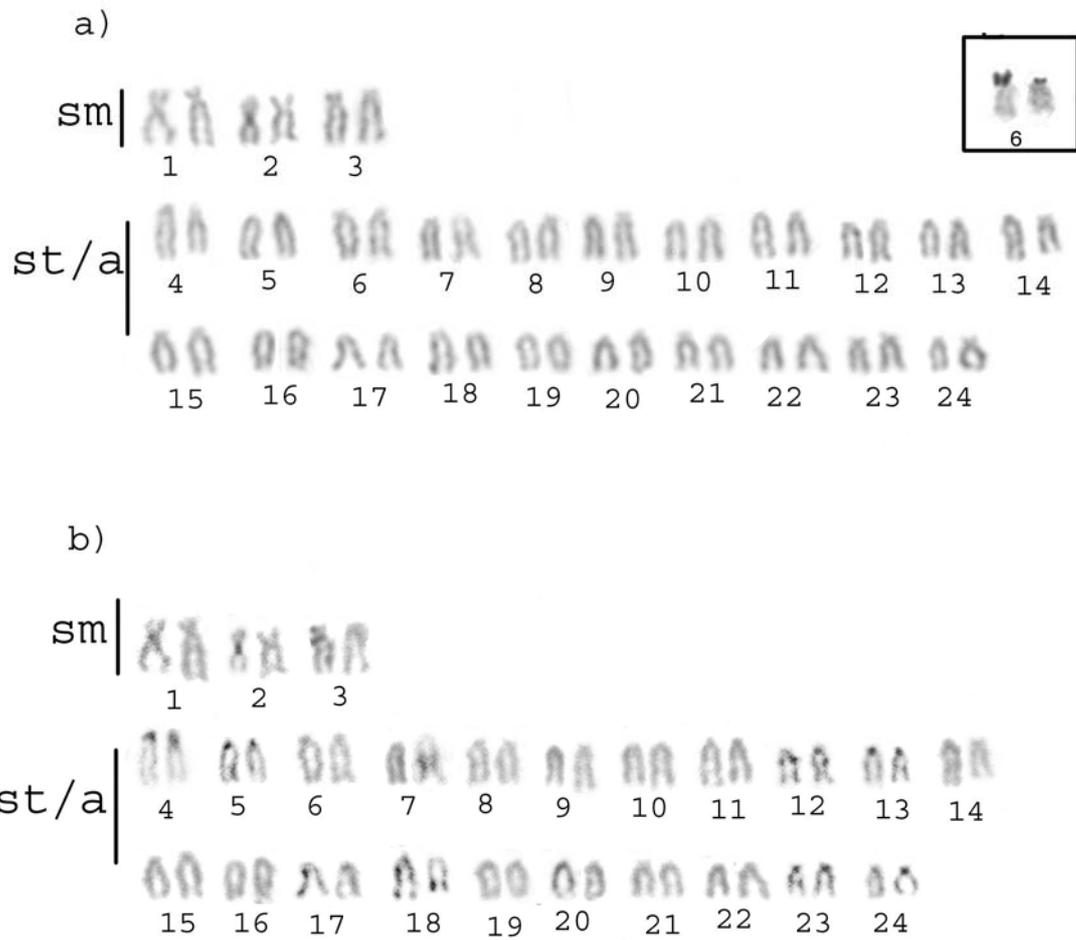


Figura 9: Cariótipo de macho de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Pântano. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

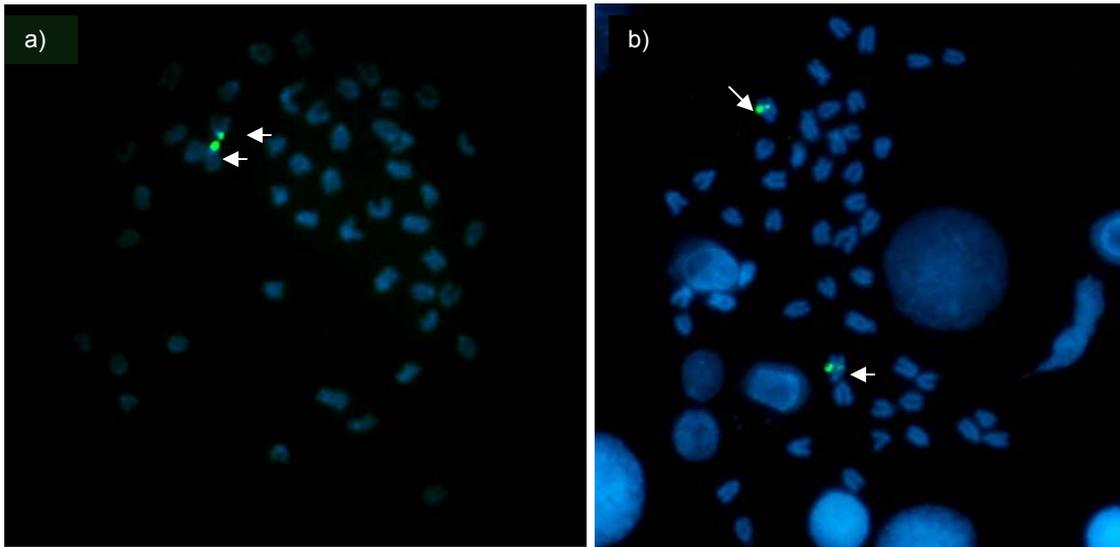


Figura 10: Cromossomos mitóticos de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Feijão. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

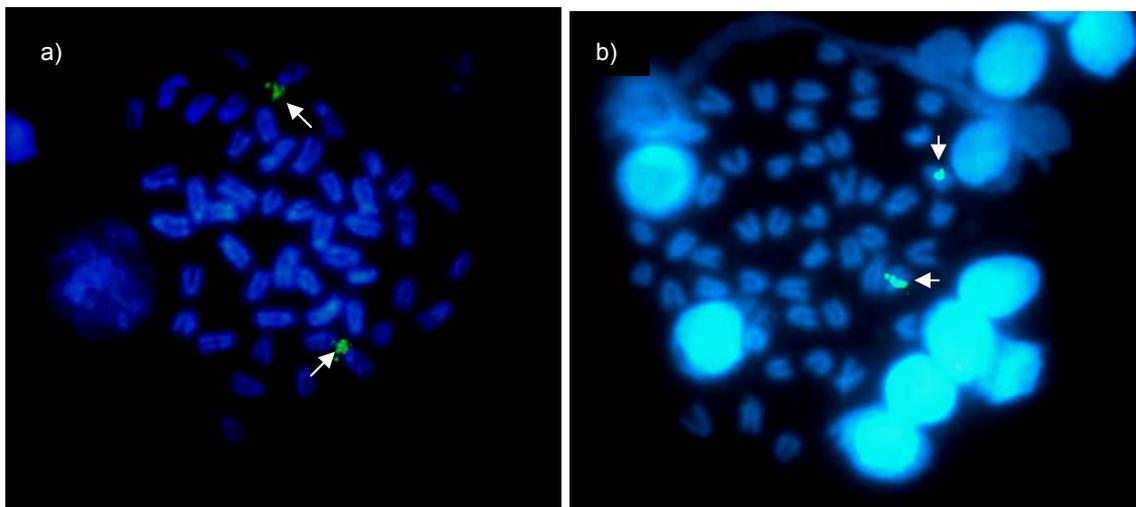


Figura 11: Cromossomos mitóticos de *Geophagus brasiliensis* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

### **4.3. *Gymnotus carapo***

#### **4.3.1. Cariótipo de *Gymnotus carapo***

Os 4 exemplares coletados do ribeirão do Feijão (2 machos e 2 fêmeas) (Tabela 5) e os 16 exemplares do ribeirão do Pântano (9 machos e 7 fêmeas) (Tabela 6) apresentaram cariótipo composto por um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos para machos e fêmeas, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais. Apresentaram fórmula cariotípica composta por 44 m, 8 sm e 2 st/a e  $NF=106$  em ambas as populações (Figuras 12a e 13a). A heterocromatina constitutiva teve fortes marcações centroméricas na maioria dos cromossomos dos exemplares analisados das duas localidades (Figuras 12b e 13b).

A localização da RON por nitrato de Prata demonstrou marcação próxima à região terminal no braço longo do par cromossômico metracêntrico número 1 (Figuras 12 e 13 box). Os sítios marcados por FISH com sonda de rDNA 18S foram correspondentes à marcação obtida pela Ag-RON, em ambas as populações analisadas (Figuras 14a e 15a).

Os sítios de rDNA 5S foram localizados na maioria dos cromossomos do complemento, em região intersticial dos cromossomos, sendo observados tanto nos exemplares do ribeirão Feijão (figura 14b), como em exemplares do ribeirão do Pântano (Figura 15b).

TABELA 5 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Feijão

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |      |      |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|------|------|-------|------------------|
|                      | 50              | 51   | 52   | 53   | 54    |                  |
| 18221 ♂              | 0               | 1    | 3    | 3    | 11    | 18               |
| 18266 ♂              | 2               | 1    | 3    | 1    | 18    | 25               |
| 18267 ♀              | 1               | 0    | 1    | 4    | 10    | 16               |
| 18288 ♀              | 0               | 3    | 2    | 2    | 8     | 15               |
| TOTAL                | 3               | 5    | 9    | 10   | 47    | 101              |
| %                    | 3,0%            | 5,0% | 8,9% | 9,9% | 46,5% | 100,0%           |

TABELA 6– Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |    |     |    |     | Total de células |
|----------------------|-----------------|----|-----|----|-----|------------------|
|                      | 50              | 51 | 52  | 53 | 54  |                  |
| 17524 ♂              | 4               | 1  | 3   | 2  | 9   | 19               |
| 17525 ♂              | 2               | 0  | 2   | 3  | 12  | 19               |
| 17527 ♂              | 5               | 1  | 3   | 0  | 12  | 21               |
| 17537 ♀              | 1               | 1  | 2   | 3  | 14  | 21               |
| 17539 ♂              | 1               | 0  | 0   | 2  | 17  | 20               |
| 17540 ♂              | 3               | 2  | 2   | 2  | 13  | 22               |
| 17560 ♂              | 0               | 0  | 1   | 2  | 6   | 9                |
| 18456 ♀              | 4               | 2  | 1   | 1  | 11  | 19               |
| 18457 ♀              | 2               | 2  | 3   | 0  | 11  | 18               |
| 18458 ♀              | 1               | 0  | 2   | 0  | 7   | 10               |
| 18459 ♂              | 3               | 1  | 2   | 1  | 15  | 22               |
| 18460 ♀              | 3               | 2  | 2   | 0  | 10  | 17               |
| 18461 ♀              | 0               | 0  | 3   | 1  | 10  | 14               |
| 18462 ♀              | 2               | 2  | 0   | 0  | 8   | 12               |
| 18463 ♂              | 0               | 1  | 3   | 2  | 15  | 21               |
| TOTAL                | 31              | 15 | 29  | 19 | 170 | 264              |
| %                    | 12%             | 6% | 11% | 7% | 64% | 100%             |

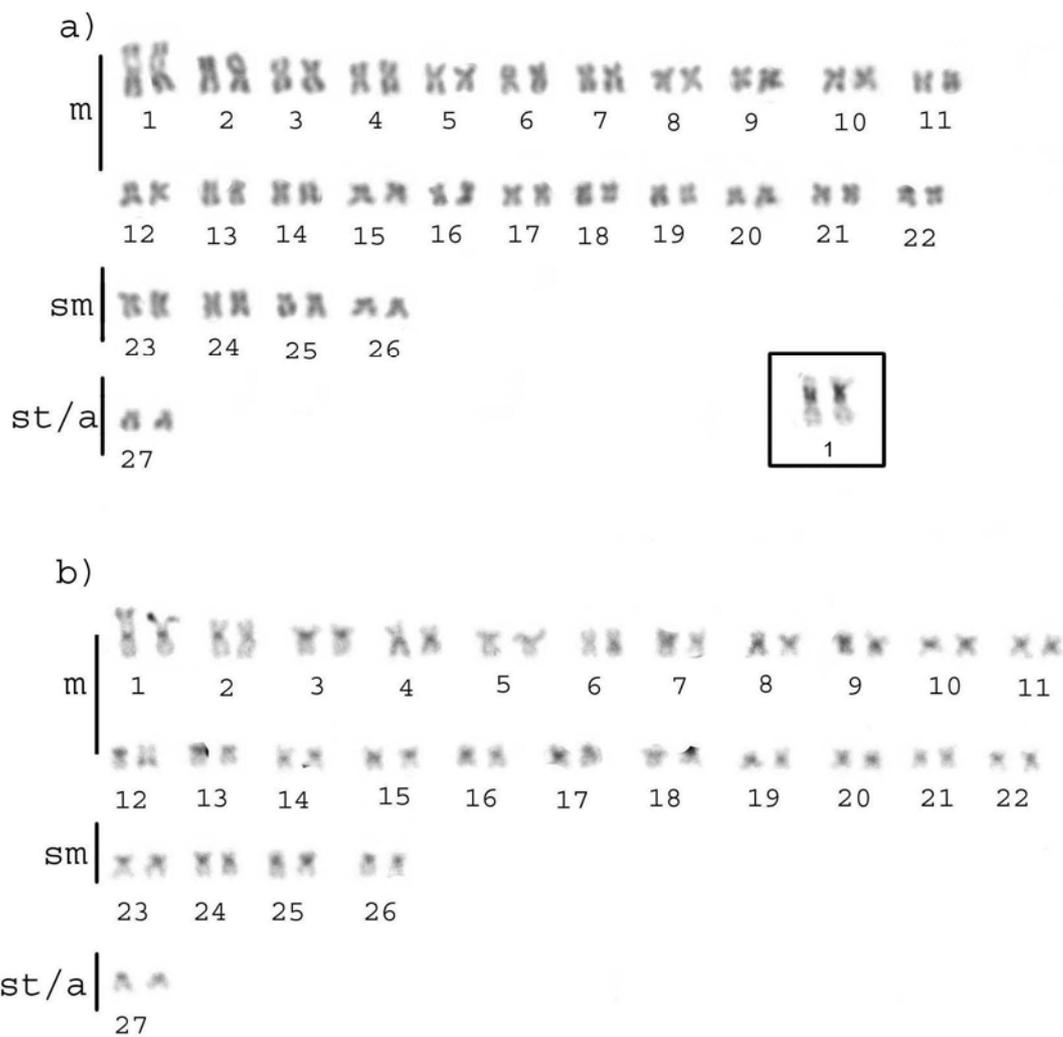


Figura 12: Cariótipo de fêmea de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Feijão. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

