

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

EDNER ABELINI

**Análise citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces;  
Characiformes)**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL – 2007

EDNER ABELINI

**Análise citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces;  
Characiformes)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Cristina Martins dos Santos.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL - 2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A141a Abelini, Edner  
Análise citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces; Characiformes) / Edner Abelini. -- Maringá : [s.n.], 2007. xii, 55 f. : il. color.

Orientadora : Profª. Drª. Isabel Cristina Martins dos Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2007.

1. Citogenética (Peixes). 2. *Astyanax scabripinnis*. 3. *Astyanax fasciatus*. 4. *Astyanax altiparanae*. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed. 597.48

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte  
(O autor);

À minha família e aos amigos que sempre estiveram comigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Sem Ele, eu nada seria.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pelas condições oferecidas à realização dessa pesquisa.

À professora doutora Isabel Cristina Martins dos Santos, de forma muito particular, pela orientação, compreensão, incentivo e, sobretudo, pela confiança depositada em mim, uma pessoa, inicialmente, desconhecida.

Aos membros da banca examinadora, doutor Carlos Alexandre Fernandes e doutora Ana Lúcia Dias, pelas significativas contribuições.

À professora doutora Ana Luiza de Brito Portela Castro, pelos conselhos tão importantes ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz, pela presteza e bom humor.

Aos técnicos Soninha e Léo, pela atenção às minhas necessidades no Laboratório, pela amizade, pelo interesse e bom convívio.

Aos meus pais, Eide Abelini e Elizeth Abelini, os quais sempre estiveram presentes em minha vida, com muito carinho, amor e bons conselhos, e que apoiaram a decisão de continuar meus estudos. Deixo, aos dois, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus irmãos, Alan e Vanessa, pela amizade e pelo carinho.

À auxiliar “mãezona”, Mazé, que demonstra no local de trabalho ordem e disciplina de um general, porém sempre atenta a qualquer sinal de tristeza e desânimo ao seu redor e, com pérolas de sabedoria, deixa os dias mais agradáveis, tornando nosso ambiente de trabalho um lugar muito especial.

Aos amigos Alexandre, Fernanda, Ana Paula e Suzana que, com calma e dedicação, dispuseram de seu tempo para me ajudar.

Aos meus amigos do laboratório, Thiago, Paulo, Renata, Renan, Lana, Paula, Valéria, Gisele e Carla, pelos bons momentos de descontração, de carinho, de ideias e de contribuições.

À minha amiga Rosiley, que sempre me incentivou a vir para Maringá e me ajudou muito.

À minha amiga Gislaine, pelo carinho e ajuda no Inglês.

À Direção e Supervisão do Colégio Estadual Adaile Maria Leite, pela compreensão.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que dividem as angústias e multiplicam as alegrias.

Aos queridos “amigos de vida”, Davis, Edinho, Clayton e Alex, os quais sempre se disponibilizaram a me ouvir quando eu mais precisava.

A todos os que, de alguma forma, participaram da construção desse trabalho, o meu muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

EDNER ABELINI, filho de Eide Abelini e Elizeth Abelini, nasceu em Taboão da Serra, estado de São Paulo, em 19 de agosto de 1977.

Em 1994, concluiu o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Maria Imaculada e, em 1996, o Ensino Médio, no Colégio Estadual Maria Auxiliadora, ambos em Taboão da Serra, estado de São Paulo.

Em dezembro de 1998, ingressou no curso de Graduação em Ciências-Biologia, na Universidade Paranaense, em Umuarama, graduando-se em 2001.

Iniciou, no ano de 2002, atividades profissionais como docente de Ensino Fundamental e Médio, atividades que exerce até a presente data.

Concluiu, em 2003, o Curso de Especialização em Morfofisiologia Humana, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2004, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, também na Universidade Estadual de Maringá.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Características gerais .....	3
2.1.1. Ordem Characiformes .....	3
2.1.2. Família Characidae .....	3
2.1.3. Subfamília Tetragonopterinae e Genera Incertae Sedis in Characidae .....	4
2.1.4. Gênero <i>Astyanax</i> .....	5
2.2. Estudos citogenéticos no gênero <i>Astyanax</i> .....	6
2.2.1. Estudos citogenéticos em <i>Astyanax scabripinnis</i> .....	7
2.2.2. Estudos citogenéticos em <i>Astyanax altiparanae</i> .....	9
2.2.3. Estudos citogenéticos em <i>Astyanax fasciatus</i> .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1. Material .....	12
3.1.1. Espécies analisadas .....	12
3.2. Métodos .....	14
3.2.1. Indução de mitoses .....	14
3.2.2. Técnica direta de preparação de cromossomos mitóticos .....	15
3.2.3. Estudos cariotípicos .....	16
3.2.4. Identificação dos cromossomos .....	16
3.2.5. Montagem dos cariótipos .....	17
3.2.6. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) .....	17
3.2.7. Detecção de heterocromatina constitutiva (Banda-C) .....	19
3.2.8. Processamento das imagens .....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
4.1. <i>Astyanax scabripinnis</i> .....	21
4.2. <i>Astyanax altiparanae</i> .....	27
4.3. <i>Astyanax fasciatus</i> .....	32
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## RESUMO

ABELINI, Edner. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Abril de 2007.

**Análise citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces; Characiformes).** Professora orientadora: Isabel Cristina Martins dos Santos. Professores conselheiros: Ana Luiza de Brito Portela Castro e Horácio Ferreira Júlio Júnior.

Foram realizados estudos citogenéticos em três espécies do gênero *Astyanax*: *Astyanax scabripinnis* (córrego Tagaçaba e córrego Tauá), *Astyanax altiparanae* (rio Iguaçu e ribeirão Maringá) e *Astyanax fasciatus* (ribeirão Maringá). As duas populações de *Astyanax scabripinnis* apresentaram  $2n=50$  cromossomos, porém, enquanto a população do córrego Tagaçaba apresentou fórmula cariotípica distribuída em 10M, 22SM, 6ST, 12A (NF=88) e sistema de NOR-simples, a população do córrego Tauá mostrou fórmula cariotípica com 10M, 18SM, 8ST, 14A (NF=86) e sistema de NOR-múltipla, pela análise Ag-NOR. Com a utilização da técnica de FISH na população do Tagaçaba, foi possível detectar genes rDNA em 14 cromossomos, além de marcação bitelomérica em 1 cromossomo. Esses dados indicam que apenas um par de cromossomos portadores da NOR está sendo expresso nesta população. O padrão de heterocromatina constitutiva também mostrou diferenças entre as duas populações, com marcações pericentroméricas em quase todos os cromossomos para a população do Tagaçaba e com grandes blocos teloméricos para a população do Tauá. Além disso, a população do Tagaçaba apresentou macrocromossomo B em 50% das fêmeas analisadas. As duas populações de *Astyanax altiparanae* apresentaram  $2n=50$  cromossomos, mas diferiram na fórmula cariotípica. A população do rio Iguaçu mostrou 10M, 26SM, 6ST, 8A (NF=92), enquanto a população do ribeirão Maringá apresentou fórmula cariotípica 10M, 22SM, 6ST, 12A (NF=88). As duas populações apresentaram sistema de NOR-múltipla com 5 e 3 marcações, respectivamente, e um padrão de heterocromatina constitutiva muito similar, com marcações na maioria dos cromossomos em regiões pericentroméricas, teloméricas, além de blocos intersticiais próximos ao centrômero. Para a população de *Astyanax fasciatus* do ribeirão Maringá, foi evidenciado um número diplóide  $2n=46$  cromossomos com fórmula cariotípica 14M, 10SM, 12ST e 10A (NF=82), com sistema de NOR-simples e padrão de heterocromatina com

marcações evidentes nas regiões teloméricas em vários cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, característicos da espécie. Os dados apresentados para essa espécie diferem em relação ao número diplóide para algumas populações já analisadas ( $2n=48$  cromossomos) e fórmula cariotípica para aquelas com mesmo número diplóide. Os dados apresentados para as três espécies corroboram com os aspectos básicos característicos do grupo, indicando um complexo de espécies para cada uma delas. Mas uma padronização de dados por meio de técnicas mais resolutivas deve ser considerada para melhor definição da existência de unidades taxonômicas diferentes dentro de cada grupo.

Palavras-chave: Citogenética, *Astyanax*, banda-C, NOR, cariótipo.

## ABSTRACT

ABELINI, Edner. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Abril, 2007. **Cytogenetic analysis in three species of the genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes)**. Adviser: Isabel Cristina Martins dos Santos. Committee members: Ana Luiza de Brito Portela Castro and Horácio Ferreira Júlio Júnior.

Cytogenetics studies were conducted on three species of the genus *Astyanax*: *Astyanax scabripinnis* (Tagaçaba stream and Tauá stream), *Astyanax altiparanae* (Iguaçu river and Maringá stream) and *Astyanax fasciatus* (Maringá stream). Both populations of *Astyanax scabripinnis* showed  $2n=50$  chromosomes, while the population from Tagaçaba stream showed karyotypic formulae comprising 10M, 22SM, 6ST and 12A (NF=88) and simple-NOR system, the other population, from Tauá stream showed karyotypic formulae with 10M, 18SM, 8ST and 14A (NF=86) and multiple-NOR system, by analysis Ag-NOR. However, with the use of FISH technique in population from Tagaçaba it were possible detect genes rDNA in 14 chromosome, over there bitelomeric markes in one chromosome. This data indicates that the only NOR chromosome pair is being expressed in this population. The constitutive heterochromatin standard showed also difference between the two populations, with pericentromeric markings in the majority of the chromosomes of the population from Tagaçaba and with large telomeric blocks for population from Tauá. Besides Tagaçaba showed macrochromosome B in 50% of female analyzed. Both population of *Astyanax altiparanae* showed  $2n=50$  chromosomes, but differed in karyotypical formulae. The population from Iguaçu river showed 10M, 26SM, 6ST and 8A (NF=92) while the population of Maringá stream exhibited karyotypic formulae 10M, 22SM, 6ST and 12A (NF=88). Both population presented multiple-NOR with five and three markes, respectively and a constitutive heterochromatin standard very similar, with markers in the majority of the chromosomes in pericentromeric regions, telomeric, over there interstitial blocks next to centromere. In population of *Astyanax fasciatus* from Maringá stream was reported the diploid number  $2n=46$  chromosomes with karyotypic formulae 14M, 10SM, 12ST and 10A (NF=82) with simple-NOR system and heterochromatin standard with obvious markes in a telomeric regions in several chromosome subtelocentrics and acrocentrics characteristic of the specie. The

data showed for this species differ in relation to diploid number for some populations analysed ( $2n=48$  chromosome) and karyotypic formulae for those with the same diploid number. The present data showed for three species collaborate with aspects basics characteristic of the group indicating a complex of the species for each of theirs. However, a standarting of data using techniques more resolutives should be considered for the best definition of existence of differents units taxonomics.

Key words: Citogenetic, *Astyanax*, C-banding, NOR, cariotipic.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentro do grupo dos vertebrados, os peixes são os mais numerosos e diversificados, isso pode ser observado no grande número de espécies existentes, cerca de 28.500 (Nelson, 1994). Eles representam aproximadamente 50% das espécies de vertebrados (Vazzoler, 1996). De acordo com Vari e Malabarba (1998), a diversidade de peixes de água doce da região neotropical, compreendida desde o norte do México até o Sul da Argentina, é uma das mais ricas do mundo, contribuindo com cerca de 25% das espécies de peixes descritas na época. Somente no trecho brasileiro da bacia do alto rio Paraná foram estimadas mais de 250 espécies de peixes, mas não existe um consenso em relação ao status taxonômico de muitas espécies (Agostinho e Júlio-Junior, 1999).

São conhecidos os números diplóides e/ou haplóides para 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias em peixes neotropicais, com registro de grande diversidade cariotípica. O menor número cromossômico relatado até o momento é  $2n=20$  cromossomos em *Pterolebias longipinnis* e o maior é  $2n=134$  cromossomos em *Corydoras aeneus* (Oliveira et al., 2000).

Existem grupos de peixes que apresentam uma grande variabilidade quanto à morfologia e ao número de cromossomos. Exemplos são os gêneros *Astyanax* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Fernandes e Martins-Santos, 2003), *Eigenmannia* (Almeida-Toledo et al., 1984; Fidelis, 2005) e *Gymnotus* (Foresti et al., 1984). Ao contrário, outros grupos possuem uma estrutura cromossômica bem conservada, como os Anostomidae (Galetti Jr. et al., 1984), Curimatidae (Venere e Galetti Jr., 1989) e Prochilodontidae (Pauls e Bertollo, 1990). Esses últimos grupos têm sido considerados monofiléticos (Vari, 1983; Venere e Galetti-Jr, 1989).

Já em peixes neotropicais, foram observadas ocorrências de cromossomos supranumerários (Fenocchio e Bertollo, 1990; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2005), cromossomos sexuais (Bertollo, 1978; Venere, 1998; Centofante et al., 2001), triploidias (Morelli et al., 1983; Fauaz et al., 1994; Borin et al., 2002) e polimorfismos estruturais (Almeida-Toledo et al., 1984; Foresti et al., 1984; Fernandes, 2003)

A citogenética tem se mostrado uma ferramenta importante na obtenção de dados para a caracterização das mais diferentes espécies de peixes, visto que

separa espécies morfológicamente semelhantes e auxilia na identificação de espécies novas, o que contribui para a diferenciação dos grupos conservativos dos não conservativos. Sua importância se torna ainda mais evidente quando associada à sistemática, pois dessa forma apresenta valioso papel na identificação de espécies taxonomicamente problemáticas.