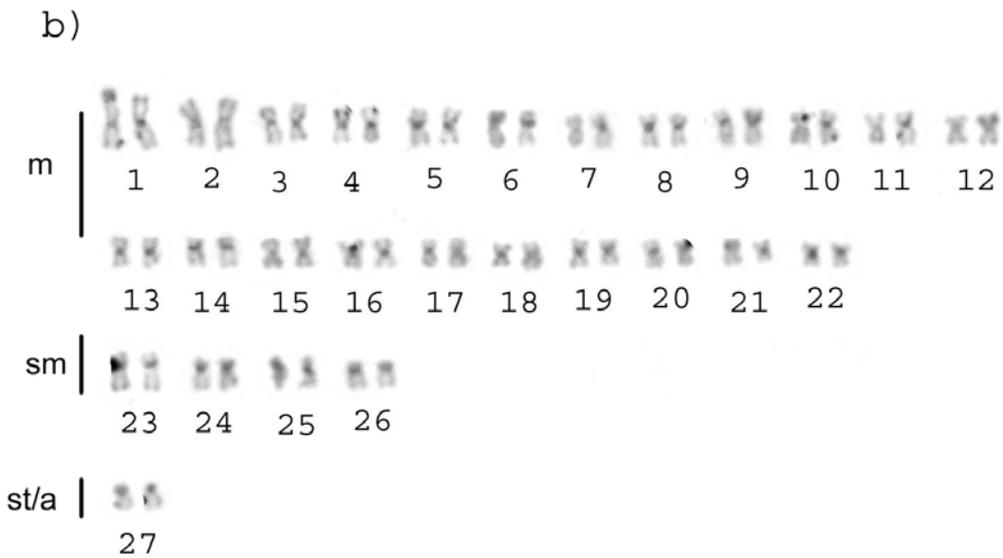
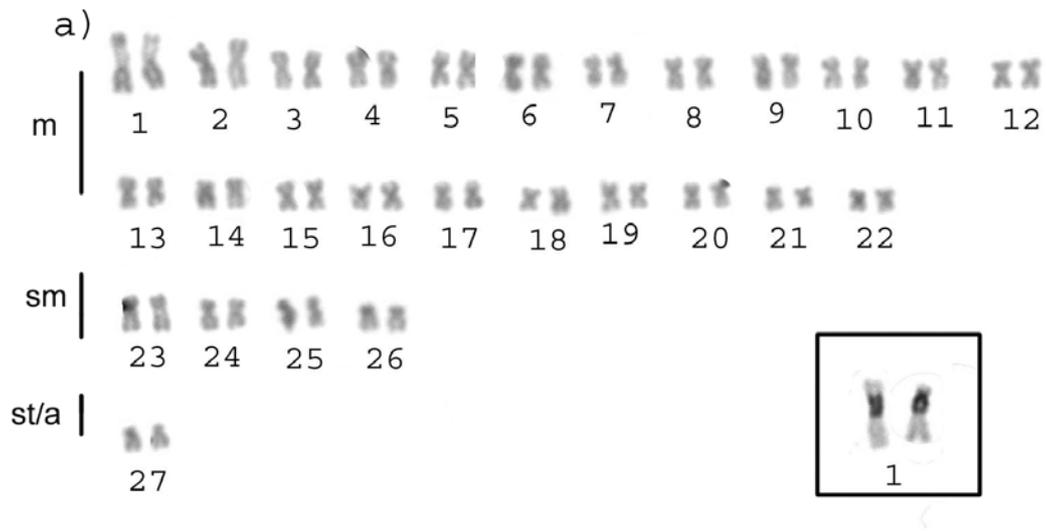


Figura 13: Cariótipo de macho de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Pântano. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

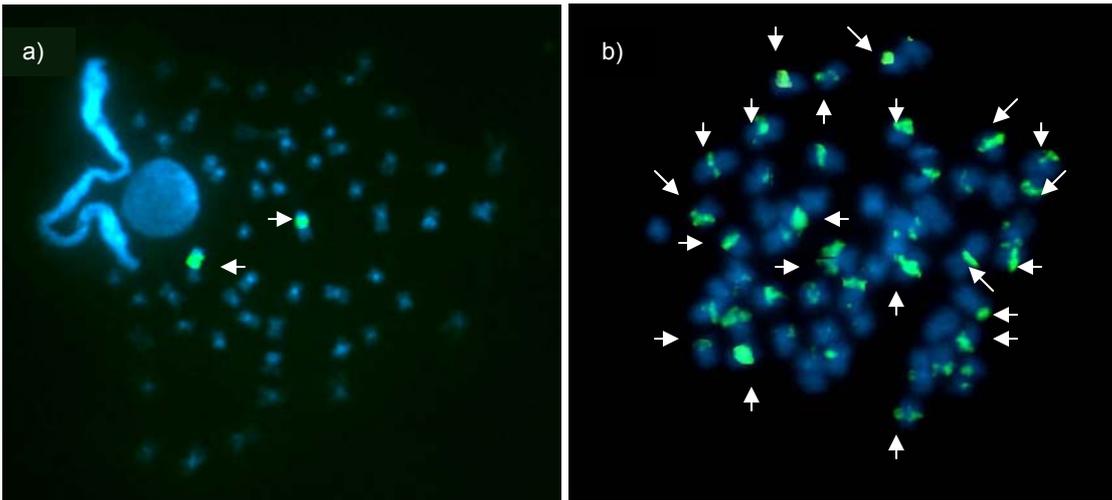


Figura 14: Cromossomos mitóticos de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Feijão. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

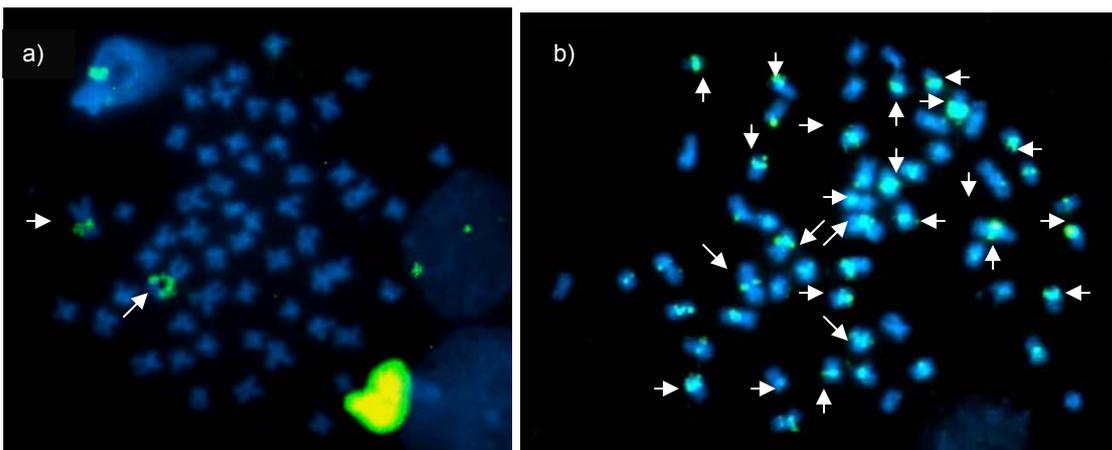


Figura 15: Cromossomos mitóticos de *Gymnotus carapo* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

## DISCUSSÃO

As espécies *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis* e *Gymnotus carapo*, foram coletadas em ambas as localidades, sendo estas usadas como ferramenta de comparação citogenética entre as diferentes populações, procurando estabelecer possíveis relações evolutivas/biogeográficas entre as mesmas.

*Astyanax* é um gênero bem distribuído no Sul da América (GÉRY, 1977), permitindo isolamento geográfico, o que pode justificar a grande diversidade do grupo (ARTONI *et al.*, 2006). As populações de *Astyanax altiparanae* aqui estudadas apresentaram mesmo número diplóide. No entanto, as fórmulas cariotípicas foram divergentes entre as duas localidades (ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano). A composição entre as duas populações também demonstrou um padrão diferente de distribuição de heterocromatina constitutiva (Banda C). Uma grande semelhança foi encontrada em indivíduos analisados por Paganelli (1990) provenientes do rio Mogi-Guaçu, com número diplóide de 50 cromossomos e ausência de sistema de cromossomos sexuais. Takashi (1995) sugeriram que possíveis variações estruturais se devem a prováveis rearranjos cromossômicos.

Contudo, em relação aos genes ribossômicos as populações de *Astyanax altiparanae* demonstraram padrões característicos distintos, onde população do ribeirão do Feijão apresentou Ag-NORs múltiplas localizadas na região telomérica dos cromossomos, resultado semelhante a estudos realizados por outros autores na espécie (JORGE & MOREIRA-FILHO, 2001; PACHECO *et al.*, 2001). Já a população do ribeirão do Pântano apresentou apenas um par marcado pela RON, também na região telomérica. A família

Characidae apresenta de forma geral o padrão de RONS múltiplas, caracterizando várias populações de *Astyanax* (SOUZA & MOREIRA-FILHO, 1995; MAISTRO *et al.*, 2000; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002). Diferenças nas marcações por nitrato de Prata encontradas por alguns autores podem ser atribuídas ao fato de processos de regulação da atividade genética dos cistrons ribossômicos que podem estar inativos durante a intérfase (MIYAZAWA & GALETTI JR., 1994; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; FERRO *et al.*, 2001; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2001).

A análise dos sítios de rDNA 18S de *Astyanax altiparanae* permitiu localizar esses sítios em concordância com as Ag-RONS, em ambas as populações, sendo encontradas quatro marcações nos exemplares do ribeirão do Feijão e apenas duas nos espécimes do ribeirão do Pântano. Outros estudos realizados em *A. altiparanae* de distintas bacias hidrográficas apresentaram mesmo número diplóide, embora diferentes estruturas cariotípicas tenham sido encontradas (TAKASHI *et al.*, 1994; ALBERT & FENOCCHIO, 1997; TORRES-MARIANO & MORELLI, 2000; PACHECO *et al.*, 2001; DOMINGUES *et al.*, 2007).

As populações de *Astyanax altiparanae* analisadas apresentam uma estrutura citogenética diferenciada em alguns aspectos entre os espécimes das diferentes bacias analisadas. Porém, as poucas diferenças observadas na distribuição da heterocromatina, fórmula cariotípica e número de sítios rDNA 18S observadas podem ser explicadas pela separação dos ribeirões adjacentes e restrição do fluxo gênico existente entre as populações. Espécimes provenientes do rio Tibagi analisados por Domingues *et al.* (2007) demonstraram vários sítios de rDNA 18S marcados no cariótipo. Este dado,

somado a divergência de fórmulas cariotípicas entre as populações sugerem uma intensa variação interpopulacional atribuída a estes caracteres.

Diferenças cariotípicas na morfologia cromossômica, principalmente referindo-se a cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos de *Astyanax altiparanae* foram observadas em populações analisadas provenientes do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu, apresentando número fundamental de 92 e 94 respectivamente. Eventos não-robertsonianos que promovem variação cariotípica como inversões pericentroméricas sugerem uma possível evolução cariotípica nestas espécies (DOMINGUES *et al.* 2007). Da mesma forma, inversões pericêntricas podem ter ocorrido entre os espécimes analisados do ribeirão do Feijão e do Pântano alterando as fórmulas cariotípicas das duas populações.

Os sítios de rDNA 5S nos exemplares de *Astyanax altiparanae* apresentaram para ambas as populações dois sítios marcados na região pericentromérica de um par cromossômico sm. Estudos feitos em diferentes espécies do gênero *Astyanax* apresentaram sítios de rDNA 5S conservados em dois pares cromossômicos, sendo um metacêntrico e um acrocêntrico, marcados na região proximal (FERRO *et al.*, 2001, ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002, MANTOVANI *et al.*, 2005), sugerindo uma possível apomorfia para o gênero.

*Astyanax altiparanae* trata-se de uma espécie conservada cariotipicamente, quanto a número cromossômico e localização da heterocromatina constitutiva. No entanto, variações na fórmula cariotípica e no número de cromossomos portadores de rDNA 18S e 5S sugerem uma intensa variação interpopulacional. Espécies de *A. scabripinis* e *A. fasciatus* são

próximas taxonomicamente de *A. altiparanae*, porém apresentam diferenças significantes no número cromossômico e marcações de heterocromatina. Equanto *A. altiparanae* demonstra possuir maior conservadorismo para estes caracteres (DOMINGUES *et al.*, 2007).

Estudos cariotípicos em Cíclideos tem demonstrado a manutenção do número diplóide na maioria das espécies, sendo o número diplóide igual a 48 cromossomos, com muitos cromossomos subtelo/acrocêntricos (THOMPSON, 1979; FELDBERG & BERTOLLO, 1985a; MARTINS *et al.* 1995). O número diplóide desta família pode variar de  $2n=32$  cromossomos até  $2n=60$  cromossomos (FELDBERG *et al.*, 2003). O número diplóide considerado basal dos Perciformes demonstra ser de  $2n=48$  cromossomos acrocêntricos (GALETTI JR. *et al.* 2000).

Os espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados em ambos os rios apresentaram número diplóide e fórmula cariotípica semelhantes com  $2n=48$  cromossomos e  $NF=54$ . As populações de *G. brasiliensis* apresentaram distribuição de heterocromatina localizada na região intersticial de alguns pares e centromérica de outros cromossomos acrocêntricos. Estudos comparativos de Cíclideos demonstram mesmo padrão de heterocromatina, localizadas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (KORNFIELD *et al.*, 1979; OLIVEIRA & WRIGHT, 1998). Vicari *et al.* (2006b) demonstrou um padrão peculiar de distribuição da heterocromatina em *G. brasiliensis* do rio Jaguaiaíva apresentando alguns pares blocos heterocromáticos conspícuos e intersticiais. A população de *G. brasiliensis* do ribeirão do Pântano também apresentou alguns cromossomos com blocos intersticiais conspícuos de heterocromatina,

diferente da população do ribeirão do Feijão que apresentou apenas marcas centroméricas, comuns a espécie.

As marcações pelo íon nitrato de Prata evidenciaram apenas um par cromossômico marcado nas duas populações de *G. brasiliensis*. A família Cichlidae possui a característica de RONS simples localizadas cromossomos acrocêntricos em regiões terminais do braço curto (BRUM *et al.*, 1998; FELDBERG *et al.*, 2003; VICARI *et al.*, 2006b).