O gênero *Astyanax* apresenta ampla distribuição geográfica, mas sua dominância ocorre na América do Sul. Esse gênero tem despertado o interesse dos citogeneticistas, devido à alta diversidade cariotípica observada. Por outro lado, *Astyanax scabripinnis* tem sido a espécie mais estudada do ponto de vista citogenético dentro do gênero, demonstrando diferenças cromossômicas numéricas e estruturais, o que indica a existência de um “complexo *scabripinnis*”.

Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver uma análise sobre duas populações de *Astyanax scabripinnis*, sobre duas *Astyanax altiparanae*, isoladas geograficamente. Além disso, analisará também uma população de *Astyanax fasciatus*. A finalidade será detectar diferenças e semelhanças interpopulacionais, dentro de cada espécie, contribuindo assim para os estudos citotaxonômicos no gênero *Astyanax*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Características gerais**

#### **2.1.1. Ordem Characiformes**

A ordem Characiformes representa o maior grupo de peixes da América do Sul, com mais de 1100 espécies conhecidas nesse continente. Envolve desde peixes muito pequenos, cujas espécies não ultrapassam a 3 cm de comprimento quando adultas, até indivíduos de grande porte, que podem atingir algumas dezenas de quilos (Melo et al., 2005). Uma das principais características do grupo é a grande variação morfológica apresentada pelas várias famílias, gêneros e espécies e ainda a extrema variabilidade adaptativa à diversidade de habitats da região neotropical. Segundo Melo et al., (2005), essas condições podem ser facilmente verificadas pela ocorrência desses peixes em ambientes muito restritos, como em pequenas poças de córregos de cabeceiras e até em grandes rios e lagos.

Os peixes dessa ordem podem ser facilmente reconhecidos pela presença de escamas, cobrindo todo o corpo - com exceção da cabeça – presença de pré-maxilar, geralmente fixo ao crânio, não protrátil, nadadeira pélvica, situada em posição abdominal, e uma nadadeira sem raios, situada entre a nadadeira dorsal e a caudal - chamada nadadeira adiposa, presença de linha lateral, muitas vezes curvada e nadadeira caudal curta a moderadamente longa (menos de 45 raios) (Britski et al., 1988).

#### **2.1.2. Família Characidae**

A família Characidae, além de ser uma das maiores da ordem Characiformes, com cerca de 170 gêneros e mais de 885 espécies, é a mais complexa (Nelson, 1994). Indivíduos pertencentes a essa família ocorrem em todos os ambientes de água doce da região Neotropical e no continente africano (Lucena, 1993). Os seus representantes são popularmente conhecidos como tambiús, lambaris, matrinchãs, dourados, entre outros. Seus hábitos alimentares são bem diversificados e exploram uma grande variedade de habitats.

O grande número de espécies incluído nessa família, associado à imensa variedade de formas que ela comporta, tem dificultado as proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro dela. Desse modo, em virtude das dúvidas sobre o monofiletismo da família Characidae, as relações de parentesco com as demais famílias de Characiformes têm sido prejudicadas (Lucena, 1993).

Representantes dessa família são caracterizados por possuírem dentes multicuspidados, dispostos em duas fileiras no pré-maxilar e uma no dentário. A linha lateral é sempre presente, podendo estar completa ou incompleta e a nadadeira adiposa quase sempre presente (Britski et al., 1988).

Os primeiros estudos citogenéticos de espécies dessa família foram realizados por Post (1965). Seus estudos apresentaram o número cromossômico de vários peixes, incluindo alguns da família Characidae. O número haplóide e/ou diplóide está compreendido entre  $2n=28$  cromossomos para uma espécie de *Hemigramus* (Scheel, 1973), até  $2n=64$  cromossomos para *Serrasalmus hollandi* (Muramoto et al., 1968), com maior incidência de cariótipos com  $2n=48$  e  $52$  cromossomos.

Citogeneticamente, os caracídeos apresentam cromossomos relativamente grandes, principalmente se comparados com os cromossomos de peixes pertencentes à família Pimelodidae. Possuem variabilidade de número e fórmula cariotípica em populações de uma mesma espécie (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Alves e Martins-Santos, 2002; Paintner-Marques et al., 2002a; Fernandes e Martins-Santos, 2003). Essa família apresenta uma característica que, de modo geral, se mantém presente em quase todos os indivíduos: a presença de um par de cromossomos metacêntricos correspondentes, geralmente, ao maior par do complemento (Scheel, 1973; Moreira-Filho, 1989; Pacheco, 2001).

### **2.1.3. Subfamília Tetragonopterinae e Genera Incertae Sedis in Characidae**

Incertae Sedis é um termo usado para definir um grupo taxonômico em que as suas relações filogenéticas principais são desconhecidas ou indefinidas. Têm sido listados 88 gêneros como Incertae Sedis que incluem 620 espécies, sendo que, dentre essas, 399 (64%) espécies são taxonomicamente pouco conhecidas e

constituem provavelmente grupos não monofiléticos de Characidae. *Hyphessobrycon* (97 espécies), *Astyanax* (86 espécies), *Moenkhausia* (58 espécies), *Bryconamericus* (51 espécies) e *Hemigrammus* (43 espécies) são exemplos de alguns dos gêneros Incertae Sedis (Reis et al., 2003). Além disso, mais de 47 gêneros (53%), incluídos com Incertae Sedis, são monótipos e 25 gêneros (26%) contêm somente duas ou três espécies (Reis et al., 2003).

As subfamílias Tetragonoperinae e Genera Incertae Sedis são compostas, na maioria, por peixes de pequeno porte, pertencentes a diferentes gêneros, como: *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus*, *Moenkhausia*, entre outros.

Eigenmann (1917), um dos primeiros a realizar estudos das relações filogenéticas nesta subfamília, afirma que muitos gêneros de Tetragonopterinae tiveram origem polifilética, isto é, a partir de ancestrais incomuns. De acordo com o autor, os gêneros *Astyanax* e *Moenkhausia* possivelmente sejam ancestrais na subfamília Tetragonopterinae e os gêneros *Markiana*, *Gymnocorymbus*, *Tetragonopterus* e *Entomolepsis* teriam se irradiado de *Moenkhausia*, enquanto outras linhagens teriam se diferenciado de *Astyanax*. Os gêneros *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* divergiram independentemente de *Moenkhausia* e de *Astyanax* (Eigenmann, 1917). Assim, a evolução dos Tetragonopterinae parece ter ocorrido de maneira complexa e até hoje tem sido considerado um grupo mal delimitado.

Em geral, todos os grupos de Characidae necessitam de revisões, uma vez que, de concreto, pouco se sabe sobre as relações entre os diferentes grupos que compõem esta família (Britski, 1992).

#### **2.1.4. Gênero *Astyanax***

O gênero *Astyanax*, pertencente à subfamília Genera Incertae Sedis (Reis et al., 2003), é o grupo de peixes que mais possui dados citogenéticos até o momento. Talvez pela enorme diversidade de espécies apresentadas, no total de 86 espécies válidas, segundo Reis et al., (2003), ou 116 espécies válidas, conforme Froese e Pauly (2007), e também pela grande diversidade cariotípica verificada no gênero.

A posição taxonômica do gênero é:

Classe: Osteichthyes

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Genera Incertae Sedis in Characidae

Gênero: *Astyanax*

O gênero *Astyanax* possui ampla distribuição geográfica e seus representantes são facilmente encontrados nas bacias hidrográficas brasileiras (Britski, 1972). Correspondem à maior unidade dos Genera Incertae Sedis in Characidae. Entre os sistematistas brasileiros, existe uma opinião comum em relação à difícil identificação e complexidade taxonômica dos diferentes gêneros da subfamília Genera Incertae Sedis in Characidae. Os representantes deste gênero são popularmente conhecidos como lambaris, tambiús, tetras ou piabas, caracterizados por apresentar linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, nadadeira caudal nua, com escamas apenas na base (Britski, 1972). Eram conhecidas 6 subespécies de *A. scabripinnis*: *A. scabripinnis scabripinnis*, *A. scabripinnis rivularis*, *A. scabripinnis longirostris*, *A. scabripinnis intermedius*, *A. scabripinnis laticeps* e *A. scabripinnis paranae*. Todas elevadas à categoria de espécie, com exceção de *A. scabripinnis longirostris* (Reis et al., 2003). A reprodução desse grupo de peixes se dá no período de novembro a janeiro de cada ano e alguns indivíduos se reproduzem durante o ano todo (Barbieri, 1992).

## **2.2. Estudos citogenéticos no gênero *Astyanax***

Antes da utilização da citogenética em peixes, a caracterização taxonômica dos indivíduos era feita basicamente com dados morfológicos. Isso gerava opiniões divergentes quanto à classificação dos peixes do grupo. Os estudos citogenéticos no grupo surgiram, inicialmente, apenas para resolver problemas de filogenia e taxonomia (Peixoto e Erdtmann, 1988), mas o desenvolvimento de novas técnicas de bandamento possibilitou uma ampliação nas investigações citogenéticas (Oliveira et al., 2002).

A citogenética, a princípio, foi considerada uma metodologia auxiliar, contudo vem transformando-se numa ferramenta importantíssima, porque esclarece questões de cunho sistemático e evolutivo, além de propiciar o estudo de polimorfismo e poliploidia cromossômica (Araújo e Morelli, 2000). A sua importância na piscicultura pode ser observada pela contribuição nos trabalhos de melhoramento

genético e manipulação cromossômica com técnicas de bandamento cromossômico e marcadores citogenéticos.

Os *Astyanax* caracterizam-se por apresentar número diplóide variando de  $2n=36$  cromossomos em *Astyanax schubarti* a  $2n=50$  cromossomos em *Astyanax altiparanae*, *A. scabripinnis*, *A. eigenmanniorum*, *A. mexicanus*, entre outros (Oliveira et al., 1988; Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Fauaz e Moreira-Filho, 1991; Fauaz et al., 1994; Daniel-Silva, 1996; Fernandes e Martins-Santos, 2003). Apesar dessa grande variabilidade cromossômica, existe uma característica que vem se mantendo constante no gênero, que é a presença de um par de cromossomos do tipo metacêntrico, maior que os demais cromossomos do complemento (Pazza et al., 2002), com exceção de *A. fasciatus*.

### **2.2.1. Estudos citogenéticos em *Astyanax scabripinnis***

*Astyanax scabripinnis* é uma espécie que forma pequenas populações isoladas em cabeceiras de pequenos tributários, onde grandes rios oferecem uma barreira biológica para a sua dispersão (Moreira-Filho e Bertollo, 1991). Dentro do gênero, é a espécie que apresenta maior diversidade cariotípica, com número diplóide variando de  $2n=46$ ,  $2n=48$  e  $2n=50$  cromossomos. Isso demonstra se tratar de um “complexo de espécies” (Moreira-Filho et al., 1988; Maistro et al., 1992; Souza et al., 1995; Vicente et al., 1996; Porto-Forest et al., 1997; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998b; Fernandes e Martins-Santos, 2005).

Outra forma de variação do número diplóide/haplóide no gênero é a ocorrência de cromossomos supranumerários ou cromossomos Bs, os quais podem aparecer como microcromossomos (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Alves e Martins-Santos 2002), cromossomos de tamanho médio (Fernandes e Martins-Santos, 2005) e macrocromossomos (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Moreira-Filho et al., 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2005).

Nos peixes, os cromossomos supranumerários são registrados em 40 espécies, não sendo considerados muito difundidos (Oliveira et al., 1997). Ocorrem com maior frequência nas espécies de peixes neotropicais (Vissotto et al., 1999) e são observados especialmente nas famílias Prochilodontidae, Curimatidae, Parodontidae, Pimelodidae, Heptapteridae, Loricariidae, Cichlidae, Coregonidae e

Characidae (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997). Dentre essas famílias com cromossomos supranumerários, uma grande frequência é detectada na família Characidae, especialmente nas espécies do gênero *Astyanax*, os quais têm sido descritos nas espécies *Astyanax eigenmanniorum* (Stripecke et al., 1985), *A. fasciatus*, *A. schubarti* e *A. scabripinnis* (Moreira-Filho et al., 2001). Estes cromossomos Bs são ótimos marcadores cromossômicos, utilizados na diferenciação de populações de espécies portadoras das não portadoras desses (Vissoto et al., 1999).

A hipótese mais aceita para explicar a origem dos cromossomos Bs, conforme Jones e Rees (1982) e Fenocchio et al., (2000), é a de que eles seriam provenientes dos cromossomos do complemento A, podendo ser explicada por meio da ocorrência de polissomias, ampliações de regiões paracentroméricas, rearranjos cromossômicos ou devido à não disjunção nos processos mitóticos ou meióticos dos cromossomos Bs. Fenocchio et al., (2000) sugerem que as células teriam mecanismos que promovem a rápida heterocromatinização de elementos extras logo após a sua formação. Isso evita um possível pareamento entre esses elementos e os cromossomos A, seguido da diferenciação em cromossomos Bs. A maioria dos cromossomos Bs é considerada inerte ou mesmo elementos dispensáveis, os quais podem ser fixados nas populações (Jonnes e Rees, 1982).

Fauz et al (1994) encontraram um exemplar triplóide, no rio das Pedras, Campos do Jordão/SP, mesmo rio onde Maistro et al. (1994a) capturaram 1 indivíduo igualmente triplóide, além de terem encontrado 1 indivíduo triplóide também no rio Araquá, cidade de Botucatu/SP. Nos indivíduos do rio das Pedras, foi verificada a presença de 2 macrocromossomos supranumerários, enquanto, para o indivíduo do rio Araquá, foi evidenciado apenas 1 macrocromossomo B.

Além das variações no número diplóide, têm sido observadas também variações na morfologia dos cromossomos, padrão de bandamento C e regiões organizadoras de nucléolos (Maistro et al., 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a; Fernandes, 2006).

Em relação à NOR, observam-se variações de número (sistemas simples e múltiplo) e de localização, utilizadas como marcadores citogenéticos e, ainda, auxiliares na diferenciação entre espécies, ou até mesmo em populações (Maistro et al., 1998; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a; Centofante et al., 2003). NOR-múltipla tem sido a mais freqüente em *A. scabripinnis* e o maior número observado foi de 13

pares de cromossomos nucleolares, descritos para a população do rio Jucu (ES) (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993). Mizoguchi e Martins-Santos (1998a) observaram sistema de NOR-múltipla em populações de *Astyanax scabripinnis*, sugerindo um mecanismo de ativação gênica o qual indica a presença de um par organizador nucleolar principal. Contudo, sistema de NOR simples foi observado em indivíduos dentro das populações por Maistro et al., (1992); Souza e Moreira-Filho, (1995); Ferro et al., (2001).

O padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva em *Astyanax scabripinnis* em sete populações analisadas por Moreira-Filho e Bertollo (1991) apresentou blocos centroméricos, porém as marcações teloméricas foram divergentes em relação aos pares cromossômicos.

### **2.2.2. Estudos citogenéticos em *Astyanax altiparanae***

Recentemente, foi realizada uma revisão por Garutti e Britski (2000) em *Astyanax bimaculatus*, bem comum nas bacias hidrográficas brasileiras e que erroneamente era identificada como *Astyanax bimaculatus*. Esses autores descreveram uma nova espécie de *Astyanax* da bacia do alto Paraná, nomeada de *Astyanax altiparanae*. Segundo Garutti e Britski (2000), os *Astyanax* do alto rio Paraná, (entende-se alto rio Paraná como a região à montante da barragem da usina de Itaipu), foram incorretamente identificados com o nome de *Astyanax bimaculatus* e pertencem à nova espécie descrita.

Todas as populações de *Astyanax altiparanae* estudadas até o momento apresentaram número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, ocorrendo diferenças nas fórmulas cariotípicas nos diferentes citótipos entre as populações e dentro de uma mesma população (Morelli et al., 1983a; Paganelli, 1990; Takahashi, 1995; Pacheco, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2004).

Os estudos das regiões organizadoras de nucléolos evidenciaram um sistema de NOR-múltipla em diferentes populações. Observou-se de 1 até 10 cromossomos nucleolares com marcações teloméricas (Paganelli, 1990; Takahashi, 1995; Daniel-Silva, 1996; Pacheco, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2004).

A técnica de Banda-C evidenciou, em *Astyanax altiparanae* do rio São Francisco, analisados por Paganelli (1990), blocos heterocromáticos, marcando regiões intersticiais na maioria dos cromossomos, blocos heterocromáticos em

posição terminal no braço longo de alguns cromossomos e o braço menor do par 17 totalmente heterocromatinizado.

A quantidade de heterocromatina constitutiva observada em *Astyanax altiparanae* da bacia do rio Tibagi/PR mostrou-se reduzida. A ocorrência de alguns blocos intersticiais, e raramente centroméricas, se deu em regiões teloméricas (Takahashi, 1995).

O padrão de distribuição de banda-C na população do rio Machado/MG apresentou uma distribuição particular, em que fracas marcações centroméricas e teloméricas foram acompanhadas de 4 pares de cromossomos, marcados com blocos heterocromáticos, em regiões intersticiais (Biavati e Maistro, 2000).

Os estudos realizados por Pacheco (2001) nas populações do rio Couro de Boi/PR e rio Tibagi/PR apresentaram marcações centroméricas, teloméricas e algumas marcações intersticiais. Enquanto, na população do rio Claro, os blocos heterocromáticos apresentaram-se, principalmente, em regiões centroméricas e algumas intersticiais. Já a população do ribeirão Três Bocas, apresentou marcações bem evidentes em regiões centroméricas, teloméricas e algumas intersticiais.

### **2.2.3. Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus***

*Astyanax fasciatus* apresenta uma grande diversidade cromossômica em relação ao seu número diplóide. A população do rio Mogi-Guaçu, na cidade de Pirassununga/SP, analisada por Daniel-Silva (1996), apresentou número diplóide variando de  $2n=45$  cromossomos (13M + 18SM + 11ST + 3A),  $2n=47$  (12M + 21SM + 10ST + 4A) e  $2n=46$  (12M + 20SM + 10ST + 4A). Dentro da amostra analisada, um dos indivíduos apresentou o mesmo número diplóide de um dos citótipos ( $2n=46$ ), porém divergiu em relação ao padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva. Conforme Daniel-Silva (1996), isso caracteriza uma variante do tipo A.

Exemplares de *Astyanax fasciatus* do rio Claro, município de Tamarana/PR, apresentaram número diplóide variando de  $2n=48$ , 49 e 50 cromossomos, enquanto em indivíduos do ribeirão Apertados, município de Londrina/PR, o número diplóide foi de  $2n=48$  cromossomos, com um indivíduo apresentando  $2n=72$  cromossomos. Tais dados evidenciam a primeira ocorrência de triploidia na espécie (Malacrida *et al.*, 2000). Além da variação numérica, os autores também observaram variação estrutural.

Na população do rio Araguari, município de Uberlândia/MG, foi observado um número diplóide  $2n=46$  cromossomos e fórmula cariotípica com a seguinte configuração (14M + 16SM + 10ST + 6A) (Torres-Mariano e Morelli, 2004). Essa população apresentou sistema de NOR-múltipla em 2 pares de cromossomos, um submetacêntrico e outro subtelocêntrico. Estes dados confirmam parcialmente o trabalho de Do-Vale (1999) com a população do riacho Maringá, município de Maringá/PR, cujos indivíduos possuem o mesmo sistema de NOR, mas diferem quanto à fórmula cariotípica apresentada (12M + 22SM + 6ST + 6A). Foi evidenciado um sistema de NOR-múltipla em diversas populações de *Astyanax fasciatus*. Daniel-Silva (1996) constatou a variação de 1 a 7 cromossomos nucleolares em diferentes tipos cromossômicos. O mesmo autor verificou um heteromorfismo de tamanho de NOR em um de seus exemplares.

Já em *A. fasciatus*, foram descritos 12 cromossomos portadores de NOR (Paganelli, 1990). O padrão de heterocromatina constitutiva (Banda-C), nesta espécie está representado por pequenos blocos heterocromáticos, localizados em posição pericentromérica, e grandes blocos, na posição telomérica, em alguns pares de cromossomos (Daniel-Silva, 1996), confirmando os resultados de Paganelli (1990).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Espécies analisadas

Foram analisadas três espécies do gênero *Astyanax*:

*Astyanax scabripinnis* (Figura 1): duas populações analisadas, uma do córrego Tagaçaba e outra do córrego Tauá.

*Astyanax altiparanae* (Figura 2): duas populações analisadas, uma proveniente do ribeirão Maringá e outra do reservatório Governador José Richa (Salto Caxias), no rio Iguaçu.

*Astyanax fasciatus* (Figura 3): espécimes coletados no ribeirão Maringá.

Os indivíduos foram identificados pela doutora Carla Simone Pavanelli e depositados na coleção do Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual de Maringá.

Uma população de *Astyanax scabripinnis* foi coletada no córrego Tagaçaba, município de Maringá, afluente do rio Ivaí, O ponto de coleta corresponde às seguintes coordenadas geográficas: 23°30'44.29"S e 52°01'42.69"W.

A segunda população de *Astyanax scabripinnis* foi coletada no córrego Taúá, município de Maringá, tributário do rio Pirapó. O ponto de coleta corresponde às seguintes coordenadas geográficas: 23°22'23.41"S e 51°50'47.70"W.

A população de *Astyanax fasciatus* foi coletada no ribeirão Maringá, município de Maringá, afluente do rio Pirapó, e o ponto de coleta corresponde às seguintes coordenadas geográficas: 23°19'16.52"S e 51°54'48.65"W.

Uma população de *Astyanax altiparanae* foi coletada no ribeirão Maringá, no mesmo ponto de coleta da população de *A. fasciatus*.

A segunda população de *Astyanax altiparanae* foi coletada no reservatório da Usina Hidroelétrica Governador José Richa (Salto Caxias), rio Iguaçu, município de Capitão Leônidas Marques, com coordenadas geográficas do ponto de coleta: 25°31'41.85" S e 53°29'28.85"W.



Figura 1- *Astyanax scabripinnis*.  
Foto: Castro, R.M.C.



Figura 2- *Astyanax altiparanae*  
Foto: Castro, R.M.C.

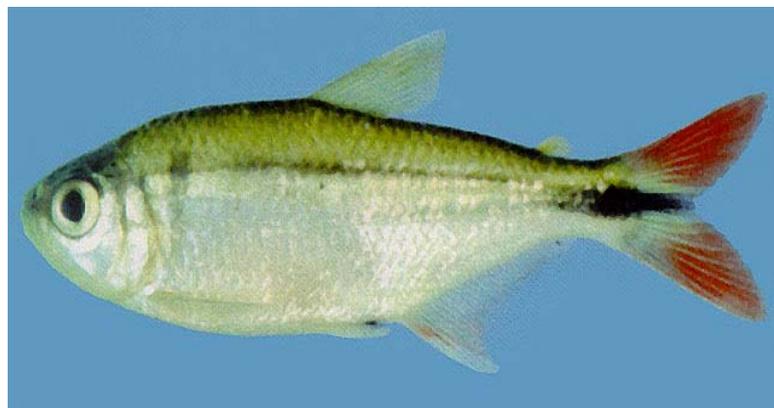


Figura 3- *Astyanax fasciatus*.  
Foto: Castro, R.M.C.

As coletas foram efetuadas com peneiras e redes de arrasto. Os animais foram transportados com aeração para o Laboratório de Citogenética de Peixes no Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, onde foram processados.

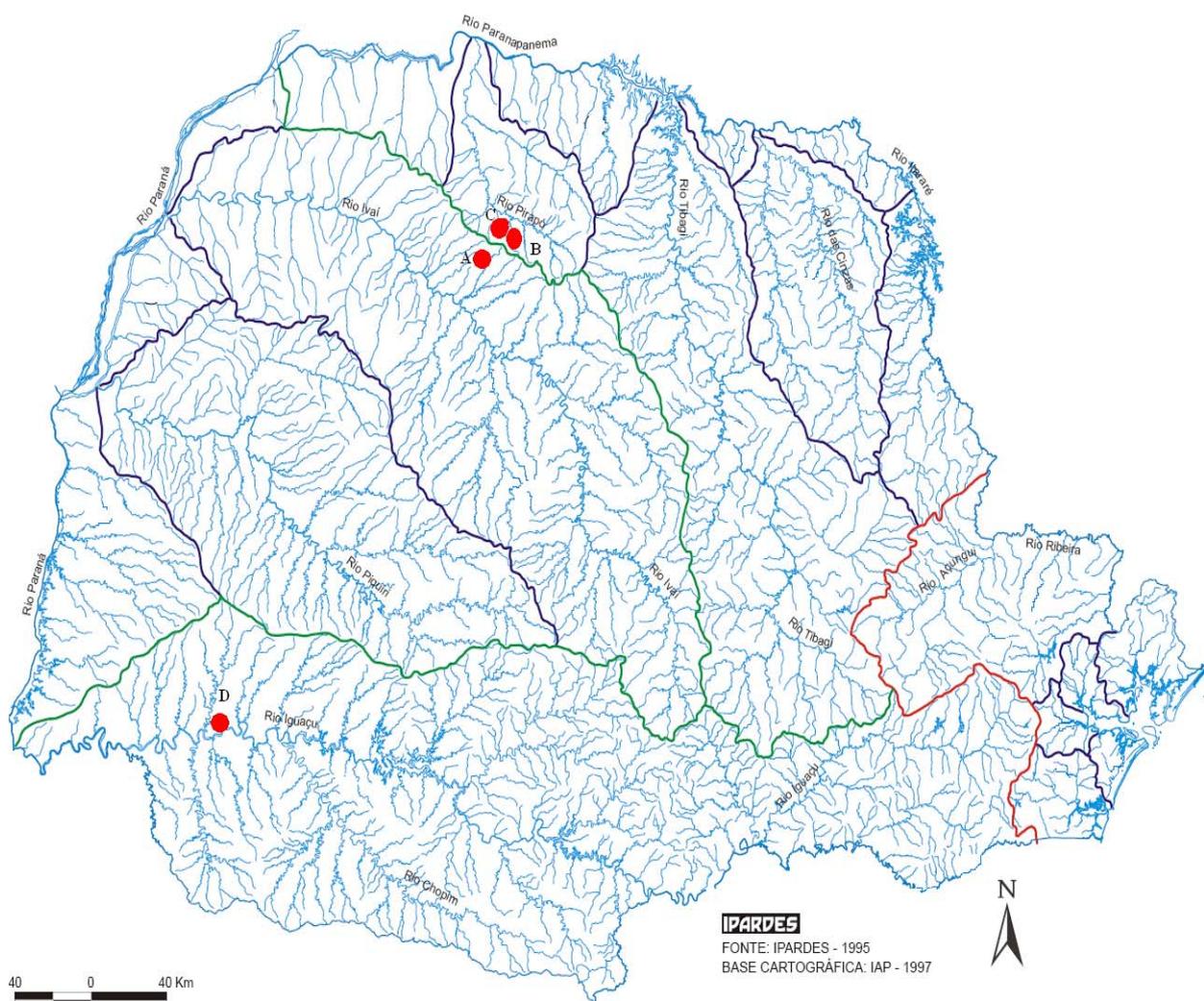


Figura 4 - Pontos de Coleta – Legenda: A: córrego Tagaçaba; B: córrego Tauá; C: ribeirão Maringá; D: rio Iguaçu (Salto Caxias).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Indução de mitoses

Foi utilizada a técnica descrita por Cavallini e Bertollo (1998) para aumentar o índice de células em divisão, que consiste na aplicação sub-cutânea da solução de

leveduras (0,5g de fermento biológico + 1,5g de dextrose + 6 ml de água destilada) na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal por um período de 24 a 48 horas antes do sacrifício. Esta técnica provoca infecção, produzindo um aumento da divisão mitótica como resposta à infecção.