Vicari *et al.* (2006b) analisaram por hibridação *in situ* fluorescente três diferentes populações de *G. brasiliensis* quanto ao número e localização dos sítios de rDNA 18S e 5S. Verificaram que os cromossomos portadores dos sítios ribossomais 18S eram homólogos entre as espécies e/ou populações, sempre localizados no braço curto de um par cromossômico st/a. Ainda, os sítios ribossomais entre os diferentes exemplares poderiam apresentar um polimorfismo de tamanho. Os resultados encontrados para o rDNA 18S das populações do ribeirão do Feijão e do Pântano também são homólogos aos encontrados por Vicari *et al.* (2006b). Em relação aos sítios ribossomais 5S as populações de *G. brasiliensis* apresentaram um par de cromossomos st com sítios intersticiais do braço longo. Esses resultados corroboram aos encontrados por Vicari *et al.* (op. cit.) na mesma espécie de outras populações.

Os resultados encontrados neste estudo para *G. brasiliensis* corroboram a hipótese de conservadorismo cromossômico para estas espécies, onde o número diplóide  $2n=48$ , um par st portador de RON e um par portador de rDNA 5S parecem ser características plesiomórficas para o grupo.

Os espécimes analisados de *Gymnotus carapo* apresentaram número diplóide  $2n = 54$  cromossomos em ambas as populações (ribeirão do Feijão e

do Pântano). Resultados apresentados por Almeida-Toledo & Fernandes Matioli (2001) demonstraram o mesmo número cromossômico para *Gymnotus carapo*, e distintos números diplóides para outras espécies de *Gymnotus*, os quais podem variar de  $2n=40$  em *G. sylvius* a  $2n=52$  para *G. inaequilabiatus* e *G. pantherinus*. Dados de outros estudos demonstram que em Gymnotiformes, a evolução cariotípica é mais divergente do que conservativa (SILVA & MARGARIDO, 2005). A redução do número cromossômico existente entre as espécies pode ser vista como uma tendência evolutiva no grupo, com *G. carapo* apresentando  $2n=54$  cromossomos parecendo ser basal (FERNANDES-MATIOLI *et al.*, 1998). Essa possível redução do número diplóide em Gymnotidae pode ser explicada por eventos cromossômicos de fusão.

Fernandes *et al.* (2005) analisaram uma nova espécie de *Gymnotus*, denominada *G. pantanal*, a qual apresentou número cromossômico de 40 cromossomos e fórmula cariotípica diferente das espécies comparadas (*G. carapo*, *G. sylvius*, *G. pantherinus*, *G. inaequilabiatus*). Ainda, visualizaram nestas espécies uma terceira NOR ativa presente em um dos homólogos do par meta/submetacêntrico grande em região terminal do braço longo. Todas as demais espécies demonstraram apenas um par cromossômico marcado na região organizadora de nucléolo, semelhante aos resultados encontrados nas espécies de *G. carapo* do presente trabalho. Os resultados de bandamento C encontrados corroboram com os dados obtidos nas quatro espécies analisadas por Fernandes-Matioli *et al.* (1998) em quatro espécies de Gymnotidae.

A distribuição da heterocromatina é encontrada em espécies de Gymnotiformes distribuída em pequenos blocos localizados em regiões pericentroméricas para todos os cromossomos do complemento em

*Brachyhypoponus pinnicaudatus* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000), bem como em *Eigenmannia virens* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002). Este padrão de distribuição é semelhante aos resultados obtidos neste trabalho em *Gymnotus carapo*, podendo ser uma característica comum do grupo.

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S em *G. carapo* das populações ribeirão Feijão e do Pântano apresentaram marcações intersticiais no braço longo do par cromossômico número 1. Os sítios marcados com sonda de rDNA 5S foram encontrados em grande parte dos cromossomos na região pericentromérica, igualmente nas duas populações. A ocorrência de múltiplos sítios de rDNA 5S em *G. carapo* são possivelmente decorrentes de uma família de DNA repetitivo que evoluiu a partir de pseudogenes derivados do rDNA 5S, como já descrito na família Erythrinidae (FERREIRA *et al.*, 2007).

Capítulo II: Estudos citogenéticos inerentes a apenas uma das duas localidades estudadas, ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano.

#### **4.4. *Astyanax fasciatus***

##### **4.4.1. Cariótipo de *A. fasciatus***

As amostras de 16 exemplares (11 machos e 5 fêmeas) de *Astyanax fasciatus* provenientes do ribeirão do Feijão apresentaram uma estrutura cariotípica constituída por  $2n=46$  cromossomos para ambos os sexos (Tabela 7). Os cariótipos são homomórficos, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sendo 28 cromossomos m/sm; 18 st/a e um número fundamental  $NF=74$  (Figura 16a). A heterocromatina constitutiva está distribuída em blocos conspícuos na região centromérica e telomérica do braço longo de alguns pares cromossômicos meta, submeteta e acrocêntricos (Figura 16b).

A análise por nitrato de Prata demonstrou marcações na região terminal do braço curto do par cromossômico submetacêntrico número 3 (Figura 16 box). Os sítios de rDNA 18S apresentaram marcações na região terminal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntrico, correspondentes à Ag-RON, e em dois cromossomos não homólogos, sendo um submetacêntrico de pequeno tamanho marcado na região terminal do braço longo e outro submetacêntrico de tamanho grande marcado na região terminal do braço curto (Figura 17a).

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S apresentou sítios marcados em dois pares cromossômicos submetacêntricos na região sub-terminal do braço curto (Figura 17b).

TABELA 7 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Astyanax fasciatus* do ribeirão do Feijão

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |       |       |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|-------|-------|-------|------------------|
|                      | 43              | 44    | 45    | 46    |                  |
| 18228 ♂              | 1               | 2     | 7     | 12    | 22               |
| 18230 ♂              | 2               | 4     | 3     | 7     | 16               |
| 18232 ♂              | 4               | 7     | 1     | 16    | 28               |
| 18233 ♀              | 4               | 2     | 5     | 13    | 24               |
| 18251 ♀              | 2               | 2     | 2     | 6     | 12               |
| 18253 ♂              | 4               | 3     | 6     | 8     | 21               |
| 18255 ♂              | 3               | 2     | 4     | 5     | 14               |
| 18258 ♀              | 2               | 4     | 3     | 12    | 21               |
| 18262 ♂              | 1               | 3     | 3     | 10    | 17               |
| 18269 ♀              | 4               | 7     | 1     | 15    | 27               |
| 18271 ♂              | 1               | 5     | 5     | 7     | 18               |
| 18274 ♂              | 4               | 2     | 3     | 9     | 18               |
| 18278 ♂              | 1               | 3     | 2     | 5     | 11               |
| 18280 ♂              | 2               | 2     | 4     | 8     | 16               |
| 18306 ♂              | 3               | 2     | 5     | 9     | 19               |
| 18308 ♀              | 4               | 3     | 2     | 12    | 21               |
| TOTAL                | 42              | 53    | 56    | 154   | 305              |
| %                    | 13,8%           | 17,4% | 18,4% | 50,5% | 100,0%           |

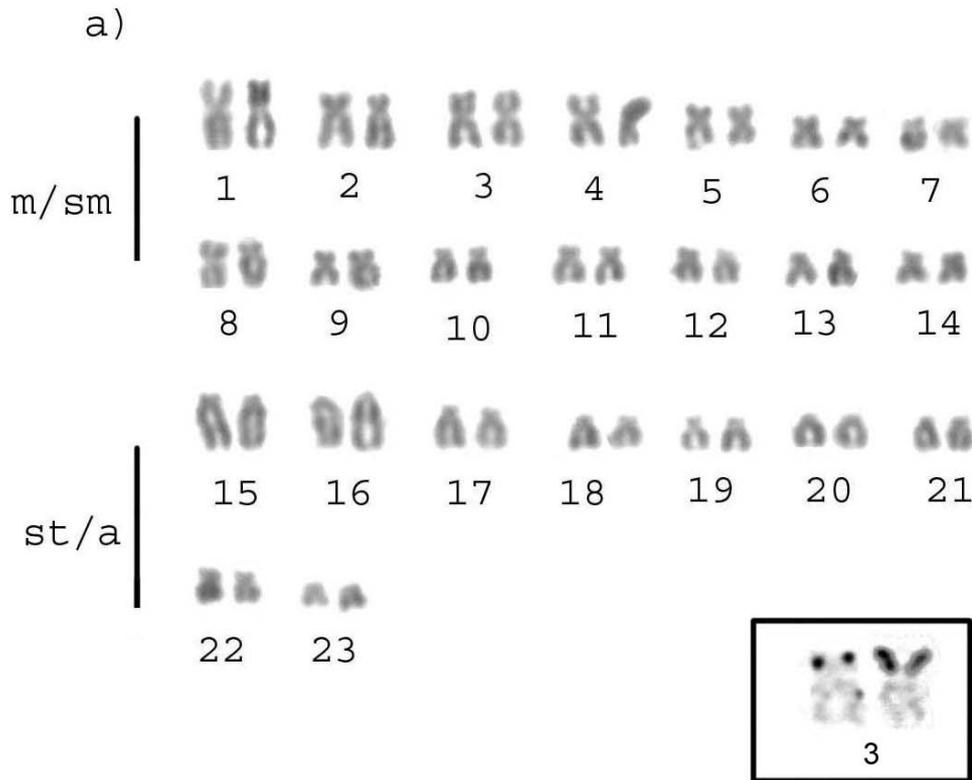


Figura 16: Cariótipo de macho de *Astyanax fasciatus* do ribeirão do Feijão corado com Giemsa (a), RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C (b).

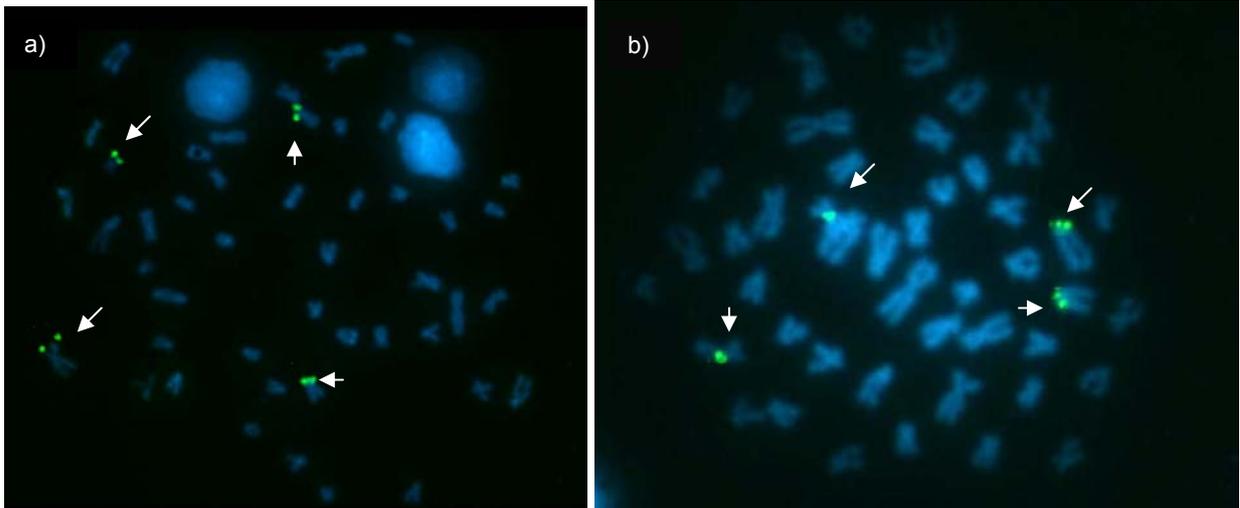


Figura 17: Cromossomos mitóticos de *Astyanax fasciatus* do ribeirão do Feijão. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

#### 4.5. *Cichlasoma facetum*

##### 4.5.1. Cariótipo de *C. facetum*

Os espécimens de *Cichlasoma facetum* (1 macho e 1 fêmea) do ribeirão do Pântano apresentaram um cariótipo constituído por  $2n=48$  cromossomos (tabela 8), tanto no macho quanto na fêmea, sendo homomórficos, isto é, não apresentaram diferenciação sexual, e um cariótipo constituído por 10 sm e 38 st/a, com  $NF=58$  (Figura 18a).

O bandamento C apresentou marcações evidentes localizadas na região centromérica de praticamente todos os cromossomos do complemento (Figura 18b).

As regiões organizadoras de nucléolo evidenciadas pelo nitrato de Prata e pela hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S, foram localizadas na região telomérica do braço curto de um par cromossômico st/a (Figuras 18 (box) e 19a). O sítio de rDNA 5S foi localizado na região intersticial do braço longo de um cromossomo subtelo/acrocêntrico (Figura 19b).