### **3.2.2. Técnica direta de preparação de cromossomos mitóticos**

Os cromossomos mitóticos foram observados pela técnica direta descrita por Bertollo et al (1978), com pequenas modificações, que consiste em:

1. Injetar intraperitonealmente, solução aquosa de colchicina a 0,025% na proporção de 1 ml/100g de peso do animal.

2. Deixar o peixe em aquário bem areado, por um período de 30 minutos, sacrificando-o em seguida e retirando a porção do rim que se situa na região cefálica do animal.

3. Lavar o material retirado em solução hipotônica de KCl, a 0,075M, transferindo-o para pequena cuba de vidro, contendo 6 ml dessa solução.

4. Divulsionar o material com pinças de dissecação para separação de células, completando-se esse processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de movimentos de aspiração e expiração do material.

5. Colocar a solução obtida em estufa a 37° C por 20 minutos.

6. Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pauster, transferindo-o em seguida para o tubo de centrifuga, desprezando os blocos de tecidos não desfeitos. Acrescentar 6 gotas de fixador recém preparado (álcool metílico e ácido acético na proporção de 3:1) e suspender novamente o material sedimentado.

7. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm descartando-se o sobrenadante, com o auxílio da pipeta Pauster.

8. Adicionar, vagorosamente, 6 ml de fixador recém preparado (álcool metílico e ácido acético 3:1), deixando-o escorrer através das paredes do tubo.

9. Ressuspender o material, com o auxílio da pipeta Pauster, centrifugando-o por mais 10 minutos com a mesma rotação descrita no item 7.

10. Repetir os itens 8 e 9 por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 a 2 ml de fixador, dependendo da quantidade de sedimento, e ressuspender bem o material.

11. Pingar 2 a 3 gotas de suspensão, com pipeta Pauster, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa, previamente resfriada em água gelada.
12. Aquecê-la cuidadosamente sobre uma chama e deixar diretamente ao ar para completar a secagem.
13. Corar com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato, pH 6,8, por oito minutos, e lavar com água destilada ou água corrente. Secar ao ar.
14. Guardar o restante do material em tubos do tipo ependorff na geladeira.
15. Corar com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8 por 15 minutos.
16. Lavar em água corrente e secar ao ar.

### **3.2.3. Estudos cariotípicos**

As análises das metáfases foram realizadas em microscópio de luz. Após a contagem dos cromossomos, foi estabelecido o número modal para machos e fêmeas das espécies estudadas.

As metáfases que apresentaram melhor dispersão e morfologia dos cromossomos foram fotografadas com objetivas de imersão em microscópio Axioskop Zeiss, utilizando-se filme Kodak Imagelink, preto e branco, regulado para ISO 25 e revelado em D-76 da Kodak. As cópias dos negativos foram feitas em papel fotográfico profissional KODABROMIDE-F3.

### **3.2.4. Identificação dos cromossomos**

A identificação e classificação foram feitas mediante medidas cromossômicas, com auxílio de paquímetro, determinando o comprimento do braço maior, do braço menor e o comprimento total de cada cromossomo, calculando os valores médios para cada par. As medidas cromossômicas foram realizadas apenas nas metáfases escolhidas para montagem final dos cariótipos. Os cromossomos foram identificados de acordo com os critérios de relação de braços (RB), proposto por Levan *et al.*, (1964), e classificados como metacêntricos (RB=1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB=1,71 a 3,00), subtelocêntricos (RB=3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB= maior que 7,01).

### 3.2.5. Montagem dos cariótipos

As melhores fotografias foram recortadas, os cromossomos colocados em pares na ordem decrescente de tamanho e conforme suas características morfológicas, em quatro grupos: Metacêntricos (m), Submetacêntricos (sm), Subtelocêntricos (st) e Acrocêntricos (a).

### 3.2.6. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

#### a) Nitrato de prata (AgNOR)

Foi adotada a técnica de impregnação pela prata descrita por Howell e Black (1980) para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos

1. Sobre uma lâmina previamente tratada para obtenção de cromossomos mitóticos, pingar uma gota de solução de gelatina em cada extremidade da lâmina.
2. Em cada gota de gelatina, acrescentar uma gota de água destilada.
3. Acrescentar em cada extremidade duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata.
4. Cobrir com lamínula.
5. Levar a estufa ou banho-maria a 60° C até adquirir coloração caramelada.
6. Se necessário, monitorar a coloração ao microscópio. Quando os nucléolos adquirirem uma coloração preta ou marrom e os cromossomos e núcleo um tom amarelado, lavar bem em água corrente, permitindo que a lamínula seja retirada.
7. Corar com solução de Giemsa 1% por 30 segundos.
8. Lavar em água corrente e secar ao ar.

#### b) Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada conforme Pinkel et al. (1986) com algumas modificações.

#### 1ª etapa: Tratamento das lâminas e hibridação *in situ*

1. Colocar 50µl de RNase (1:100) em cada lâmina, cobrir com lamínula plástica e levar para a estufa 37°C por 1 hora.
2. Lavar as lâminas em 2xSSC por 10 minutos em temperatura ambiente no agitador (depois de 1-2 minutos retirar as lamínulas que estarão boiando).

3. Descartar 2 2xSSC na pia e, na mesma cubeta, colocar paraformoldeído 4% em temperatura ambiente, por 10 minutos no agitador.

4. Descartar o paraformoldeído em recipiente apropriado e colocar novamente 2xSSC, por 10 minutos, no agitador.

5. Descartar o 2xSSC e colocar álcool etílico 70% por 5 minutos, no agitador.

6. Descartar o álcool 70% e colocar álcool etílico 100% por 5 minutos. Não precisa agitar.

7. Descartar o álcool 100% e deixar as lâminas secarem de 1 a 3 horas.

8. Neste intervalo, preparar a mistura de hibridação por lâmina:

Formamida 100%	15µl
Dextran 50%	0,6µl
20xSSC	0,3µl
DNA de bloqueio	0,1µl
SDS 10%	0,1µl
Sonda marcada	até 0,5µl
Água	Até completar 30-31µl

9. Desnaturar a mistura de hibridação (HIS) a 70°C por 10 minutos em banho-maria.

10. Incubar em gelo ao menos 5 minutos e no máximo por 2 horas.

11. Colocar 30µl da mistura de HIS por lâmina e cobrir com lamínulas de plásticas. Levar ao termociclador com programa de: 90°C por 10 minutos, 48°C por 10 minutos, 38°C por 5 minutos e 37°C até infinito.

12. Colocar as lâminas em câmara úmida a 37°C por 12 horas (Over night).

13. Colocar as soluções de 2xSSC, 0,1xSSC e 4xSSC 0,2 tveen no banho-maria a 42°C durante a noite.

## **2ª etapa: banhos pós-hibridação (sonda DNAr 18S)**

1. Tirar as lâminas da estufa, deixando a câmara úmida, e fazer os banhos pós-hibridação.

2. Lavar em 2xSSC a 42°C por 5 minutos no agitador e, assim que as lamínulas boiarem, retirá-las da cubeta.

3. Descartar 2xSSC na pia e na mesma cubeta colocar 0,1xSSC a 42° por 5 minutos, no agitador.

4. Descartar o 0,1xSSC na pia e na mesma cubeta colocar 2xSSC a 42°C por 5 minutos no agitador.

5. Descartar o 2xSSC na pia e colocar o 4xSSC 0,2% tween a 42°C por 5 minutos no agitador.

6. Descartar o 4xSSC 0,2% tween na pia e colocar o 4xSSC 0,2% tween por 5 minutos no agitador, em temperatura ambiente.

### **3ª etapa: detecção da hibridação**

1. Retirar a lâmina, e bater cuidadosamente no papel filtro, e com elas ainda molhadas pingar 50µl de BSA 5% por 5 minutos, e cobrir com lamínulas de plástico.

2. Retirar a lamínula plástica com auxílio de uma pinça.

3. Colocar a solução de detecção AVIDINA e cobrir com lamínula plástica e incubar a 37°C por 1 hora em câmara úmida.

4. Lavar as lâminas em 4xSSC 0,2% tween por 10 minutos à temperatura ambiente no agitador, no escuro. Retirar as lamínulas após alguns minutos.

5. Descartar a solução e repetir a mesma lavagem por mais uma vez.

### **4ª etapa: coloração**

1. Retirar as lâminas do 4xSSC 0,2% tween, bater cuidadosamente no papel de filtro, enxugar em baixo e colocar 25µl de solução de iodeto de propídio e cobrir com lamínula de vidro. Retirar o excesso com papel de filtro.

2. As análises serão feitas em microscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (Zona de excitação do azul).

### **3.2.7. Detecção de heterocromatina constitutiva (Banda-C)**

Para observação da distribuição da heterocromatina constitutiva, a técnica utilizada foi a de Sumner (1972), com algumas modificações:

1. Tratar a lâmina com HCl 0,2 N a temperatura ambiente por 15 minutos.

2. Lavar em água destilada e secar ao ar.

3. Incubar por 1 minuto e 30 segundos em solução filtrada recém preparada de Hidróxido de Bário 5%, a 42° C.

4. Lavar rapidamente em HCl 0,2 N em temperatura ambiente.
5. Lavar em água destilada e secar ao ar.
6. Incubar em uma solução de 2XSSC, a 60° C, por um período de 30 minutos.
7. Lavar em água destilada e secar ao ar.
8. Corar com Giemsa, diluído em 5% em tampão fosfato, pH 6,8, por 5 minutos.
9. Lavar em água destilada e secar ao ar.

### **3.2.8. Processamento das imagens**

Os cromossomos metafásicos foram analisados e fotografados em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 2 Plus. As imagens foram capturadas através de uma câmara digital acoplada ao microscópio pelo software Axiovision.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Astyanax scabripinnis*

Foram estudadas citogeneticamente duas populações dessa espécie isoladas geograficamente. Uma do córrego Tagaçaba (bacia do rio Ivaí) e outra do córrego Tauá (bacia do rio Pirapó). As duas populações apresentaram o mesmo número diplóide,  $2n=50$  cromossomos, mas divergiram quanto à fórmula cariotípica, ao número fundamental, às regiões organizadoras de nucléolos e ao padrão de banda C.

Na população do córrego Tagaçaba, foram analisados 16 indivíduos: 12 fêmeas e 4 machos. O número diplóide ( $2n$ ) padrão foi de 50 cromossomos distribuídos em 10 metacêntricos (M), 22 submetacêntricos (SM), 6 subtelocêntricos (ST) e 12 acrocêntricos (A), com número fundamental (NF) igual a 88. (Figura 5a). Na população do córrego Tauá, foram analisados 10 indivíduos (8 machos e 2 fêmeas), sendo o número diplóide  $2n=50$  cromossomos distribuídos em 10M + 18SM + 8ST + 14A, com número fundamental igual a 86 (Figura 5b).

O Quadro 1 mostra os resultados das análises cariotípicas obtidos em 47 populações de *A. scabripinnis*. Deles, 74,5% (35 populações) apresentaram o número diplóide de  $2n=50$  cromossomos com diferentes fórmulas cariotípicas, enquanto, em 17% (8 populações), o número diplóide foi de  $2n=48$  cromossomos e apenas 4,25% (2 populações) com  $2n=46$  cromossomos. Das mesmas, pelo menos as populações com número diplóide diferentes devem consistir em unidades taxonômicas distintas de *A. scabripinnis* (*Astyanax* cf. *scabripinnis*). A existência de 3 citótipos simpátricos e sintópicos com diferentes números diplóides ( $2n=46$ ,  $2n=48$  e  $2n=50$  cromossomos), observada numa mesma população do riacho Tatupeba e com ausência de híbridos intermediários, corroboram a existência de pelo menos 3 unidades taxonômicas diferentes, identificadas como pertencentes ao “complexo *scabripinnis*” (Fernandes e Martins-Santos, 2005). Foram ainda observados indivíduos triplóides com  $3n=75$  cromossomos na população do rio Araquá e no córrego das Pedras (Maistro et al., 1994).