TABELA 8 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Cichlasoma facetum* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |      |      |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|------|------|-------|------------------|
|                      | 44              | 45   | 46   | 47   | 48    |                  |
| 17521 ♀              | 1               | 3    | 2    | 3    | 17    | 26               |
| 17522 ♂              | 4               | 2    | 3    | 1    | 24    | 34               |
| TOTAL                | 5               | 5    | 5    | 4    | 41    | 60               |
| %                    | 8,3%            | 8,3% | 8,3% | 6,7% | 68,3% | 100,0%           |

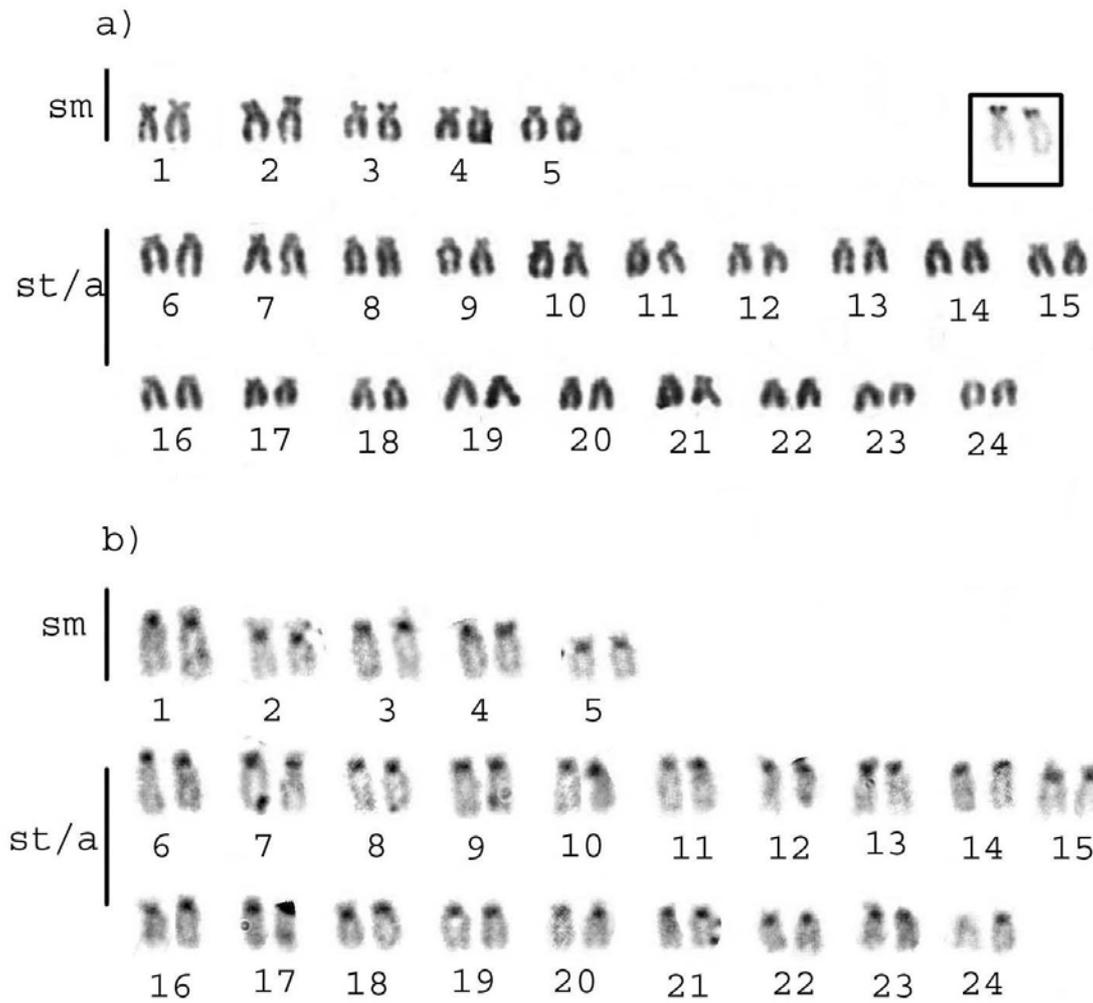


Figura 18: Cariótipo de macho de *Cichlasoma facetum* do ribeirão do Pântano corado com Giemsa em (a), Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C.

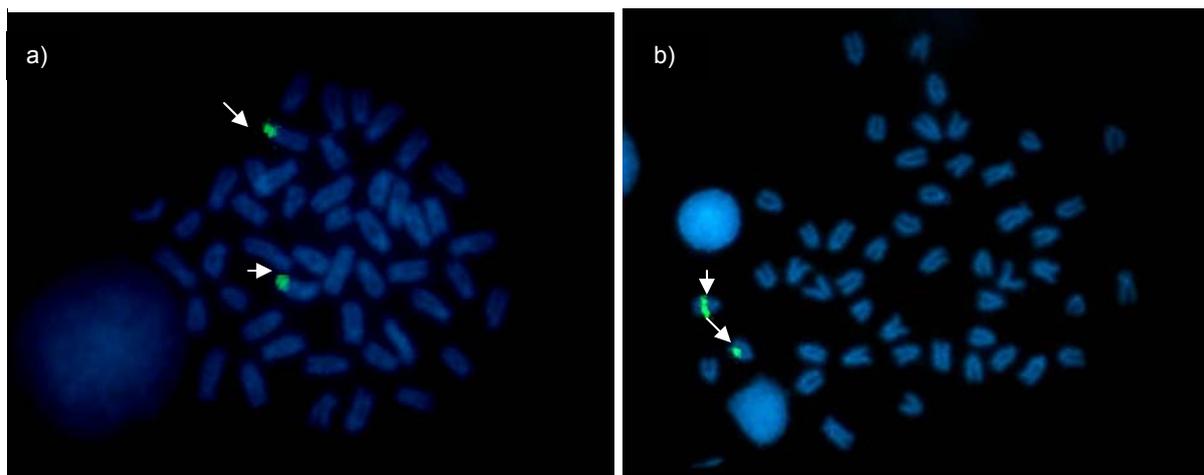


Figura 19: Cromossomos mitóticos de *Cichlasoma facetum* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

## **4.6. *Cyphocharax modestus***

### **4.6.1. Cariótipo de *C. modestus***

Foram coletados 8 exemplares de *Cyphocharax modestus* do ribeirão do Pântano, sendo 3 machos e 5 fêmeas (Tabela 9). Os espécimens analisados apresentaram  $2n=54$  cromossomos com constituição cariotípica de 34 m e 20 sm, para ambos os sexos, com número fundamental  $NF=108$  (Figura 20a). O padrão de heterocromatina constitutiva teve marcações centroméricas evidentes na maioria dos cromossomos e teloméricas em alguns cromossomos. Não foi observado nenhum heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo (Figura 20b).

As Ag-RONs foram localizadas na região telomérica do braço longo de um par cromossômico metacêntrico (Figura 20 box). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S apresentou um par cromossômico metacêntrico marcado na região telomérica do braço longo e foi correspondente à marcação obtida pela Ag-RON (Figura 21a).

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S apresentou marcações localizadas na região pericentromérica de um par cromossômico metacêntrico (Figura 21b).

TABELA 9 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Cyphocharax modestus* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |       |       |       | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|-------|-------|-------|------------------|
|                      | 50              | 51   | 52    | 53    | 54    |                  |
| 18122 ♀              | 4               | 2    | 3     | 2     | 7     | 18               |
| 18132 ♂              | 2               | 1    | 4     | 1     | 9     | 17               |
| 18133 ♀              | 3               | 1    | 3     | 4     | 12    | 23               |
| 18433 ♂              | 1               | 0    | 2     | 3     | 13    | 19               |
| 18440 ♂              | 4               | 0    | 5     | 1     | 11    | 21               |
| 18448 ♀              | 2               | 1    | 3     | 1     | 8     | 15               |
| 18449 ♀              | 2               | 1    | 1     | 3     | 5     | 12               |
| 18475 ♂              | 2               | 1    | 5     | 2     | 14    | 24               |
| TOTAL                | 20              | 7    | 26    | 17    | 79    | 149              |
| %                    | 13,4%           | 4,7% | 17,4% | 11,4% | 53,0% | 100,0%           |

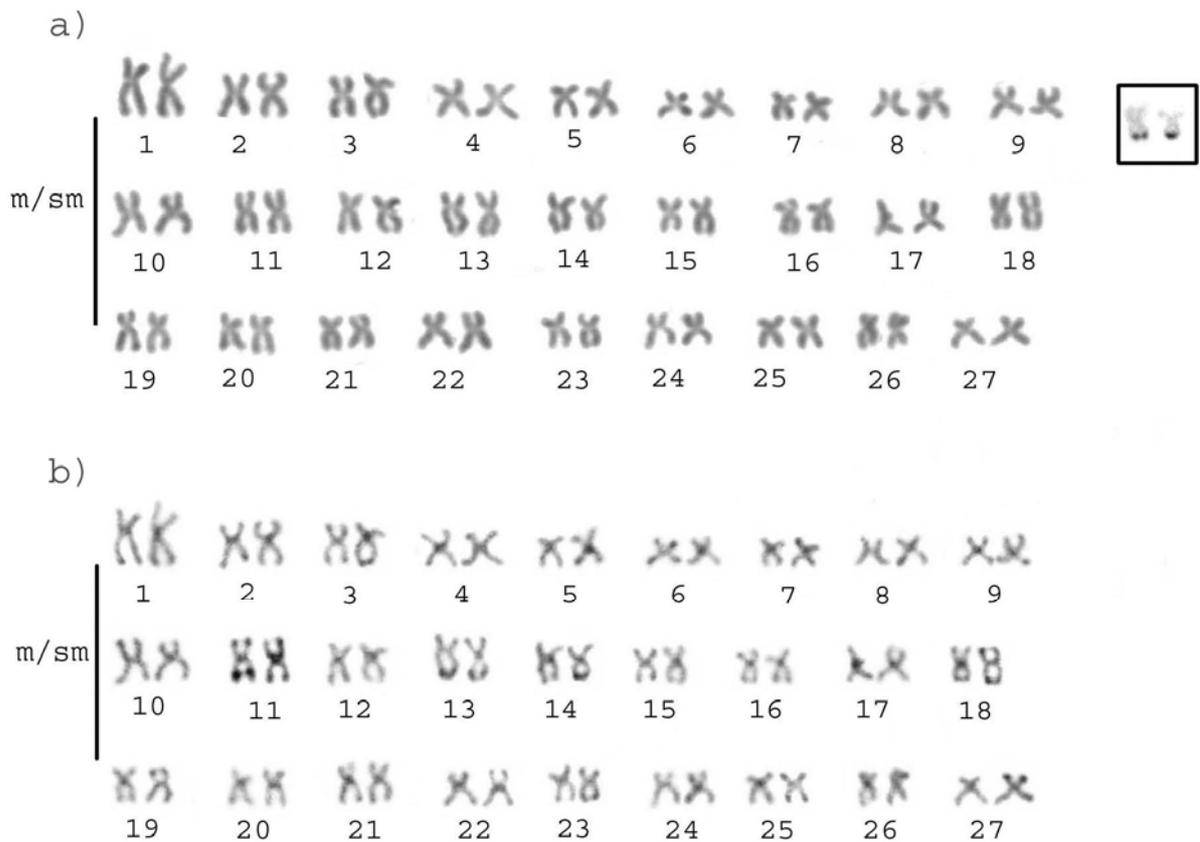


Figura 20: Cariótipo de macho de *Cyphocharax modestus* do ribeirão do Pântano corado com Giemsa (a); Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

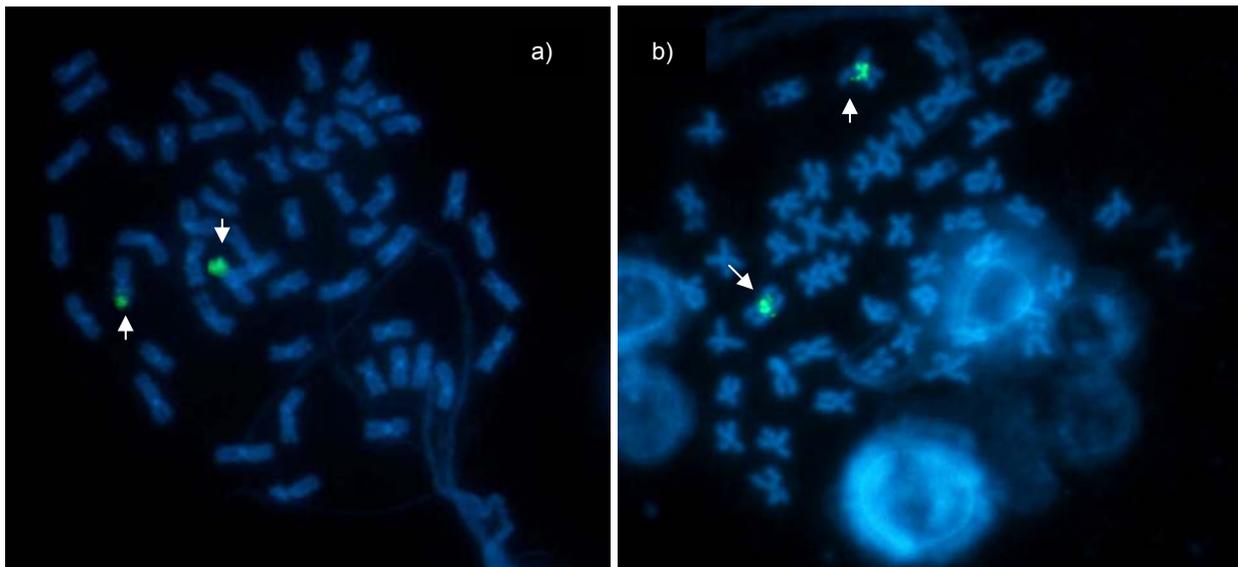


Figura 21: Cromossomos mitóticos de *Cyphocharax modestus* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

#### **4.7. *Eigenmannia sp.***

##### **4.7.1. Cariótipo de *Eigenmannia sp.***

Os 8 exemplares analisados de *Eigenmannia sp.* (2 machos e 6 fêmeas) coletados no ribeirão do Pântano apresentaram cariótipo composto por um número diplóide de  $2n=28$  cromossomos para ambos os sexos (Tabela 10) com constituição cariotípica de 14 m e 14 a e número fundamental  $NF=42$  (Figura 22a). Não foi observado nenhum heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. No par cromossômico número 8 foi identificada uma região de constrição secundária com heteromorfismo de tamanho. O padrão de heterocromatina constitutiva teve fortes marcações centroméricas evidentes na maioria dos cromossomos e algumas marcações teloméricas nos pares 2, 3, 4 e 5 metacêntricos (Figura 22b).

O sítio de RON foi localizado o padrão de NOR na região terminal do cromossomo metacêntrico número 3, pela impregnação por Prata (Figura 22 box) e pela hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (Figura 23a). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S apresentou marcações localizadas na região terminal de um par metacêntrico grande e dois pares acrocêntricos pequenos (figura 23b).

TABELA 10 – Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Eingenmannia* sp. do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |       |       | Totalde células |
|----------------------|-----------------|------|-------|-------|-----------------|
|                      | 25              | 26   | 27    | 28    |                 |
| 17523 ♀              | 1               | 4    | 6     | 20    | 31              |
| 17526 ♂              | 2               | 2    | 3     | 21    | 28              |
| 18427 ♀              | 0               | 2    | 5     | 17    | 24              |
| 18428 ♂              | 3               | 2    | 5     | 8     | 18              |
| 18429 ♀              | 1               | 1    | 3     | 16    | 21              |
| 18430 ♀              | 3               | 2    | 4     | 22    | 31              |
| 18431 ♀              | 2               | 1    | 1     | 15    | 19              |
| 18432 ♀              | 1               | 5    | 4     | 15    | 25              |
| TOTAL                | 13              | 19   | 31    | 134   | 197             |
| %                    | 6,6%            | 9,6% | 15,7% | 68,0% | 100,0%          |



Figura 22: Cariótipo de fêmea de *Eigenmannia sp.* do ribeirão do Pântano. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

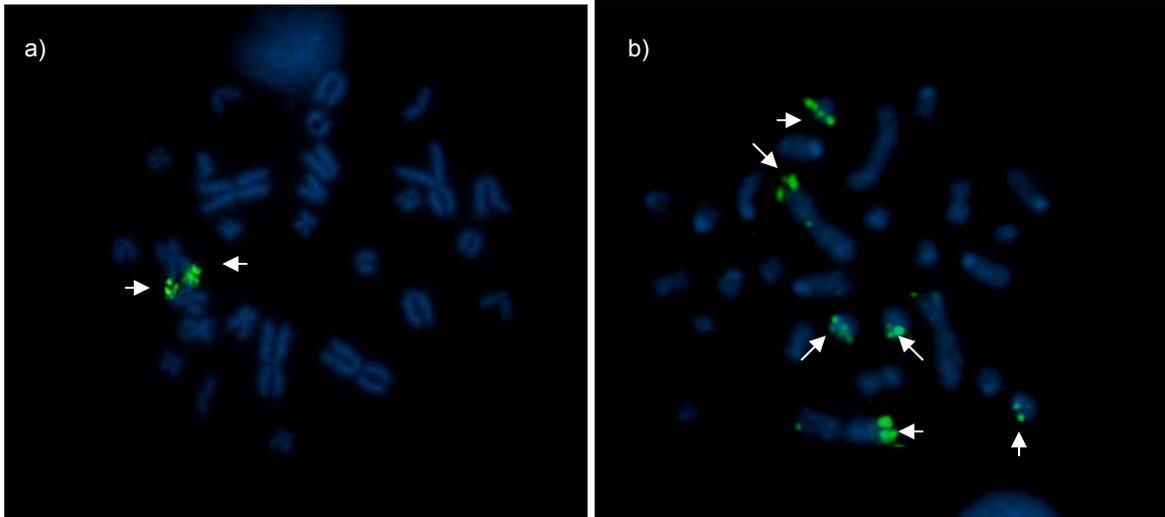


Figura 23: Cromossomos mitóticos de *Eigenmannia sp.* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

## **4.8. *Moenkhausia sanctafilomenae***

### **4.8.1. Cariótipo de *M. sanctafilomenae***

Os espécimens analisados de *Moenkhausia sanctafilomenae* (3 machos e 5 fêmeas) provenientes do ribeirão do Pântano apresentaram  $2n=50$  cromossomos (Tabela 11). A fórmula cariotípica está organizada em 12 m, 36 sm e 2 st e  $NF=100$  (Figura 24). Durante a análise das metáfases, observou-se que 90% dos exemplares eram portadores de cromossomos B apresentando uma variação intra/interindividual de 0 a 3 cromossomos B (figura 24a), para ambos os sexos. A localização da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C mostrou fortes marcações intersticiais no braço longo na maioria dos pares cromossômicos (Figura 24b). Os microcromossomos supranumerários ou Bs possuem menor tamanho e são totalmente heterocromáticos (Figura 24b).

A localização das RONS pelo nitrato de Prata evidenciou sítios em um par de cromossomos sm grande no braço longo, no braço curto de um par cromossômico sm de tamanho grande e um sm de tamanho pequeno no braço curto (Figura 24 box).

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S obteve sítios terminais marcados no braço curto de um par cromossômico sm de tamanho médio, sendo correspondente à uma das marcações obtidas pela Ag-RON, sendo o par sm de tamanho pequeno no braço curto (Figura 25a). Os demais pares marcados correspondem a regiões de heterocromatina com afinidade pelo nitrato de Prata. Já a hibridação *in situ* fluorescente *in situ* com sonda rDNA 5S apresentou marcações localizadas na região pericentromérica do braço menor do par cromossômico metacêntrico número 1 (Figura 25b).

TABELA 11– Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Moenkhausia sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |    |     |     |     |     | Total de células |
|----------------------|-----------------|----|-----|-----|-----|-----|------------------|
|                      | 46              | 47 | 48  | 49  | 50  | B   |                  |
| 17494 ♀              | 4               | 0  | 5   | 4   | 5   | 0   | 18               |
| 17504 ♀              | 4               | 1  | 4   | 3   | 10  | 0-3 | 22               |
| 17505 ♀              | 1               | 2  | 2   | 3   | 10  | 0-3 | 18               |
| 17508 ♂              | 3               | 0  | 2   | 5   | 15  | 0-2 | 25               |
| 17509 ♂              | 2               | 1  | 3   | 2   | 12  | 0-3 | 20               |
| 17510 ♂              | 4               | 1  | 5   | 5   | 8   | 0-3 | 23               |
| 17511 ♀              | 0               | 2  | 1   | 1   | 8   | 0   | 12               |
| 17512 ♀              | 1               | 2  | 2   | 1   | 13  | 0-3 | 19               |
| TOTAL                | 19              | 9  | 24  | 73  | 131 |     | 157              |
| %                    | 12%             | 6% | 15% | 46% | 83% |     | 100%             |

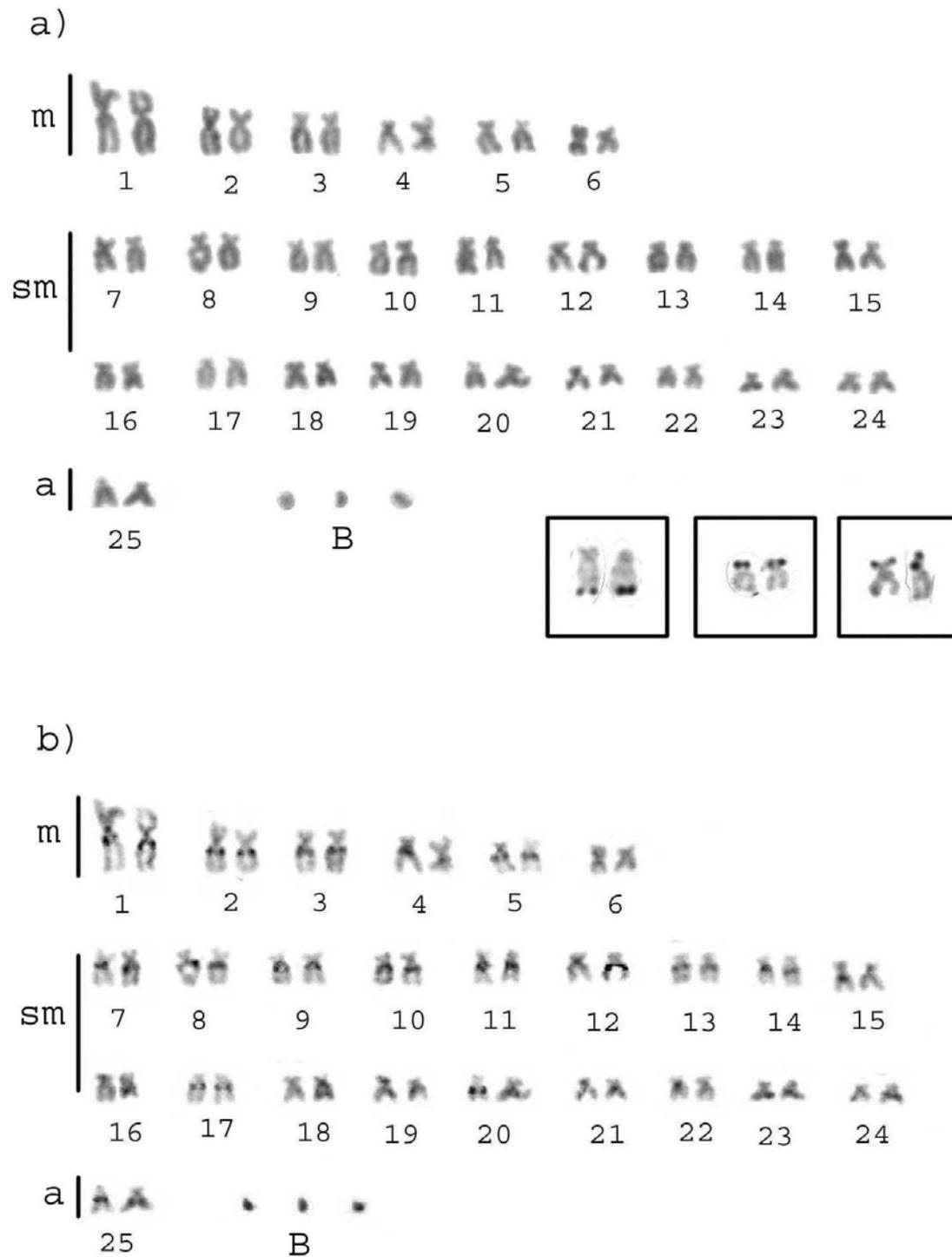


Figura 24: Cariótipo de fêmea de *Moenkhausia sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

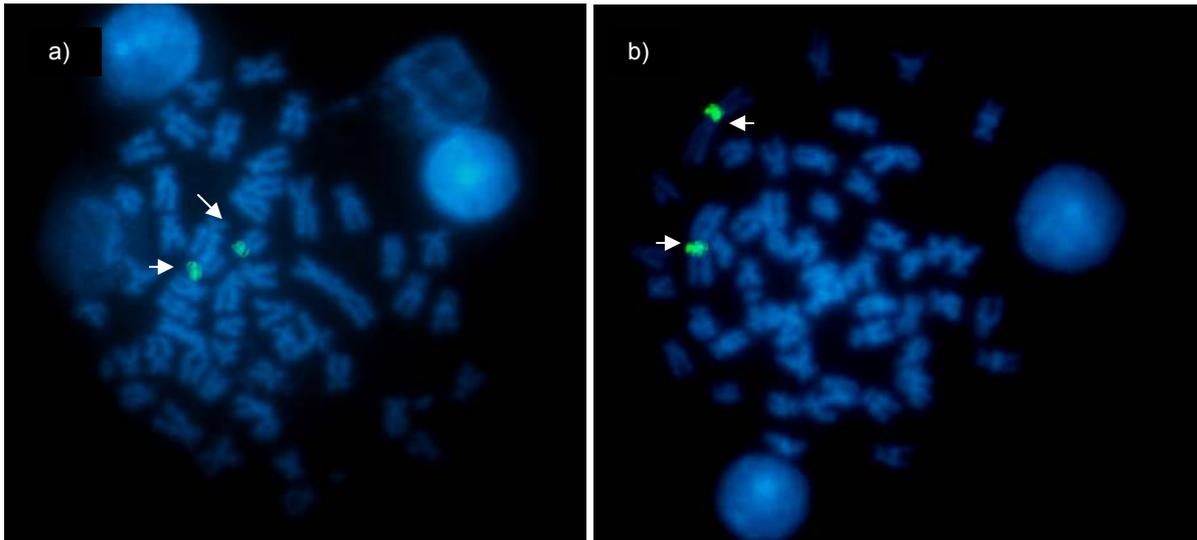


Figura 25: Cromossomos mitóticos de *Moenkhausia sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

#### 4.9. *Prochilodus lineatus*

##### 4.9.1. Cariótipo de *P. lineatus*

Foram coletados no ribeirão do Pântano 1 macho e 1 fêmea de *Prochilodus lineatus*. Ambos apresentaram  $2n=54$  cromossomos (tabela 12) e constituição cariotípica de 30 cromossomos m e 24 sm em ambos os sexos, com número fundamental  $NF=108$  (Figura 26a). Durante a análise das metáfases, observou-se que todos exemplares eram portadores de cromossomos B apresentando uma variação intra/interindividual de 0-3 cromossomos B. A heterocromatina constitutiva foi localizada em região centromérica na maioria dos cromossomos, sendo os cromossomos B totalmente heterocromáticos (Figura 26b).

As Ag-RONs foram localizadas na região intersticial do braço curto de um par cromossômico metacêntrico (Figura 26 box). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S obteve marcas intersticiais no braço curto de um cromossomos sm e foi correspondente à marcação obtida pela Ag-RON (Figura 27a). A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 5S apresentou marcações localizadas na região telomérica do braço curto de um par sm (Figura 27b).

TABELA 12– Números diplóides encontrados para fêmeas e machos de *Prochilodus lineatus* do ribeirão do Pântano

| Nº e sexo dos peixes | Número diplóide |      |       |       |       |     | Total de células |
|----------------------|-----------------|------|-------|-------|-------|-----|------------------|
|                      | 50              | 51   | 52    | 53    | 54    | B   |                  |
| 18125 ♂              | 4               | 1    | 6     | 2     | 11    | 0-3 | 24               |
| 18148 ♀              | 3               | 3    | 2     | 5     | 9     | 0-3 | 22               |
| TOTAL                | 7               | 4    | 8     | 7     | 20    |     | 46               |
| %                    | 15,2%           | 8,7% | 17,4% | 15,2% | 43,5% |     | 100,0%           |

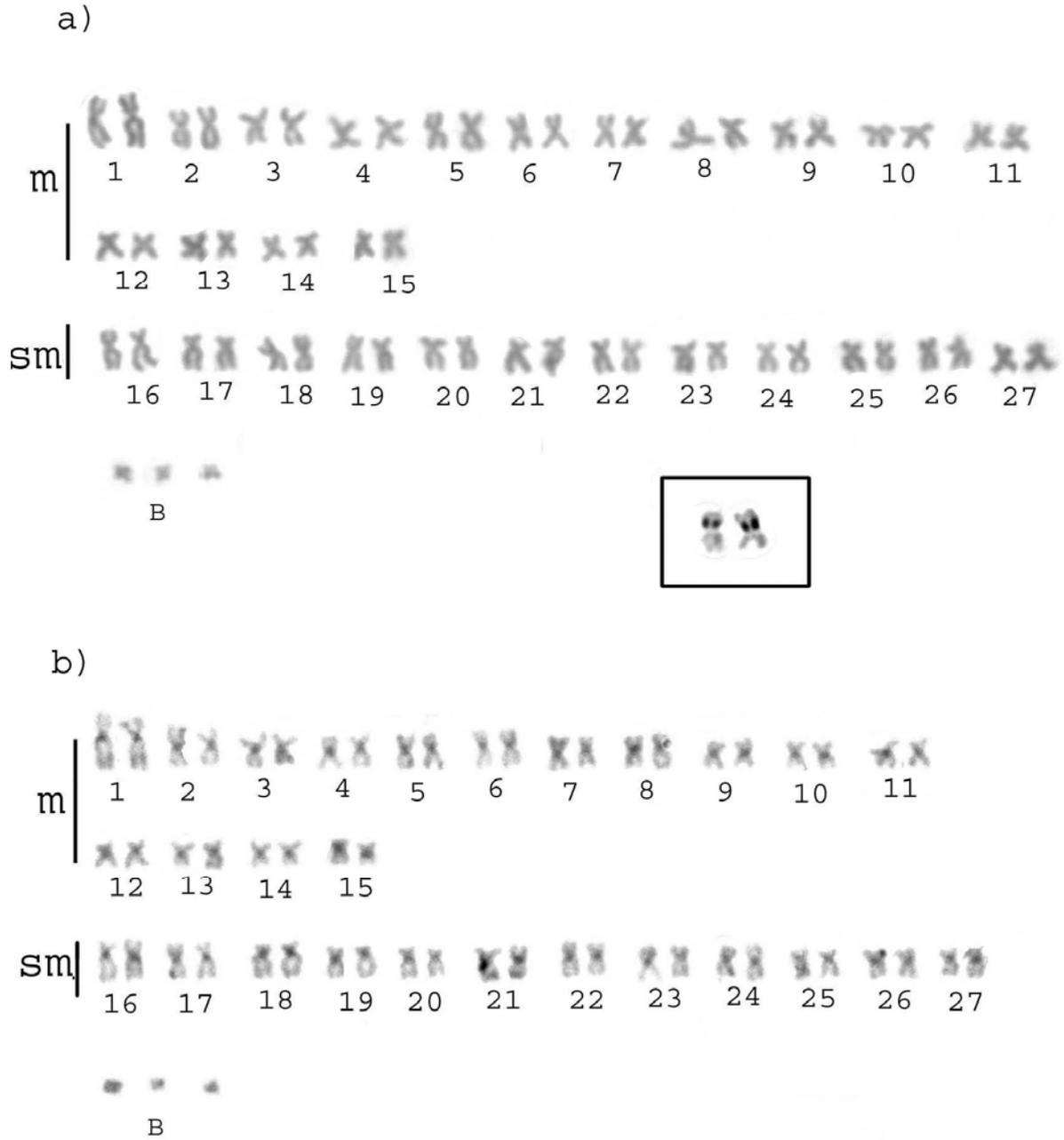


Figura 26: Cariótipo de fêmea de *Prochilodus lineatus* do ribeirão do Pântano. Em (a), coloração convencional por Giemsa, Ag-RON (box) e, em (b) distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pelo bandamento C.