Dentro destas unidades - com diferentes números diplóides - pode-se observar ainda diferenças de número fundamental e de número de cromossomos organizadores nucleolares. Embora muitas diferenças possam ser devidas aos

critérios de medidas adotados por cada pesquisador, é possível estabelecer diferenças efetivas pela análise dos cromossomos do tipo acrocêntricos ou pelo NF. Por exemplo, devem constituir diferenças efetivas entre as populações com  $2n=50$  cromossomos do rio Jucu e rio Piracuama (36 e 30 cromossomos acrocêntrico e  $NF=64$  e  $NF=70$ , respectivamente), em relação às do Viveiro das Mudas, riacho Bicudos e Barreiro Grande, que apresentam entre 6 a 8 cromossomos acrocêntricos e NF entre 92 e 94.

As duas populações analisadas, no presente trabalho, apresentaram número diplóide correspondente à maioria dos indivíduos analisados para o “complexo *scabripinnis*” e, como as demais, apresentaram fórmulas cariotípicas diferentes entre si e entre as demais populações analisadas (Quadro 1). Contudo, para a população do Tagaçaba, 50% das fêmeas (6 fêmeas) apresentaram um macrocromossomo do tipo metacêntrico em 100% das metáfases analisadas, similar ao maior par de cromossomos do complemento A. Este cromossomo apresentou-se totalmente heterocromático e restrito às fêmeas (Figura 6d), como detectado para outras populações de *A. scabripinnis* com  $2n=50$  cromossomos (Maistro et al., 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Fernandes e Martins-Santos, 2005).

Por outro lado, outros tipos de cromossomos B são detectados em populações com  $2n=50$  cromossomos, submetacêntricos grandes (Néo et al., 2000a; Marco-Ferro, 2003), metacêntricos de tamanho pequeno (Néo et al., 2000; Marco-Ferro, 2003) e microcromossomos (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997), assim como macrocromossomos B parcialmente heterocromático (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Fernandes e Martins-Santos, 2005). Os microcromossomos do tipo acrocêntrico, observados nas populações do rio Jucu, foram restritos a machos, enquanto, naquelas do rio Água do Rancho, foram restritos às fêmeas.

Entre as populações com  $2n=48$  cromossomos, a grande maioria dos cromossomos extras tem sido do tipo microcromossomos B. Apenas para a população do Tatupeba foram observados macrocromossomos B metacêntrico, cromossomos B acrocêntrico e subtlocêntrico (Fernandes e Martins-Santos, 2005). Dessa forma, pode-se sugerir que macrocromossomos B similares em tamanho ao primeiro par do complemento são mais característicos nas populações de  $2n=50$  cromossomos, assim como os microcromossomos B são para as populações com  $2n=48$  cromossomos.

Conforme Miller et al. (1976), a análise da região organizadora do nucléolo pela utilização da técnica de nitrato de prata (AgNOR) permite somente detectar aquelas regiões de rDNA ativos na interfase anterior. Por meio desta técnica, nota-se tanto a ocorrência de NORs em um único par de cromossomos (NOR simples), quanto naquelas distribuídas em vários pares (NORs múltiplas). Entre os caracídeos, estas últimas têm sido as mais freqüentes.

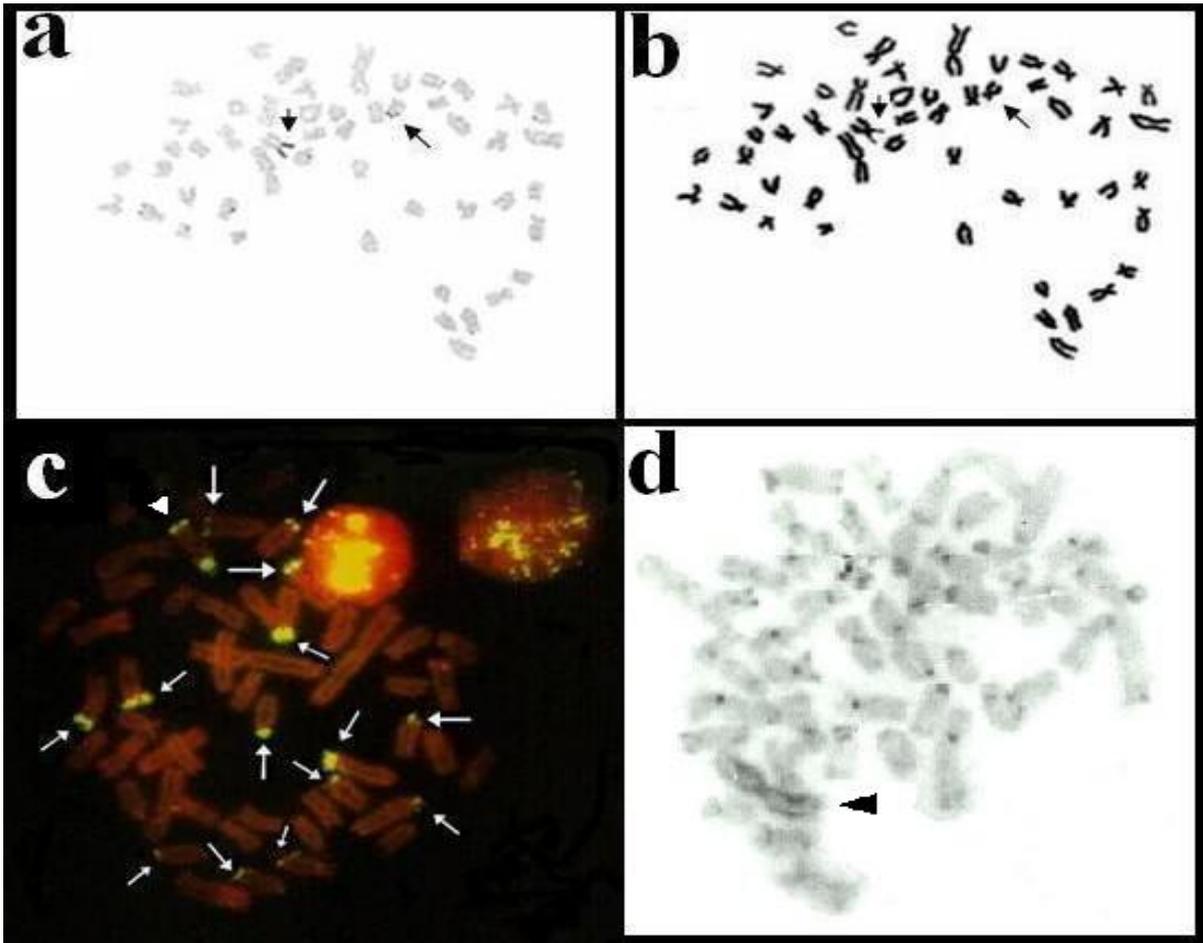


Figura 5 - Cariótipos convencionais de Giemsa de *Astyanax scabripinnis*, (a) população córrego Tagaçaba, (b) população do córrego Tauá.

No presente trabalho, o estudo desta região pela técnica AgNOR mostrou que, enquanto a população do córrego Tagaçaba apresentou marcação no braço curto do par 11 de cromossomo do tipo submetacêntrico, a população do córrego Tauá apresentou um sistema de NOR-múltipla, com marcações em dois pares de cromossomos, um par submetacêntrico no braço curto e outro par acrocêntrico na porção terminal, na maioria das metáfases analisadas (Figura 7a e 7b). Embora esse método tenha sido muito utilizado, ele revela apenas genes ativos, por sua vez,

o método de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) detecta genes rDNA independente de sua atividade. Dessa maneira, a utilização da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S, para a população do Tagaçaba, revelou sinais brilhantes espalhados nas regiões teloméricas em 14 cromossomos. Além disso, apresentou 1 cromossomo com marcação do tipo bitelomérica, dado similar ao de outras populações de *A. scabripinnis* com  $2n=50$  cromossomos (Malacrida et al., 2003; Mantovani et al., 2005; Fernandes e Martins-Santos, 2006) (Figura 6c). A análise AgNOR demonstrou um sistema de NOR-simples para a população do Tagaçaba, indicando que apenas um par de cromossomos portadores da NOR está expresso nessa população, enquanto o método de FISH determinou, de modo mais efetivo, o número e a localização dos genes rDNA, evidenciando a presença de 15 cromossomos portadores desta região. Além disso, para a maioria das metáfases analisadas nesta população, foi observado um heteromorfismo de tamanho da região organizadora de nucléolo (Figura 6a e 6b).

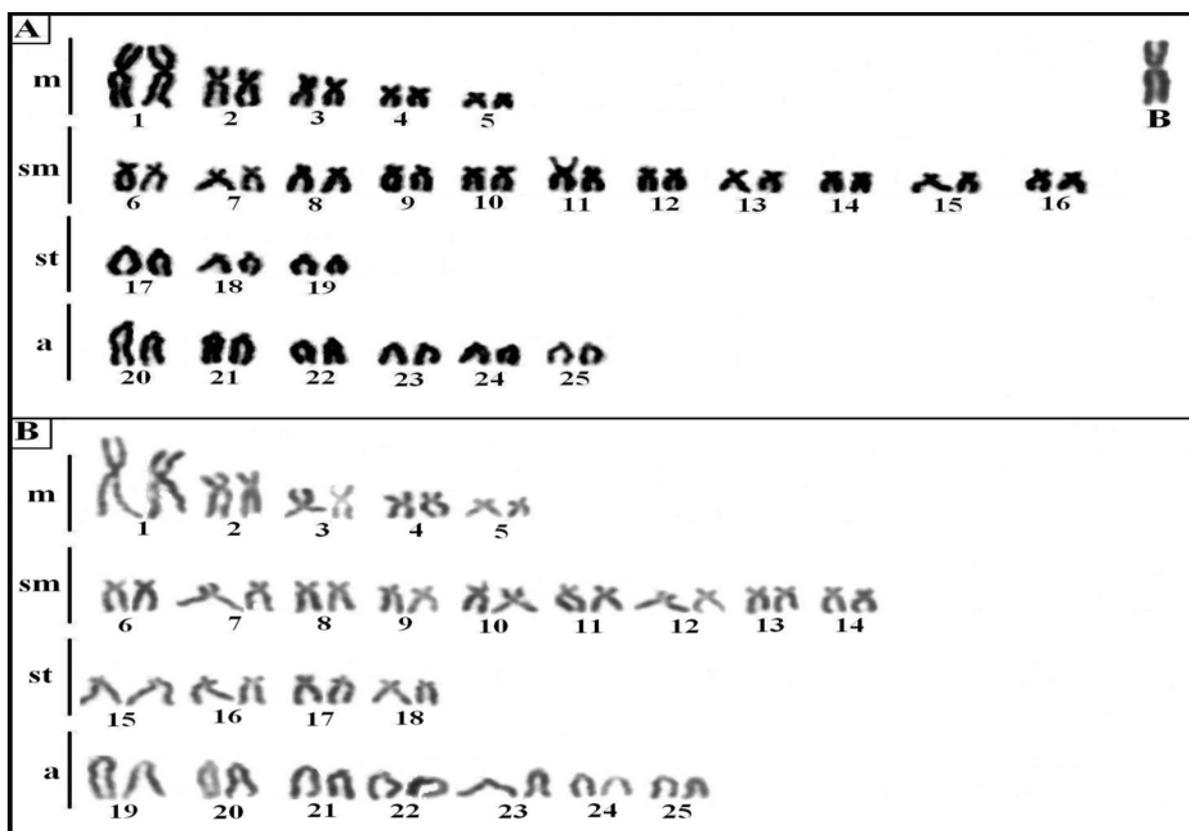


Figura 6 - (a) Localização das NORs por Ag-NOR, (b) Metáfase somática seqüencial corada com Giemsa, (c) FISH com sonda 18S, (d) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva da população do córrego Tagaçaba. Setas indicam NORs. Cabeça de seta branca indica marcação bitelomérica. Cabeça de seta preta indica cromossomo B heterocromático.

O padrão de heterocromatina constitutiva, evidenciado por meio da técnica de banda-C, mostrou diferenças entre as duas populações com marcações pericentroméricas em quase todos os cromossomos da população do córrego Tagaçaba (figura 6d). Para a população do córrego Tauá, foram evidenciados grandes blocos teloméricos, em pelo menos 6 pares de acrocêntricos e blocos centroméricos menores na maioria dos cromossomos (Figura 7c). O padrão desta última população tem sido o mais observado entre os “*scabripinnis*”. Entretanto, a distribuição da banda C tem variado de população para população. Em virtude disso, Souza et al. (1996) e Mantovani et. al. (2000) propõem o modelo de Schweizer e Loidl (1987) para explicar a dispersão da heterocromatina constitutiva nas regiões teloméricas. Segundo os autores, cromossomos de braços similares tendem a permanecerem juntos durante a interfase, facilitando a transferência destas regiões para cromossomos não homólogos.