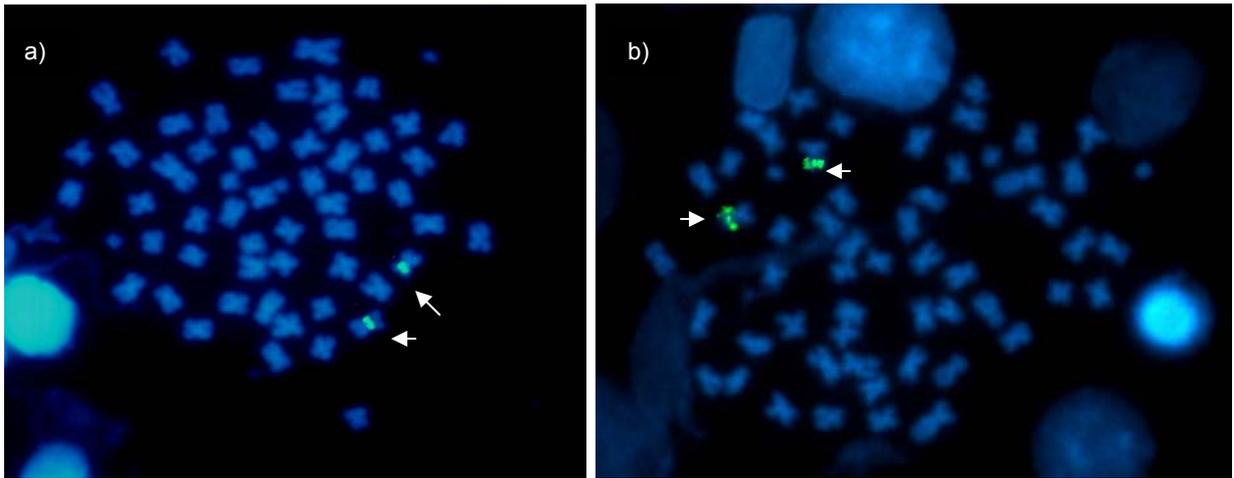


Figura 27: Cromossomos mitóticos de *Prochilodus lineatus* do ribeirão do Pântano. Em (a) hibridação fluorescente *in situ* evidenciando pelas setas os sítios ribossomais 18S e, em (b) os sítios ribossomais 5S.

## DISCUSSÃO

A bacia do rio Pardo, a qual integra o rio Mogi-Guaçu, possui cerca de 100 espécies de peixes (CASTRO & CASATTI, 1997). Os ribeirões do Feijão, afluente do rio Jacaré-Guaçu, bacia do Médio Tietê, e do Pântano, afluente do rio Mogi-Guaçu, bacia do Alto rio Paraná, serviram como objeto de estudo no presente trabalho, onde foram feitos estudos citogenéticos de exemplares das famílias Characidae, Cichlidae, Curimatidae, Gymnotidae e Prochilodontidae, pertencentes á ordem dos Characiformes, Gymnotiformes e Perciformes.

Estudos citogenéticos em peixes têm demonstrado que populações que foram isoladas geograficamente são mais propícias a sofrerem fixação de alterações cromossômicas.

A espécie *Astyanax fasciatus* foi coletada somente no ribeirão do Feijão. Já no ribeirão do Pântano, conseguiu-se um número maior de espécies coletadas somente neste local, sendo elas *Cichlasoma facetum*, *Cyphocarax modestus*, *Eigenmannia sp.*, *Moenkhausia sanctafilomenae* e *Prochilodus lineatus*.

O número diplóide encontrado em *Astyanax fasciatus* pode variar de  $2n=50$  cromossomos a  $2n=46$  cromossomos (Justi, 1993). Os espécimes de *Astyanax fasciatus* provenientes do ribeirão do Feijão apresentaram número diplóide de  $2n = 46$  cromossomos. Este número diplóide é o mesmo encontrado nesta espécie de algumas populações.

Artoni *et al.* (2006) encontraram três diferentes citótipos em *A. fasciatus* da região do rio Tibagi, PR. Estes citótipos apresentaram diferenças

consistentes em relação ao número diplóide ou em relação a distribuição do bandamento C.

A presença de grandes blocos de heterocromatina constitutiva localizadas em regiões terminais de cromossomos subtelo/acrocêntricos está de acordo ao encontrado para outras populações da espécie, e foi encontrada semelhante no presente estudo (CENTOFANTE *et al.*, 2003, ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006,). Artoni *et al.* (2006) encontraram um citótipo de *A. fasciatus* diferenciado por apresentar heterocromatinas proximais na grande maioria dos cromossomos do complemento, além da ausência dos blocos de heterocromatina terminais em cromossomos subtelo/acrocêntricos. As marcações por nitrato de Prata (Ag-RONs) foram encontradas em um par cromossômico submetacêntrico na região telomérica. Este par cromossômico marcado pelo nitrato de Prata parece ser conservado nas diferentes populações de *A. fasciatus* já analisadas (JUSTI, 1993; CENTOFANTE *et al.*, 2003; ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006). No entanto, além deste par submetacêntrico portador de sítios de RONs, a presença de RONs múltiplas também já tem sido relatada para populações de *A. fasciatus* (ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006).. A ocorrência de múltiplas RONs com sítios conspícuos principais e sempre ativos e sítios secundários com atividade variável demonstra ser comum em *Astyanax* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO 1991; ROCON-STANGE & ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; MANTOVANI *et al.*, 2000; FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003).

A hibridação *in situ* de rDNA 18S de *A. fasciatus* foi encontrada em dois pares cromossômicos submetacêntricos na região telomérica, sendo um deles

correspondente à marcação da RON, que foi encontrada em um par cromossômico sm na mesma região. Estudos feitos em duas populações de *A. fasciatus* por Pazza *et al.* (2006) apresentaram resultado semelhante, demonstrando um par cromossômico com grandes marcas em sítios correspondente a RON e pequenas marcas detectadas na região telomérica do braço longo de cromossomos subtelocêntricos e/ou acrocêntricos, também coincidentes à RON.

Os sítios de rDNA 5S foram encontrados em dois pares cromossômicos submetacêntricos, marcados na região pericentromérica, corroborando com os dados obtidos por Pazza *et al.* (2006) em duas populações de *A. fasciatus*, mostrando-se bem conservados na espécie. A ocorrência de dois pares com sítios rDNA 5S marcados é predominante em alguns grupos de peixes Neotropicais, por exemplo na família Anostomidae (MARTINS & GALETTI, 1999, 2000, 2001) e em *Astyanax* (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; VICARI *et al.*, 2008a).

Para a população de *Cichlasoma facetum* do ribeirão do Pântano foi encontrado número diplóide de  $2n=48$  cromossomos, bem como para as duas populações de *Geophagus brasiliensis* provenientes do ribeirão do Feijão e ribeirão do Pântano também estudadas no presente trabalho, demonstrando ser uma condição pleiomórfica destas espécies, corroborando com estudos realizados (FELDBERG & BERTOLLO, 1985a; BRUM *et al.*, 1998; FELDBERG *et al.*, 2003; VICARI *et al.*, 2006b).

A população de *Cichlasoma facetum* apresentou mesmo número diplóide que *Geophagus brasiliensis* de  $2n=48$  cromossomos, porém com  $NF=58$ . A distribuição de heterocromatina encontrada na população de *C.*

*facetum* apresentou marcas centroméricas em praticamente todos os cromossomos do complemento. Estudos comparativos de Cichlideos demonstram mesmo padrão de heterocromatina, localizadas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (KORNFIELD *et al.*, 1979; OLIVEIRA & WRIGHT, 1998). Vicari *et al.* (2006) demonstrou um padrão peculiar de distribuição da heterocromatina em *Cichlasoma facetum* do rio Jaguaiaíva apresentando alguns pares blocos heterocromáticos conspícuos e intersticiais.

As marcações pelo íon nitrato de Prata evidenciaram apenas um par cromossômico marcado na população de *C. facetum* analisada. A família Cichlidae possui a característica de RONS simples localizadas cromossomos acrocêntricos em regiões terminais do braço curto (BRUM *et al.*, 1998; FELDBERG *et al.*, 2003; VICARI *et al.*, 2006b).

Vicari *et al.* (2006b) analisaram por hibridação *in situ* fluorescente uma de *C. facetum* quanto ao número e localização dos sítios de rDNA 18S e 5S. Verificaram que os cromossomos portadores dos sítios ribossomais 18S eram homólogos entre as espécies e/ou populações, sempre localizados no braço curto de um par cromossômico st/a. Ainda, os sítios ribossomais entre os diferentes exemplares poderiam apresentar um polimorfismo de tamanho. Os resultados encontrados para o rDNA 18S das populações do ribeirão do Pântano também são homólogos aos encontrados por Vicari *et al.* (2006b). Em relação ao sítios ribossomal 5S as populações de *C. facetum* apresentaram um par de cromossomos st com sítios intersticiais do braço longo. Esse resultado corrobora aos encontrados por Vicari *et al.* (op. cit.) nas mesmas espécies de outras populações.

Os resultados encontrados neste estudo para *C. facetum* corroboram a hipótese de conservadorismo cromossômico para estas espécies, onde o número diplóide  $2n=48$ , um par st portador de RON e um par portador de rDNA 5S parecem ser características plesiomórficas para o grupo.

Membros da família Curimatidae são reconhecidos por apresentar uma forte identidade cariotípica. São encontrados em muitos ecossistemas de regiões Neotropicais (VARI, 1989). Por consequência, pequenas populações isoladas poderiam ser fixadas em locais de mudança ambiental, onde populações diferenciadas genética e morfológicamente poderiam surgir por especiação alopátrica (VARI, 1989)

De acordo com análises filogenéticas propostas por Vari (1983), as famílias Prochilodontidae, Curimatidae, Anostomidae e Chilodontidae são consideradas como grupos monofiléticos. Muitas espécies analisadas destas famílias demonstraram cariótipo composto por  $2n = 54$  cromossomos e número fundamental de  $NF = 108$  (BERTOLLO *et al.*, 1980; GALETTI JR. *et al.*, 1984; VERENE & GALETTI JR., 1989).

O número diplóide de  $2n = 54$  cromossomos meta/submetacêntricos encontrado para *Cyphocharax modestus* sugere uma espécie de Curimatidae muito conservada cariotipicamente. Venere e Galetti (1989) estudaram outras 10 espécies de Curimatidae e detectaram a manutenção de cariótipo composto por  $2n = 54$  cromossomos meta/submetacêntricos, sugerindo baixa taxa de diversificação na estrutura cromossômica deste grupo. Estudos em *C. platanus* demonstram cariótipo constituído por  $2n = 58$  cromossomos. Nesse caso, a hipótese mais aceita é de que *C. platanus* é derivado de um ancestral com  $2n = 54$  cromossomos, sendo originado por fissões cêntricas (VENERE, 1991).

A localização das regiões de heterocromatina de *Cyphocharax modestus* na região pericentromérica em quase todos os cromossomos é similar aos dados encontrados em muitas espécies de Curimatidae (VENERE & GALETTI, 1989; FELDBERG *et al.*, 1992; OLIVEIRA & FORESTI, 1993). Estes dados sugerem que o grupo possui evolução cariotípica muito conservada em termos de macroestrutura cariotípica (CARVALHO *et al.*, 2001).

Os espécimes *Cyphocharax modestus* demonstraram padrão de marcação de região organizadora de nucléolo (RON) com marcas teloméricas em um par cromossômico. Feldberg *et al.* (1992) estudando 9 espécies de Curimatidae demonstraram o mesmo padrão de RONS simples, porém estes sítios estariam em diferentes posições no cariótipo, sugerindo rearranjos cromossômicos na diversificação destes sítios nos cromossomos. Venere e Galetti Jr, (1989) já descreveram uma possível conservação do número diplóide e fórmula cariotípica para Curimatidae. No entanto, a localização dos sítios de RONS variáveis entre diferentes espécies já eram considerados caracteres citotaxonômicos fortes para a família (VENERE & GALETTI JR., 1989).

A hibridação *in situ* fluorescente de sonda rDNA 5S apresentou marcações na região pericentromérica de um par cromossômico, mesmo padrão obtido em estudos feitos por Santos *et al.* (2006) em *C. modestus* e *S. insculpta*, demonstrando ser um caráter conservado entre estas espécies.

O gênero *Eigenmannia* apresenta diferenças cariotípicas entre espécies e algumas populações, diferindo em número e fórmula cromossômica, podendo ser identificadas por meio de marcadores moleculares (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002). Foram analisadas três populações de *E. virescens* por Almeida-

Toledo *et al.* (2002) onde todas apresentaram mesmo número cromossômico com  $2n = 38$  cromossomos, no entanto, com fórmulas cariotípicas divergentes.

A população *Eigenmannia sp.* analisada no presente trabalho demonstrou estrutura cariotípica de  $2n = 28$  cromossomos e número fundamental igual a 42, sem a presença de dimorfismo sexual. Algumas espécies de *Eigenmannia* demonstram a presença de cromossomos sexuais, ao lado de outras sem cromossomos sexuais diferenciados (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000).

Em *Eigenmannia sp.* provenientes do rio Mogi-Guaçu foi determinado um número diplóide de  $2n=28$  cromossomos, sendo 14 metacêntricos e 14 submetacêntricos (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1996), semelhante ao encontrado no presente trabalho. A heterocromatina foi localizada nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos e teloméricas em alguns cromossomos metacêntricos, semelhante ao padrão encontrado nas populações dos rios de Emas e Araras analisadas por Almeida-Toledo *et al.* (1996).

As RONS de *Eigenmannia sp.* do ribeirão do Pântano foram localizadas nas regiões terminais do braço longo do par cromossômico metacêntrico número 3. Na população analisada por Almeida-Toledo *et al.* (1996) do rio de Emas, as RONS foram localizadas no par cromossômico acrocêntrico número 10, sendo que alguns indivíduos apresentaram heteromorfismo de tamanho destes sítios. Também foram localizados sítios de RONS extras, localizados na região proximal em um dos homólogos do par cromossômico número 11 e na posição terminal do braço curto de um dos homólogos do par 3. A população proveniente do rio Araras apresentou RONS localizadas na região terminal do

par 3 metacêntrico (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 1996), semelhante ao encontrado no presente trabalho.

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda rDNA 18S mostrou nos exemplares de *Eigenmannia sp.* apenas o par cromossômico número 3 marcado em posição terminal do braço longo. Este resultado somado as diferenças encontradas por Almeida-Toledo *et al.* (1996) sugerem a ocorrência de dois diferentes fenótipos fixados, indicando a não-existência de genes rDNA inativos. A FISH com sonda rDNA 5S apresentou marcações em três pares cromossômicos, sendo dois metacêntricos e um acrocêntrico.

Em *Moenkhausia sanctafilomenae* da população do Ribeirão do Pântano foi encontrado um número diplóide de  $2n=50$  cromossomos e uma variação intra/interindividual de 0-3 microcromossomos Bs. O número diplóide de  $2n=50$ , mais a ocorrência de microcromossomos Bs é uma situação comum encontrada em *Moenkhausia sanctafilomenae* (FORESTI *et al.*, 1989; PORTELA-CASTRO *et al.* 2001, DANTAS *et al.*, 2007). Porém, os espécimes analisados por Portela-Castro *et al.* (2001) provenientes do rio Paraná apresentaram 0-2 Bs presentes somente nos machos. Já os espécimes analisados por Foresti *et al.*, (1989) provenientes do rio Tietê apresentaram de 1-8 Bs, para ambos os sexos. Dantas *et al.* (2007) também relataram a presença de uma redução intra/interindividual de 0-5 microcromossomos B da população do rio Mogi-Guaçu. Ainda, alguns destes cromossomos B apresentaram sítios de rDNA 18S, detectados pela FISH. Resultados obtidos no presente trabalho mostraram a presença de 0-3 Bs em ambos os sexos e nenhum sítio de rDNA localizados nos cromossomos Bs. A alta frequência dos cromossomos supranumerários na espécie, independente de número e

distribuição, sugere uma importante função na história evolutiva do grupo (PORTELA-CASTRO *et al.* 2001).

Cromossomos B são geralmente originados do complemento A (JONES & REES, 1982), mas muitas possibilidades são consideradas sobre sua origem. Néó (1999) propôs uma hipótese para a origem dos cromossomos Bs, onde este evento seria devido a formação de dois isocromossomos a partir de um cromossomo subtelo/acrocêntrico presente no complemento padrão, sendo que o braço longo e curto originariam os macro e os microcromossomos B.

Três espécies de *Moenkhausia* (*M. sanctafilomenae*, *M. intermédia* e *Moenkhausia sp.*), foram analisadas por Dantas *et al.* (2007), demonstrando mesmo número cariotípico de  $2n=50$  cromossomos, com diferenças no número fundamental (NF) e cromossomos B totalmente heterocromáticos, semelhante ao encontrado em *M. sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano. Em *Moenkhausia*, a presença de heterocromatina é constante na região pericentromérica dos cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) demonstram algumas divergências nas subfamílias Tetragonopterinae. Em *M. sanctafilomenae* é comum a presença de RONs múltiplas (DANTAS *et al.*, 2007), característica encontrada na maioria dos espécimes analisados.

A hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S mostrou um par cromossômico sm marcado, na região terminal do braço curto na população de *M. sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano. No presente estudo, não foram localizados sítios de rDNA 18S nos microcromossomos Bs de *M. sanctafilomenae* do ribeirão do Pântano como aqueles encontrados por Dantas *et al.* (2007). Estes resultados corroboram com a hipótese de histórias evolutivas distintas para os microcromossomos Bs de *M. sanctafilomenae* de

populações isoladas geograficamente. É freqüente no gênero *Moenkhausia* a ocorrência de rDNA 18S marcados em apenas um par cromossômico. Dessa forma, a presença de múltiplos cistrons de rDNA 18S em *M. sanctafilomenae* demonstrada por Dantas *et al.* (2007) pode indicar uma condição apomórfica nos grupos, possivelmente originadas por eventos de transposição. O rDNA 5S de *M. sanctafilomenae* da população do ribeirão do Pântano foi localizado em região pericentromérica de um par cromossômico metacêntrico grande. Já os resultados de rDNA 5S encontrados por Dantas *et al.* (2007) mostraram este sítio localizado em posição pericentromérica de um par metacêntrico pequeno. Estes resultados demonstram que também o rDNA 5S pode apresentar variações interpopulacionais.

A análise citogenética em exemplares de *Prochilodus lineatus* do ribeirão do Pântano mostrou um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos do tipo m e sm, mais uma variação intra e interindividual de 0-3 cromossomos Bs. Pauls e Bertollo (1983) demonstraram a presença de  $2n=54$  cromossomos em *P. lineatus*, além da presença de cromossomos Bs pequenos e heterocromáticos. Muitas outras espécies de peixes neotropicais de diferentes gêneros, famílias e ordens tem demonstrado a presença de cromossomos supranumerários em seu cariótipo (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001), sendo documentada em aproximadamente 61 espécies, em 16 famílias de ordens de peixes neotropicais (CARVALHO *et al.*, 2008).

Espécimes de *Prochilodus lineatus* analisadas por Maistro *et al.* (2000) e Pauls & Bertollo, (1990) provenientes do rio Mogi-Guaçu apresentaram  $2n=54$  cromossomos, sendo 40 metacêntricos e 14 submetacêntricos, com presença

de 1-4 cromossomos supranumerários. No presente estudo foram encontrados uma variação de 0-3 cromossomos B, sendo totalmente heterocromáticos.

A heterocromatina constitutiva foi localizada em região pericentromérica de quase todos os cromossomos do complemento, além de alguns cromossomos com marcações terminais. Este padrão de distribuição já tem sido descrito para outras populações desta espécie (PAULS & BERTOLLO, 1983; MAISTRO *et al.*, 2000; ARTONI *et al.*, 2006). Alguns estudos sugerem que a composição genética dos cromossomos B de *Prochilodus lineatus* diferem dos cromossomos do complemento A (MAISTRO *et al.*, 2000).

As RONS de *P. lineatus* foram localizadas na região do braço longo do par cromossômico número 3, tanto pela técnica de Ag-RONS como pela FISH com sonda de rDNA 18S. O sítios de rDNA 5S foram localizados na região subterminal do par cromossômico metacêntrico estando em sintenia ao sítio de rDNA 18S. A sintenia do rDNA 18S e 5S já foram descritos por Vicari *et al.* (2006).

## 5. CONCLUSÕES

Através da utilização de técnicas citogenéticas básicas e moleculares aplicadas neste trabalho, pôde-se concluir que:

- As amostras da espécie *Geophagus brasiliensis*, que foram coletadas em ambas as sub-bacias, e *Ciclasoma facetum*, coletada apenas no ribeirão do Pântano, não apresentaram diferenças cariotípicas e morfológicas significantes entre si e quando comparadas a populações de outras localidades de trabalhos já publicados na literatura.
- Nas amostras de *Gymnotus carapo* foi identificado um heteromorfismo de tamanho visualizado no par cromossômico marcado pela hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S, em apenas um dos homólogos. As demais características como constituição cariotípica e distribuição heterocromática demonstraram-se conservadas em ambas as populações e quando comparadas com outros estudos.
- A espécie *Astyanax altiparanae*, que também foi coletada em ambos os ribeirões, apresentou diferença no número de sítios de rDNA 18S, sendo que a população do ribeirão do Feijão apresentou dois sítios marcados e a população do ribeirão do Pântano apresentou quatro sítios marcados. Também foram identificadas diferenças na distribuição heterocromática. Porém, não foram estas diferenças significantes a ponto de determinar diferenciação específica, possivelmente por existirem algumas regiões com pequenos sítios que não foram identificados, ou ainda por reflexo do conservadorismo cariotípico destes grupos. Além disso, a separação das populações

pode ter levado tempo suficiente para fixar uma pequena diferenciação entre as populações.

- A espécie *Astyanax fasciatus*, que foi coletada somente no ribeirão do Feijão apresentou diferenças em seu cariótipo e distribuição heterocromática, sugerindo a hipótese de um complexo de espécies para *A. fasciatus*.
- As amostras de *Moenkhausia sanctafilomenae* foram identificadas diferenças no número de cromossomos B encontrados e no tamanho dos cromossomos marcados pela Ag-RON. Os pares cromossômicos marcados a mais pelo nitrato de Prata podem ser devido a existência de regiões heterocromáticas com afinidade pela Prata.
- Em *Cyphocharax modestus* não foram identificadas a presença de cromossomos B, diferente de outras populações de estudos já realizados. Os demais dados cariotípicos foram semelhantes a dados existentes na literatura, demonstrando alto conservadorismo para a espécie.
- As amostras de *Prochilodus lineatus* foram identificadas diferenças no número de cromossomos B encontrados, sendo encontrados um número maior de cromossomos B em outras populações. Para os demais dados cariotípicos, outras populações apresentam mesmo padrão e conservadorismo.
- A espécie *Eigenmannia sp.*, que foi coletada apenas no ribeirão do Pântano foi comparada com outras populações de estudos já realizados por diferentes autores e não apresentaram diferenças morfológicas e cariotípicas consideráveis, porém algumas populações

demonstraram a presença de cromossomos sexuais, diferente da população do presente estudo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, P. R. A. M., P. M. GALETTI JR., 2005. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). **Genética** 123: 227–33.

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

ALBERT, J.S., CRAMPTON W.G.R. 2003. Seven new species of the neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). **Zootaxa** 287:1-54.

ALBERT, J. S., FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 1999. A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil : towards the deconstructions of *Gymnotus carapo*. **Copeia** (2), 410-421

ALBERT, J. S. 2001. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Teleostei: Gymnotiformes), Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan. 190, 1-127.

ALBERT, J. S., THORSEN, D.H.; LOVEJOY, N. R. 2005. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). **Systematics and Biodiversity** 2:375-417.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., 1978. **Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysii)**. PhD Thesis. Universidade de São Paulo, Brazil.

ALMEIDA-TOLEDO L.F., FERNANDES-MATIOLI, F.M.C. 2001. A molecular phylogeny analysis in *Gymnotus* species (Pisces, Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. **Caryologia** 54:23–30.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO FILHO, S.A (1984) Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genética** 64:165-169.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; GORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; DUTRILLAUX, B. 1998. BrdU replications patterns demonstrating chromosome homoeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 48 117-120.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1998. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In - Malabarba, L. R., Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S. and Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. **Edipucrs**, Porto Alegre, 603p.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; STOCKER, A. J.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). **Chromosome research** 4:301-305, 1996.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; DANIEL, M.F.Z.; TOLEDO FILHO, S.A 2000a. Sex chromossome evolution in fish: The formations of neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromossoma** 109:107-200.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z.; MOIZÉS, C. B.; FONTELES, S. A. B.; LOPES, C. E.; AKAMA, A.; FORESTI, F. 2002. Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia viresnces* (Gymntiformes: Sternopygidae). **Cytogenet Genome Res** 99:164-169.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OZOUF-COSTAZ, C., FORESTI, F., BONILLO, C., PORTO-FORESTI, F., DANIEL-SILVA, M. F. Z. 2002. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 97: 229-233.

ALVES, A.L., SANTOS, I. C. M. 2002. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae) with 2n=48 chromosomes. **Cytologia** 67:117-122.

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

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

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

BENINE, R. C. 2002. *Moenkhausia levidorsa*, a new species from rio Aripuanã, Amazon Basin, Brazil (Characiformes : Characidae) **Ichthyol Explor Freshwaters** 13 289-294.

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

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; GALETTI JR., P. M.; FERRARI, I.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. 1980. Estudos

citogenéticos em peixes da região amazônica.I. Ordem Cypriniformes. **Ciênc. Cult.** (Suppl.) 32:753.

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

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 Research** 8: 603-613.

BERTOLLO, L.A.C., C. OLIVEIRA, W.F. MOLINA, V.P. MARGARIDO, M.S. FONTES, M.C. PASTORI, J.N. FALCÃO, A.S. FENOCCHIO 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity** 93: 228–233.

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

BRASSESCO, M.S., PASTORI, M.C., RONCATI, H.A., FENOCCHIO, A.S., 2004. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Gen. Mol. Res.**, vol. 3, no. 2, p. 293-301.

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

BRUM, M. J. I. 1995. **Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteis**. In: Série Monografias 2. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p5-42.

BRUM, M. J. I., GALETTI JR., P. M. 1997. Ancestral karyotype of Teleostean fish. **J Comp Biol** 2:91-102.

BRUM, M. J. I.; MURATORI, C. F. M. L.; LOPES, P. R. D.; VIANNA, P. R. G. 1998. A ictiofauna do sistema lagunar de Marica (RJ). **Acta Biol. Leopoldensia**, 16(2): 45-55.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L. 1997. The fish fauna from a small forest stream oh the upper Paraná river basin, southeastern Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, München, 7 (4): 337-352.