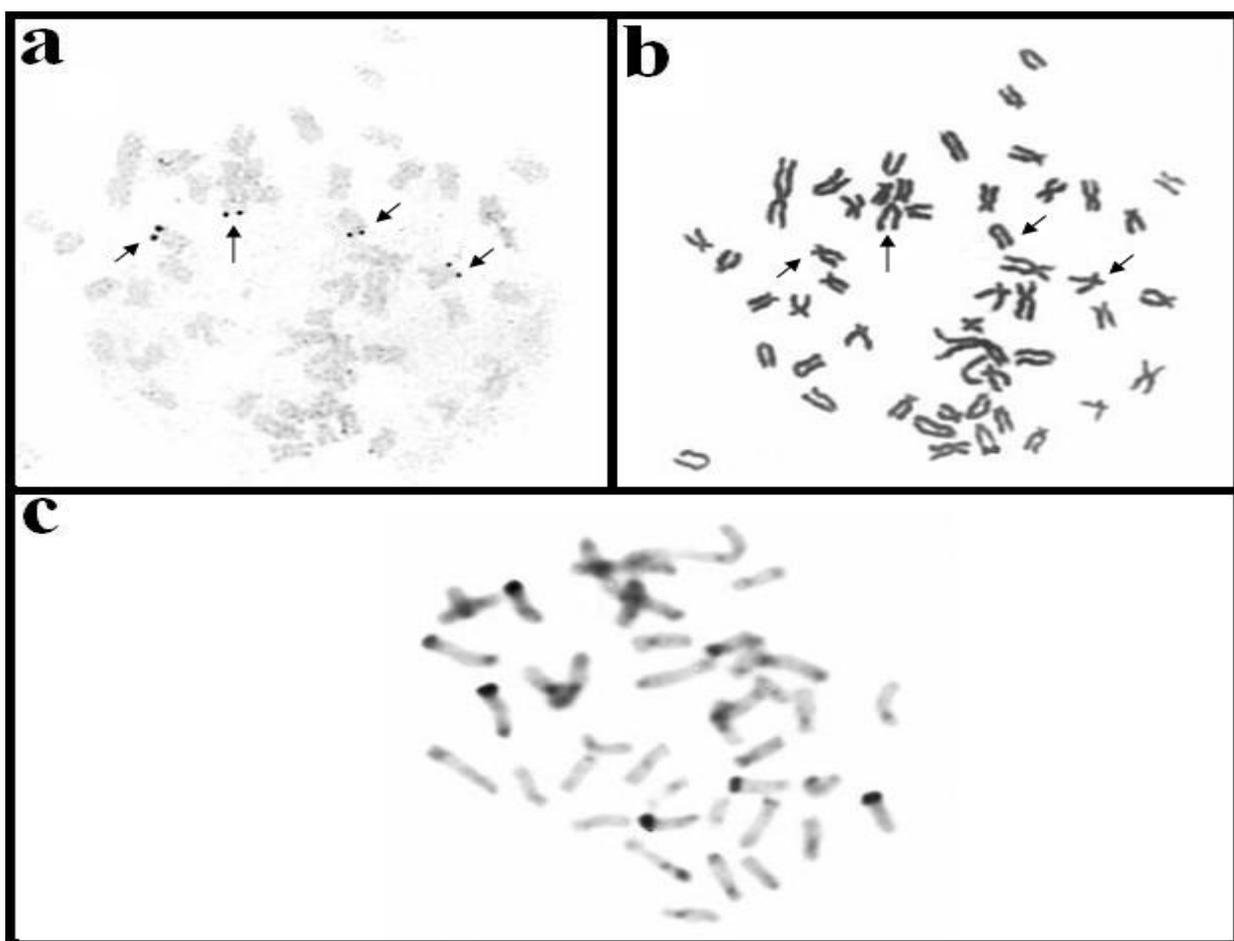


Figura 7 - (a) Localização das NORs por Ag-NOR, (b) Metáfase somática seqüencial corada com Giemsa, (c) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva da população do córrego Tauá.

Quadro 1- Dados citogenéticos de *Astyanax scabripinnis*

Espécie	Localidade	Bacia	2n	NF	M	SM	ST	A	Bs	NORs	Ref.
<i>A. scabripinnis</i>	Córrego Tatupeba	G	46	82	8	22	6	10	2	2	40
	Curral das Éguas	B	46	82	6	22	8	10	0	3	25
	Córrego Tatupeba	G	48	88	8	26	6	8	3	4	40
	Riacho São Domingos	G	48	86	10	20	8	10	0	3	34
	Riacho Tamboara	G	48	84	10	24	6	8	0	7	34
	Córrego Canta Galo	G	48	82	6	22	6	14	0	#	29
	Córrego Canta Galo	A	48	84	6	22	8	12	0	1 a 3	29
	Riacho Tamanduá	A	48	86	6	28	4	10	0	1 a 2	24
	Riacho Marrecas	A	48	86	6	20	12	10	0	1 a 5	7, 8
	Rio Ligeiro	A	48	82	10	22	2	14	0	1 a 4	5, 6
	Córrego Tatupeba	G	50	84	6	22	6	16	1	7	40
	Riacho Sarandi	H	50	86	6	26	4	14	0	1 a 5	5, 6
	Rio Yucatan	A	50	90	6	30	4	10	0 a 1	1 a 3	4, 5, 6
	Córrego Centenário	A	50	84	6	20	8	16	0	1 a 4	7, 8
	Riacho São Pedro	A	50	88	6	24	8	12	0	1 a 6	9, 10
	Córrego Hortelã	A	50	86	8	18	10	14	0	4 a 7	2
	Córrego Cascatinha	A	50	90	8	22	10	10	0 a 1	1 a 4	10, 15, 16
	Cór. Viveiro das Mudas	B	50	94	6	30	8	6	0	1 a 7	7
	Rio Jucu	C	50	64	6	8	0	36	0 a 4	1 a 15	23
	Ribeirão Grande	F	50	88	6	22	10	12	0	2 a 9	20, 21, 22
	Riacho das Pedras	A	50	88	6	28	4	12	0	1 a 4	9, 1
	Campos do Jordão	F	50	82	8	14	10	18	0	4	41
	Rio Pequeno	F	50	86	6	20	10	14	0	2	7
	Riacho Tamanduá	A	50	86	6	26	4	14	0	1 a 4	24
	Riacho Grande	A	50	90	6	26	8	10	0	4 a 8	9, 10
	Rio Pardo	A	50	88	6	26	6	12	0	1 a 3	9, 10
	Rio Claro	A	50	90	6	28	6	10	0	1 a 4	9, 10
	Rio Claro	A	50	88	6	24	8	12	0	1 a 3	7, 25
	Rio Capivara	A	50	90	8	22	10	10	0	1 a 5	10, 26
	Rio Lavapés	A	50	90	6	26	8	10	0	1 a 4	9, 10
	Rio Araquá	A	50	88	4	30	4	12	0 a 1	1 a 3	10, 26, 27
	Riacho Bicudos	A	50	92	8	20	14	8	0	#	28
	Córrego Canta Galo	A	50	84	4	26	4	16	0	1 a 6	29
	Riacho Monjolinho	A	50	88	6	24	8	12	0	2 a 8	7, 25
	Riacho Perdizes	A	50	88	6	22	10	12	0 a 2	2	30
	Córrego das Pedras	A	50	88	6	22	10	12	0 a 2	2	30, 31
	Riacho Casquilho	A	50	88	6	22	10	12	0 a 1	2	30
	Riacho Capivari	A	50	88	6	22	10	12	0 a 1	1 a 4	32
	Riacho Fojo	A	50	88	6	22	10	12	0 a 2	1 a 6	32

Quadro 1 Cont...

Lagoa das Carpas	A	50	88	6	22	10	12	0	a 1	2 a 7	32
Rio Piracuama	F	50	70	4	10	6	30	0	5 a 11		33
Rio Piracuama	F	50	86	6	24	6	14	0	a 1	1 a 3	33
Córrego Barreiro Grande	B	50	94	6	30	8	6	0	1 a 4		9, 10
Córrego das Pedras	A	75	132	9	33	15	18	2	2 a 3		26
Rio Araquá	A	75	132	6	45	6	18	1	1 a 3		26
Córrego Tagaçaba	G	50	88	10	22	6	12	0	a 1	2	1
Córrego Tauá	H	50	86	10	18	8	14	0		4	1

A: bacia do Paraná; B: bacia do São Francisco; C: bacia do Jucu; D: bacia do Tibagi; F: bacia do Paraíba do Sul; G: bacia do Ivaí; H: bacia do Pirapó; NF: número fundamental; M: metacêntrico; SM: submetacêntrico; ST: subtlocêntrico; A: acrocêntrico; Bs: Presença de cromossomos extranumerários; NORs: região organizadora de nucléolos; 1: Presente trabalho; 2: Daniel-Silva (1996); 4: Mizoguchi e Martins-Santos (1997); 5: Mizoguchi e Martins-Santos (1998a); 6: Mizoguchi e Martins-Santos (1998b); 7: Moreira-Filho e Bertollo (1991); 8: Mantovani et al., (2000); 9: Maistro (1991); 10: Maistro et al., (1998); 15: Maistro et al., (1994b); 16: Porto-Foresti et al., (1997); 20: Ferro et al., (2001); 21: Néo et al., (2000a); 22: Néo et al., (2000b); 23: Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993); 24: Maistro et al., (2000); 25: Moreira-Filho (1989); 26: Maistro (1994a); 27: Maistro (1992); 28: Morelli et al., (1983); 29: Souza et al., (1996); 30: Vicente et al., (1996); 31: Salvador e Moreira-Filho (1992); 32: Ferro et al., (2001); 33: Souza et al., (1995); 34: Alves e Martins-Santos (2002); 40: Fernandes e Martins-Santos (2005).

#### 4.2. *Astyanax altiparanae*

Foram estudadas, citogeneticamente, duas populações dessa espécie: uma do ribeirão Maringá (bacia do Pirapó) e a outra do reservatório da Usina Governador José Richa (Salto Caxias) no rio Iguaçu. Pelas localizações dos pontos de coleta, essas populações são consideradas isoladas geograficamente. As duas populações apresentaram o mesmo número diplóide,  $2n=50$  cromossomos, mas divergiram quanto à estrutura do cariótipo, ao número fundamental e às regiões organizadoras de nucléolos.

Na população do rio Iguaçu, foram analisados 10 indivíduos: 4 machos e 6 fêmeas. Essa população apresentou número diplóide  $2n=50$  cromossomos, distribuídos em  $10M + 26SM + 6ST + 8A$ , com número fundamental igual a 92 (Figura 8a). Na população de *Astyanax altiparanae* do ribeirão Maringá, foram analisados 13 exemplares: 5 machos e 8 fêmeas. O número diplóide apresentado foi de  $2n=50$  cromossomos, distribuídos em  $10M + 22SM + 6ST + 12A$ , com número fundamental igual a 88 (Figura 8b).

O Quadro 2 mostra os resultados da análise cariotípica obtida em cerca de 19 populações de *A. altiparanae*. Das mesmas, 100% apresentaram o número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, mas com diferentes fórmulas cariotípicas, evidenciando, assim, um conservadorismo em relação ao número diplóide. O NF das populações analisadas variou de 86, para a população do Tibagi, a 100, para três populações do ribeirão Três Bocas. Para estas últimas populações, a fórmula cariotípica divergiu das demais analisadas pela ausência de cromossomos acrocêntricos e submetacêntricos (Quadro 2). Embora algumas diferenças possam estar relacionadas com as metodologias de medidas distintas utilizadas por pesquisadores, a divergência observada para as populações do ribeirão Três Bocas, fazenda Canguiri, rio Doce e Três Marias (0 e 6 cromossomos acrocêntricos, com NF= 100 e 94, respectivamente), em relação à população do rio Tibagi com 14 cromossomos acrocêntricos e NF= 86, deve constituir diferenças efetivas.

Quadro 2 - Dados citogenéticos de *Astyanax altiparanae*

Espécie	Localidade	Bacia	2n	NF	M	SM	ST	A	Bs	NORs	Ref.
<i>A. altiparanae</i>	Mogi Guaçu	K	50	88	10	24	4	12	#	#	35
	Mogi Guaçu	K	50	92	6	24	12	8	#	#	36
	Lagoa Tarumã	D	50	92	6	28	8	8	0	4	13
	Córrego Monjolinho	A	50	90	8	20	12	10	0	2	11
	Três Bocas	L	50	100	40	0	10	0	#	#	37
	Três Bocas	L	50	100	28	0	22	0	#	#	37
	Três Bocas	L	50	100	34	0	16	0	#	#	37
	Paranapanema	L	50	88	10	22	6	12	#	#	38
	Fazenda do Canguiri	E	50	94	6	30	8	6	0	2	13
	Rio Tibagi	D	50	90	10	22	8	10	0	2 a 5	14
	Rio Couro de Boi	D	50	88	8	20	10	12	0	1 a 4	14
	Rio Claro	D	50	90	10	26	4	10	0	1 a 4	14
	Rio Tibagi	D	50	86	6	22	8	14	0	2 a 5	14
	Rio dos Índios	G	50	90	6	30	4	10	0	10	17
	Rio Paraná	A	50	88	6	26	6	12	0	2	17
	Três Marias	B	50	94	6	26	12	6	#	2	36
	Rio Doce	O	50	94	6	28	10	6	#	2	36
	Ribeirão Maringá	H	50	88	10	22	6	12	0	2 a 3	1
	Rio Iguaçu	E	50	92	10	26	6	8	0	2 a 5	1

A bacia do rio Iguaçu apresenta uma ictiofauna com elevado número de espécies endêmicas (Garavello et al. 1997). Diante disso, Prioli et al. (2002) analisaram, através de DNA mitocondrial e marcadores de RAPD, populações de *A. altiparanae* da bacia do alto rio Paraná e bacia do rio Iguaçu, ambas separadas

geograficamente pelas cataratas do Iguaçu. Os autores não observaram diferenças entre as populações, indicando que *A. altiparanae* do rio Iguaçu não é endêmica e provavelmente foi introduzida recentemente nesta bacia. Da mesma forma, os dados citogenéticos, apresentados nesse trabalho não permitem caracterizar a população do rio Iguaçu como espécie distinta de *A. altiparanae*. Ainda que variações de fórmula cariotípica estejam presentes, essas diferenças devem ter ocorrido devido aos mecanismos de rearranjos do tipo não-Robertsoniano, em especial, as inversões pericentroméricas, que foram fixadas pelo isolamento geográfico.



Figura 8 - Cariótipos convencionais com Giemsa de *Astyanax altiparanae*, (A) população do rio Iguaçu, (B) população do ribeirão Maringá.

A análise da região organizadora do nucléolo mostrou um sistema de NOR-múltipla para as duas populações. Na população do rio Iguaçu, 5 cromossomos apresentaram marcações distribuídas nos braços curtos de cromossomos do tipo submetacêntrico (Figura 9a e 9b); na população do ribeirão Maringá, estiveram

presentes no braço curto de um par de cromossomos do tipo submetacêntricos e no braço longo de um cromossomo do tipo submetacêntrico (Figura 9c). O sistema de NOR-múltipla frequentemente é observado dentro do gênero *Astyanax*, incluindo *A. altiparanae* (Daniel-Silva, 1996; Pacheco, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2004), *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Rocon-Stage e Almeida-Toledo, 1993; Alves e Martins-Santos, 2002; Fernandes e Martins-Santos, 2003; Fernandes e Martins-Santos, 2005) e *A. fasciatus* (Paganelli, 1990; Justi et al., 1990; Daniel-Silva, 1996), indicando ser uma característica comum ao grupo. Além do mais, na população do rio Iguaçu, numa célula foi verificada marcação num único par, localizada no braço longo de um cromossomo do tipo submetacêntrico (Figura 9b), provavelmente o mesmo par e localização observada para a população do ribeirão Maringá.

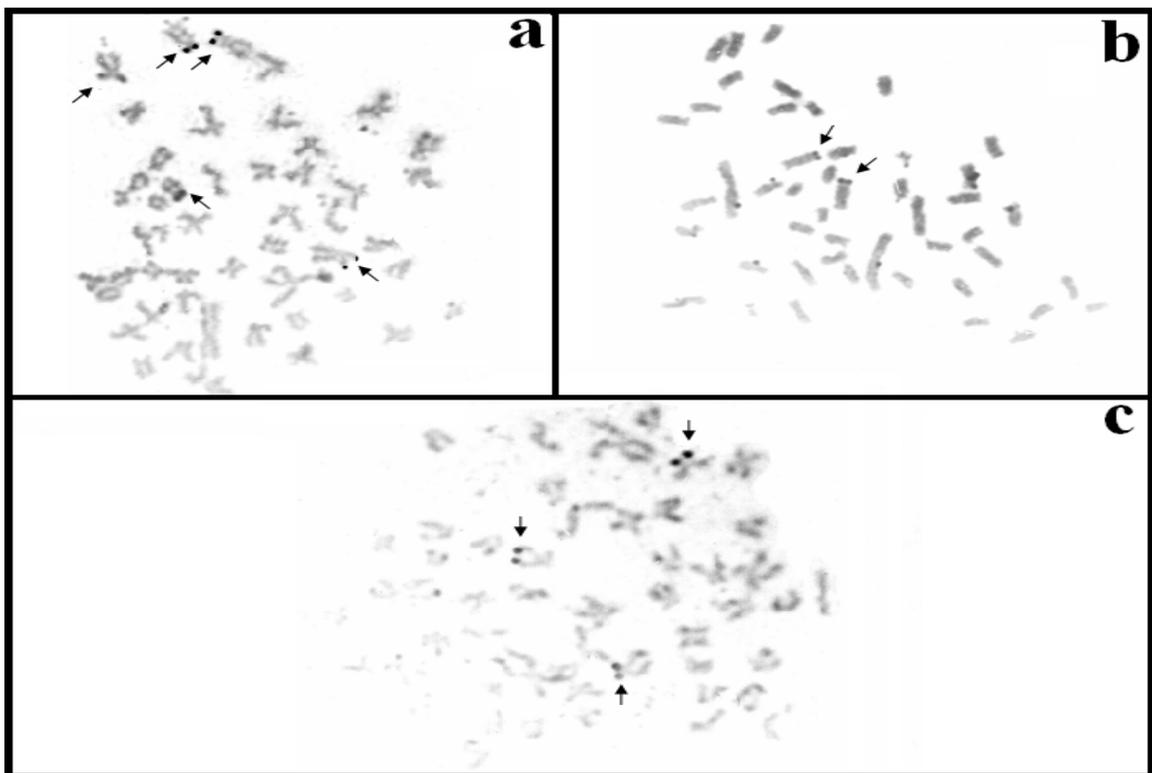


Figura 9 - Localização das NORs por Ag-NOR. (a, b) população do rio Iguaçu, (c) população do ribeirão Maringá. As setas indicam a localização das NORs. A: bacia do Paraná; B: bacia do São Francisco; D: bacia do Tibagi; E: bacia do Iguaçu; Sul; G: bacia do Ivaí; H: bacia do Pirapó; K: bacia do Mogi Guaçu; L: bacia do Paranapanema; NF: número fundamental; M: metacêntrico; SM: submetacêntrico; ST: subtlocêntrico; A: acrocêntrico; Bs: presença de cromossomos extranumerários; NORs: região organizadora de nucléolos; 1: presente trabalho; 11: Moreira-Peres (2005); 13: Domingues (2005); 14: Berton-Pacheco (2001); 17: Fernandes e Martins-Santos (2004); 35: Morelli et al., (1983); 36: Paganelli (1990); 37: Takahashi et. al., (1995); 38: Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2001).

O padrão de heterocromatina das duas populações foi muito similar, com marcações na maioria dos cromossomos, distribuídas em regiões pericentroméricas, teloméricas, além de blocos intersticiais proximais ao centrômero nos pares 8, 13, 14, 15 e 16 para a população do rio Iguaçu e pares 8, 9, 12, 13, e 14 de cromossomos submetacêntricos para a população do ribeirão Maringá, devendo corresponder a cromossomos homólogos, em especial os pares 13 e 12, respectivamente, para as duas populações, os quais apresentaram, além do bloco de heterocromatina proximal, uma marcação em quase toda extensão do braço curto destes cromossomos (Figura 10a, b).

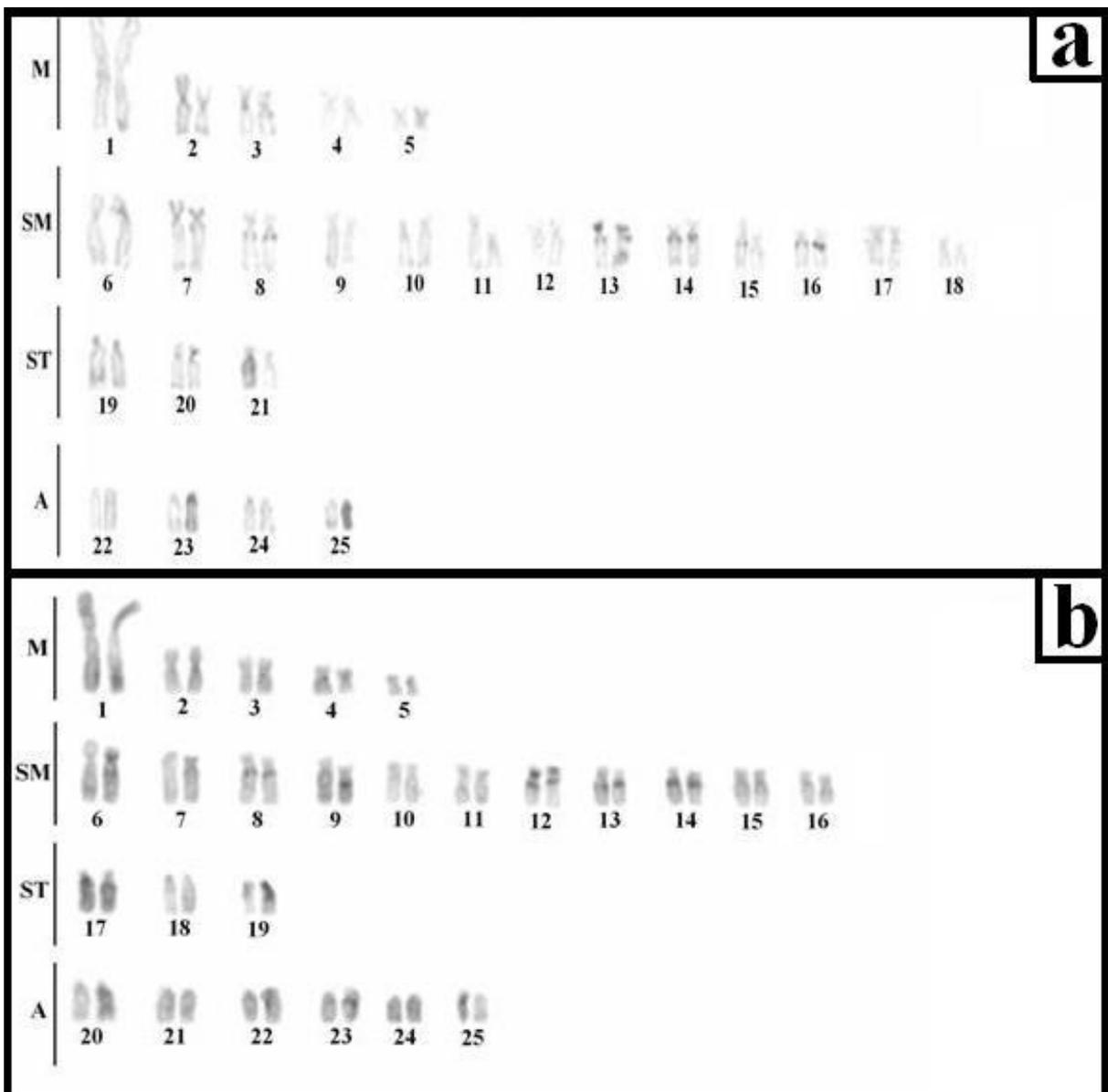


Figura 10 - Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Astyanax altiparanae*; A: população do rio Iguaçu; B: população do ribeirão Maringá.

### 4.3. *Astyanax fasciatus*

No trabalho aqui desenvolvido foram analisados nove indivíduos de *Astyanax fasciatus* do ribeirão Maringá: 3 machos e 6 fêmeas, com número diplóide  $2n=46$  cromossomos, distribuídos em 14M + 10SM + 12ST + 10A, com número fundamental igual a 82 (Figura 11).

Estudos citogenéticos de *A. fasciatus* têm mostrado uma variação de número diplóide de  $2n=46$  cromossomos e  $2n=48$  cromossomos, com variações de fórmula cariotípica com NF entre 82 e 90 para populações  $2n=46$  e 86 a 94 para  $2n=48$  (Quadro 3). Provavelmente, as diferenças de número diplóide devem caracterizar unidades taxonômicas diferentes e as de fórmula cariotípica dentro de cada unidade ocorrem em razão dos rearranjos cromossômicos estruturais.

A análise da região organizadora do nucléolo, através da impregnação pelo nitrato de prata, mostrou apenas 1 par ativo, indicando um sistema de NOR-simples, com presença de uma marcação terminal no braço longo de um par de cromossomos do tipo submetacêntrico (Figura 12a). Dentre as populações com mesmo número diplóide, observamos dados semelhantes na população do córrego das Rosas (Fernandes e Martins-Santos, 2006). As demais populações apresentaram um sistema de NOR múltipla com até 4 pares de cromossomos. Embora com apenas um par marcado pela prata, a população do córrego das Rosas mostrou pela análise de FISH 4 pares de marcações com sonda 18S, indicando que destes apenas um par submetacêntrico se expressava nesta população, semelhante ao mesmo par ativo na população do presente trabalho. Isso provavelmente deve constituir um sistema múltiplo pela análise por FISH.