CARAMASHI, E. M. P. 1986. **Distribuição da ictiologia de riachos da bas bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de aguas (Botucatu, SP)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 1990. **Indução de triploidia em Tambaqui (*Colossoma macroporum*) e Pacu (*Piractus mesopotamicus*) e sua avaliação pela análise cromossômica.** III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Botucatu-SP. Resumos:p 49.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 2001. Cytogenetic analysis of three species of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. **Chromosome Science** 5:91-96.

CARVALHO, R. A. 2008. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology** 72(8)

CAVALLARO, Z. I.; BERTOLLO, L. A. C.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. 2000. Frequency increase and mitotic satabilization of B chromossomes in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromossome Chromossome Res.** 8: 627-634.

CENTOFANTE L, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O. 2002. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 55:139–150.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; JUSTI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. 2003. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 14, p. 361-368,

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

DANTAS, E. S. O.; VICARI, M. R.; SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. 2007. Cytotaxonomy and Karyotype evolution in *Moenkhausia eigenmanni*, 1903 (Teleostei, Characidae). Vol.50 (3): 505-518,

DIAS, A.L., OLIVEIRA, C. AND MOREIRA-FILHO, O. 1992. Ocorrência de triploidia natural em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, September. **Resumos**, pp. 25.

DINIZ, D., BERTOLLO, L.A.C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** 56:303-313.

DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 2008. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica** 133:85-91.

DOMINGUES, S. M., VICARI, M. R., ABILHOA, V., WAMSER, J. P., CESTARI, M. M., BERTOLLO, L. A. C., ALMEIDA, M. C., ARTOI, R. F. 2007. Cytogenetic

and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, 5(1): 37-44.

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

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

FELDBERG, E., BERTOLLO L.A.C.. 1984. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces, Cichlidae). **Rev. Brasil. Genet.** 7: 639-645.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. 1985. Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38:257-268.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Rev. Bras. Genet.** 15:369-383.

FELDBERG, E., PORTO, J.I.R., NAKAYAMA, C.M. 1992a. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei: Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the Genus *Potamorhina*. **Genome** 36: 372-376.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of Cichid fishes during evolution, 258-308. In: Val, A. L.; Kapoor, B. G. Fish adaptations. **Science Publishers**, INC. New Dehli & New York. 418 pp.

FERREIRA, I.A.; BERTOLLO, L.A.C.; MARTINS, C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S *Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenet Genome Res**, 118:78-83.

FERRO NEO, D. M., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L. A. C. 2001. Nucleolar Organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110:55-62.

FERNANDES, F. M. C.; ALBERT, J. S.; DANIEL-SILVA, M. F. Z.; LOPES, C. E.; CRAMPTON, W. G. R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2005. A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. **Zootaxa** 933:1-4.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., TOLEDO-FILHO, S. A. 1997. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). **Cytogen. Cell Genet.** 78:236-239.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., MARCHETTO, M.C.N., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., TOLEDO-FILHO, S. A. 1998. High intraespecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian basins. **Caryologia**, 51, 221-234.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., MATIOLI, S. R., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2000. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: gymnotiformes) through analysis of nuclear (GGAC)<sub>n</sub> microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 803-807.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C. 2001. Genealogias e o processo de coalescência. In SR Matioli, **Biologia Molecular e Evolução**, Holos, Ribeirão Preto, p. 162-171.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2001. A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces, Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. Vol. 54, no. 1:23-30.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, A. S. 1984. Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). **Caryologia** 37:141-146.

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

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C., CARVALHO, E. D. 1984. Ploidy in the Pacu fish, *Piractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes): Techniques and comments. Rev. Brasil. Biol., 54(1): 31-37.

GALETTI JR, P. M. 1984. **Aspectos citogenéticos da família Anostomidae (Pisces, Characiformes)**. Tese de Doutorado, Departamento de Ciências Biológicas, UFSCAR, São Carlos, SP.

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

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

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

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

GALETTI, JR., P. M.; AGUILAR, C. T.; MOLINA, W. 2000. Na overview of marine fish cytogenetics. **Hidrobiologia**, 420:55-60.

GARUTTI, V. 1988. **Morfologia, reprodução e aspectos evolutivos de *Astianax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do rio Paraná**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARUTTI, V.; BRITISKI, 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** 13:65-88.

GÉRY, J. 1977. Characids of the World. Neptune City, NJ, T.F.H. Publications, 672p.

GIORA, J., FIALHO, C. B. 2003. Biologia alimentar de *Steindachnerina brevipinna* (Characiformes, Curimatidae) do rio Ibicuí-Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, **Ser. Zool.**, Porto Alegre, v. 93, n. 3, p.277-281.

GIULIANO-CAETANO, L.; JORGE, L.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, 66:39-43.

GODOY, M. P. 1975. **Peixes do Brasil-Sub-Ordem Characoidei. Bacia do rio Mogi-Guaçu**. Vol IV. Editora Franciscana, Piracicaba.

HATANAKA, T.; GALLETTI J.R. P.M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239-244.

HOWEL, W. M., BLACK, D. A. 1980. Controlled silver sataining of organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.

JESUS, C. M.; GALETTI J.R. P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. 2003. Molecular Characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** 118 25-32.

JONES, R. N., REES, H. 1982. B Chromosomes. New York. **Academic press**. 266p.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. Estudos citogenéticos em *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) del rio Paraná, Argentina. *Ictiologia* 9 (1/2):21-24.

JUSTI, A. J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces-Characidae, em três bacias hidrográficas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.

KAVALCO, K. F., MOREIRA-FILHO, O. 2003. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin *Caryologia* 56(4): 453-461.

KORNFIELD, I. L.; RITTE, U.; RICHLER, C.; WAHRMAN, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the Sea of Galilee. *Evolution* 33:1-14.

LANGEANI-NETO, F. 1989. **Ictiofauna do alto do rio Tietê (SP): Taxonomia.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da USP, São Paulo.

LATINI, A. O.; PETRERE J.R., M. 2004. Reduction of native fish fauna by alien species: an exmple from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, v. 11, p. 71-79.

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

LE GRANDE, W. H. 1981. Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus*. *Copeia* 1:33-52.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes *Hereditas* 52 202-220.

LOWE-MCCONNELL, R. H. 1969. Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol. J. Linnean Soc.* 1:51-75.

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

MAGO-LECCIA, F. 1994. Eletric fishes of the continental waters of América. Classificatio and catalogue of the electric fishes of the order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with descriptios of new genera and secies. Bibliogr. Acad. Cienc. Fishes Mater. *Nat* 29:1-225.

MALACRIDA, A. C. C. P. et al. 2000. Análise Cromossômica de *Astyanax* cf. *fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) coletados no Rio Claro-Tamarana/PR e Ribeirão dos Apertados/PR. In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 2000, Manaus. *Anais...* n8., 2000, Manaus, 2000: INPA, p. 25.

MARTINS, C.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B.; JULIO JR, H. F. 1995. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná river. **Cytologia** 42:535-537.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res** 363-367.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Res.**, v. 8, p. 353-355.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. 2001a. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910,

MAISTRO, E. L., F. FORESTI, C. OLIVEIRA & L. F. ALMEIDA-TOLEDO, 1992. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica** 87:101-106.

MAISTRO, E.L., FORESTI, F.; OLIVEIRA C. 1994. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Rev. Bras. Genet.**, São Bernardo do Campo, v. 17, n. 2, p. 153-156.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI F. 2000. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. **Genetica** 108: 119-125.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109:161-168.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae). **Genetica** 123:211-216.

MIYAZAWA, C. S.; GALETTI JR., P. M. 1994. First cytogenetical studies in *Characidium* (Characidiinae, Characidae). **Cytologia** 59:73-79.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax 'scabripinis'* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genet Mol Biol** 21:55-61, 1998.

MIZOGUCHI, S.M.H.K.; PORTELLA-CASTRO A.L.B., MARTINS-SANTOS I.C. 2007. Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguazu River. **Genet. Mol. Res.** 6 (3): 650-656

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

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia** 66:59-64.

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

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

NAVARRETE, M.C., JULIO J.R., F.H. 1997. Cytogenetic analysis of four Curimatidae from the Paraguay Basin, Brazil (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytologia** 62: 241-247.

NAKAYAMA, C. PORTO, J. R.; FELDBERG, E. 2000. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, serrasalmidae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica** 1:149-154.

NELSON, J. S. 1994 **Fishes of the world**. Joh Wiley & Sons, New York. 600p.

NÉO, D. M. 1999. **Distribuição dos cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) ao longo do Ribeirão Grande, na região de Campos do Jordão-SP**. São Carlos. Dissertação de Mestrado em Genética e Evolução- Universidade Federal de São Carlos, 85p.

OLIVEIRA, C. ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI H.A., TOLEDO-FILHO, S.A. 1988. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 577-624.

OLIVEIRA, C., F. FORESTI, 1993. Occurrence of supranumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpita* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios** 76:183-186.

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosome of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Res** 6:205-211.

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

- OZOUF-COSTAZ, C., FORESTI, F. 1992. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. **Netherlands J. Zoology** 42(2-3): 277-290.
- PACHECO, R.B., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2001. Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chrom Sci** 5:109-114.
- PAINTNER-MARQUES T. R.; GIULIANO-CAETANO L.; DIAS A. L. 2002. Multiple nors in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas** vol. 137, n<sup>o</sup>2, pp. 107-112.
- PAULS, E. & BERTOLLO L.A.C., 1990. Distribution of a supranumerary chromosome system and aspects of karyotype evolution in the genus *Prochilodus* (Pices, Prochilodontidae). **Genetica** 81:117-123.
- PAULS, E. & BERTOLLO, L.A.C. 1983. Evidence for a system of a supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia** 36: 207-314.
- PAGANELLI, H. H., 1990. **Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus*. (Linnaeus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas.** 115p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.
- PAZZA, R. & JÚLIO J.R, H. F. 2003. Occurrence of Three Sympatric Cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the Upper Paraná River Foodplain (Brazil). **Cytologia** 68, 159-163.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic Genome** 112:313-319.
- PENDÁS, A. M., MORÁN, P & GARCÍA-VÁZQUEZ, E. 1993. Ribosomal genes are interspersed throughout a heterochromatic arm in Atlantic salmon. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 63:128-130.
- PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2007. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes) **Genet. Mol. Biol.** vol.31 no.1 suppl.1
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83:2934-367

- PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI JR, P. M.; BERTOLLO, L. A, C. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 307-313.
- PORTELA-CASTRO, A., J'UNIOR, H. & NISHIYAMA, P. B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica** 110: 277–283, 2001.
- PORTELA-CASTRO, A. L. B. S.; JÚLIO, H. F.; NISHIYAMA, P. B. 2000. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica**, v. 110, p. 277-283.
- ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 1993. Supranumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Braz J Genet** 16:601-615.
- SALVADOR, L. B. & MOREIRA-FILHO O., 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pices, Characidae), **Heredity** 69:50-56.
- SANTOS, L. V. R; FORESTI, F.; WASKI, A. P.; OLIVEIRA, C.; MARTINS, C. 2006. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). **Genet. Mol. Biol.** Vol 29 no.2 São Paulo,
- SANTI-RAMPAZZO, A. P., NISHIYAMA, P. B., FERREIRA, P. E. B. & MARTINS-SANTOS, I. C. 2007. Cytogenetic analysis and description of the sexual chromosome determination system ZZ/ZW of species of the fish genus *Serrapinnus* (Characidae, Cheirodontinae). **Genetics Molecular Research** 6, 504–509
- SILVA, E. B. & MARGARIDO, V. P. 2005. An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). **Environmental Biology of Fishes** 00:1-5.
- SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. 1996. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 405-410,
- SOUZA, I. L. et al. 2001. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, v. 66, p. 85-91,
- SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax ax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, 60:1-11.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res** 75:304-306.

SUNAGA, T., VERANI, J. R. 1991. The fish communities of the lakes in the Rio Doce Valley, Northeast Brazil. **Verhandlungen der internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 24, p. 2563-2566.

TAKAHASHI, E. K. ; L. GIULIANO-CAETANO, A. L. DIAS. 1994. Variabilidade cariotípica em *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Tetragoopterinae) Voletado no Ribeirão Três Bocas-Londrinas, PR. P.53. In: *Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, 5, Botucatu, SP, Instituto de Biociências-UNESP.

TEIXEIRA, D. 1993. **Caracterização limnológica dos sistemas lóticos e variação temporal e espacial de vertebrados bentônicos na bacia do ribeirão do Feijão (São Carlos, SP)**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 193p. São Carlos, SP.

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

TOMPSON, K. W. 1979. Cytotaxinomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. **Copeia** 679-691.

TORRES-MARIANO, A. R., MORELLI, S. 2000. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from the Araguaí river, Uberlândia, MG, Brazil. **Braz. J. Biol.**, 66(1A):161-165.

VARI, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). **Smithson. Contrib. Zool.** 378: 1-59.

VARI, R. P. 1988. The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces, Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, pp. 343-377.

VARI, R. P. 1989. Systematics of the neotropical Characiform Genus *Psectrogaster* Eigenmann and Eigenmann (Pisces: Characiformes). **Smithson. Contrib. Zool.** 481:1-43.

VENERE, P. C., GALETTI JR., P. M. 1989. Chromosome relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae, **Rev. Bras. Genet.** 12:17-25.

VENERE, P. C. 1991. **Citogenética comparativa de peixes da família Curimatidae (Characiformes)**. Tese de Mestrado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

**VENERE, P.C. 1998. Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi). Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.**

VICENTE, V. E., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J.P.M. 1996. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet, Cell Genet.** 74:70-75

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Basic and Molecular Cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia** 59(3): 260-266.

VICARI, M.R.; NOLETO, R.B.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; & BERTOLLO LAC. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genet Mol Biol** 31:173-179.

VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F. 2006. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genet Mol Biol**, 29: 621-625.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janeiroensis*. **Cytogenet Gen Res**, (in press).

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

VICARI, M.R. 2006. **Diversidade de peixes residentes em cabeceiras de rios. Uma abordagem cromossômica em três diferentes biomas aquáticos da Região Sul do Brasil.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 158 p.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Basic and Molecular Cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia** 59(3): 260-266.

**VENERE, P.C. 1998. Diversificação cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi).** Doctoral thesis, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.

**WASKO, A. P. 1993. I-Estudos citogenéticos preliminares em *Phalloceros caudimaculatus* (Poeciliidae). II-Contribuição à citogenética de pequenos**

**caracídeos**. Bachelor Monograph, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brazil.

WASKO, A. P., CESAR, A. C. G., MARTINS, C., GALETTI-JR, P. M. 2001. A ZZ/ZW sex chromosome system in Cheirodontinae fish. ***Chromosome Science*** 5, 145–148.