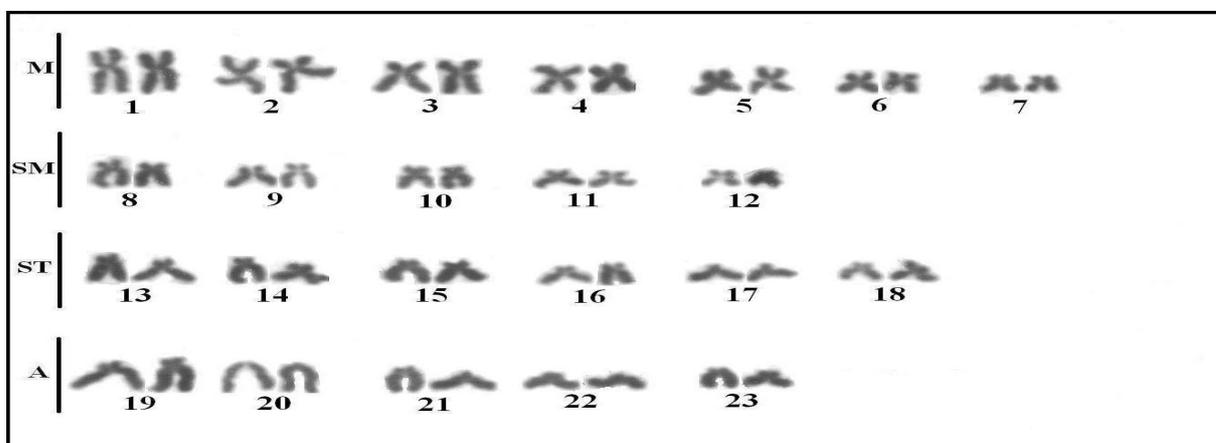


Figura 11 - Cariótipo convencional com Giemsa de *Astyanax fasciatus*.

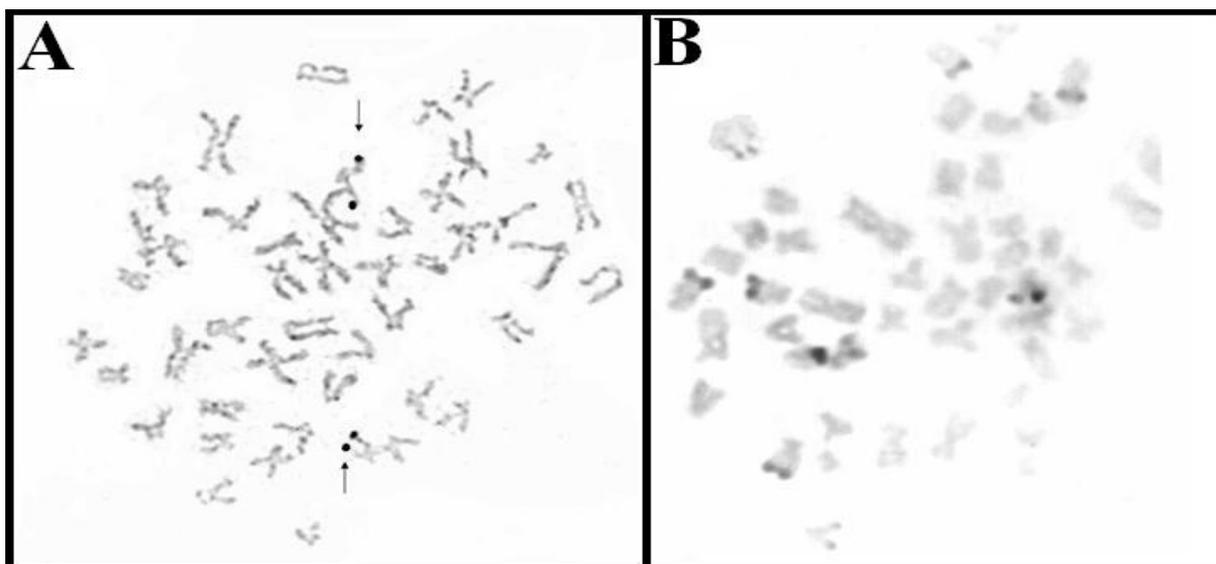


Figura 12 - A: Localização das NORs por Ag-NOR; B: padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Astyanax fasciatus*.

O padrão de banda-C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva bem evidentes, presentes nas regiões teloméricas em vários cromossomos característicos da espécie (Figura 12b).

Quadro 3 - Dados citogenéticos de *Astyanax fasciatus*

Espécie	Localidade	Bacia	2n	NF	M	SM	ST	A	Bs	NORs	Ref.
<i>A. fasciatus</i>	rio Araguari	B	46	86	14	16	10	6	0	4	18
	rio Mogi-Guaçu	I	46	88	12	20	10	4	0	2	2
	rio Meia ponte	M	46	74	0	28	0	18	#	#	39
	rio Mogi-Guaçu	K	46	90	14	20	10	2	#	#	35
	rio Piracicaba	J	46	90	12	22	10	2	0	1 a 4	12
	córrego das rosas	H	46	88	12	22	8	4	0	2	3
	rio Sapucaí	#	48	88	8	18	14	8	0	2	19
	rio Paraibuna	F	48	86	8	18	12	10	0	1 a 6	12
	rio São Francisco	B	48	90	8	10	24	6	0	1 a 3	12
	rio Juquiá	N	48	94	10	24	12	2	#	#	35
	ribeirão Maringá	H	46	82	14	10	12	10	0	2	1

B: bacia do São Francisco; F: bacia do Paraíba do Sul; H: bacia do Pirapó; I: bacia do Mogi-Guaçu; J: bacia do Tietê; K: bacia do Mogi Guaçu; M: bacia do Meia Ponte; N: bacia do Juquiá; NF: número fundamental; M: metacêntrico; SM: submetacêntrico; ST: subtelo-cêntrico; A: acrocêntrico; Bs: presença de cromossomos extranumerários; NORs: região organizadora de nucléolos; 1: presente trabalho; 2: Daniel-Silva (1996); 3: Fernandes e Martins-Santos (2006); 12: Justi et al., (1990); 18: Torres-Mariano e Morelli (2004); 19: Swerts et al., (1998); 35: Morelli et al., (1983); 39: Jim e Toledo (1975).

## 5. CONCLUSÕES

a) Os dados aqui apresentados evidenciam uma variabilidade cariotípica entre as populações analisadas e outras populações, sugerindo uma evolução cariotípica heterogênea.

2) Os dados citogenéticos, para as três espécies do gênero *Astyanax*, analisadas no presente trabalho, corroboram com os aspectos básicos característicos do grupo, indicando a existência de complexos de espécies para cada uma delas. Contudo, uma padronização dos dados e a utilização de técnicas mais resolutivas devem ser consideradas para melhor definição da existência de unidades taxonômicas diferentes.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR.H.F. Peixes da bacia do alto Paraná. In: LOWE-MCCONNEL, R.H. (ed.) **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-399.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genética**, 64:165-169, 1984.
- ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, 67:117-122, 2002.
- ARAUJO, A.C.S.; MORELLI, S. **Estudos cariotípicos da população de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da nascente do córrego Jataí, Uberlândia – MG**. Disponível em: [www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2002/B/ESTUDO%20.pdf](http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2002/B/ESTUDO%20.pdf). Acesso em: 19, fevereiro, 2007.
- BARBIERI, G. Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do ribeirão do Fazzari. **Revista Brasileira de Biologia**, 52:579-588, 1992.
- BERTOLLO, L.A.C. **Estudos citogenéticos do gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae)**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1978. 128p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 1:103-120, 1978.
- BIAVATI, S.H.; MAISTRO, E.L. Contribuição aos estudos citogenéticos no gênero *Astyanax* (Characidae): análises em *A. bimaculatus* e *A. scabripinnis* coletadas

simpatricamente na nascente do Rio Machado, MG. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. Manaus: SBG, 2000. **Resumos Expandidos...** Manaus: SBG, 2000, p. 79-84

BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; OLIVEIRA, C. A natural triploid in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica**, 115:253-258, 2002.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce de São Paulo: sistemático. In: Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguai. **Poluição e piscicultura**. São Paulo: USP, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. (Com chaves de identificação para peixes da bacia do São Francisco). Brasília: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1988. 115p.

BRITSKI, H.A. Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais. In: AGOSTINHO, A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (eds.) **Situação atual e perspectivas da Ictiologia no Brasil**. Maringá: EDUEM, 1992. p. 42-57.

CAVALLINI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erithrinidae). In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, 1998. **Resumos...** Londrina: UEL, 1998. p. 32.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, 54:253-260, 2001.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; BUCKUP, P.A.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric Characidium fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, 138:213-218, 2003.

DANIEL-SILVA, M.F.Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1996. 176p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

DANIEL-SILVA, M.F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia*, 54:209-215, 2001.

DOMINGUES, M.S. **Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 66p. Dissertação (Mestrado em Genética).

DO-VALE, J.D. **Diversidade cariotípica em espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes) da região de Maringá**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1999. 24p. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas).

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, 43: 38-49, 1917.

FAUAZ, G.; MOREIRA-FILHO, O. Triploidia natural em *Astyanax eigenmanniorum* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, 1:14-56, 1991.

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

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.C.A. Supernumerary chromosomes in a *Rhandia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genética**, 81:193-198, 1990.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; CAMACHO, J.P.M. B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biologica**, 48:105-109, 2000.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin PR Brazil. **Cytologia**, 68:289-293, 2003.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141:1-5, 2004.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, 124:301-306, 2005.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 29:1-5, 2006.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. **Caryologia**, 59:253-259, 2006.

FERRO, D.A.M.; NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): population and functional diversity. **Genetica**, 110:55-62, 2001.

FIDELIS, G.A. **Estudos citogenéticos em peixes da família Sternopygidae (Pisces, Gymnotiformes) na planície de inundação do alto rio Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. 33p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

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

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. Word Wide Web Eletronic Publication. Disponível em: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) versão (01/2007). Acesso em: 21, março, 2007.

GALETTI-JR, P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of eighth species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of nucleolar organizing region. **Caryologia**, 37:401-406, 1984.

GARAVELLO, J.C.; PAVANELLI, C.S.; SUZUKI, H.I. Caracterização da ictiofauna do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (eds.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM / Nupélia, 1997. p. 61-84.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Museu de Ciência e Tecnologia - PUCRS - Série Zoologia**, 13:65-88, 2000.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1977. 672p.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 142p.

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

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

JONES, R.N.; REES, H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982. 226p.

JUSTI, A.J.; MOREIRA-FILHO, O.; SALVADOR, L.B.; GALETTI JR., P.M. Caracterização citogenética de três populações do “complexo” *fasciatus* (Characiformes, Characidae). In: III SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. Botucatu, 1990. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2002, p. 11.

LEVAN, A; FREDGA, K; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosome. **Hereditas**, 52:201-220, 1964.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostharophysi, Characiformes)**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1993. 158p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

MAISTRO, E.L. **Caracterização citogenética e morfológica de população de *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae) das bacias do Tietê e Paranapanema**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1991. 89p. Dissertação (Mestrado em Genética).

MAISTRO, E.L. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, 87:101-106, 1992.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 17:153-156, 1994a.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia**, 47:233-239, 1994b.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, 21:201-206, 1998.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 23:365-369, 2000.

MALACRIDA, A.C.C.P.; SHIBATTA, O.A.; GIULIANO-CAETANO, L. Análise cromossômica de *Astyanax cf. fasciatus* (Pisces, Characidae) coletado no rio Claro-Tamarana/Pr e ribeirão dos Apertados/Pr. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. Manaus, 2000. **Resumos...** Manaus: UFSC, 2000, p. 49.

MALACRIDA, A.C.C.P.; GIULIANO-CAETANO, L. Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. **Cytologia**, 68:267-270, 2003.

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

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

MARCO-FERRO, D.A.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, 119:147-153, 2003.

MELO, C.E.; LIMA, J.D.; MELO, T.L.; PINTO-SILVA, P. **Peixes do rio dos Mortes. Identificação e ecologia das espécies mais comuns**. Cuiabá: UNEMAT, 2005. 145p.

MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHU, R; MILLER, O.J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cells hybrid. **Exploration Cell Research**, 101:235-243, 1976.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis*. **Hereditas**, 127:249-253, 1997.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, Pr, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 21:55-61, 1998a.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia**, 63:259-265, 1998b.

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

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; CAETANO, L.G. Diversidade cromossômica entre populações do grupo *scabripinnis* de Londrina e Maringá. In: II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. Maringá, 1988. **Resumos...** Maringá: UEM: 1988. p 46.

MOREIRA-FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Jenins, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1989. 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, 14:331-357, 1991.

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

MOREIRA-PERES, W.A. **Análise da diversidade cariotípica de Characidae da bacia do São Francisco**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2005. 102p. Dissertação (Mestrado em Genética).

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

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

NÉO, D.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 108:211-215, 2000a.

NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, 85:136-141, 2000b.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, 11:577-624, 1988.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Heredity**, 79:473-476, 1997.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L.F.A.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. Manaus, 2000. **Resumos...** Manaus: Inpa, 2000. p. 24-25.

OLIVEIRA, C., WRIGHT, J.M., FORESTI, F. Chromosome structure in fishes. In: SOBTI, R.C.; OBE, G. (eds.). **Some Aspects of Chromosome Structure**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2002. p. 103-108.

PACHECO, R.B. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Tetragonopterinae)**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2001. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

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

PAGANELLI, H.H. **Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus*. (Linnaeus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1990. 108p. Dissertação (Mestrado em Genética).

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

PAINTNER-MARQUES, T.R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Multiple NORs in *Bryconamericus aff. exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**, 137:107-112, 2002b.

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, 81:117-123, 1990.

PAZZA, R.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Análise da diversidade cariotípica em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characiformes) do rio Mogi-Guaçu. In: 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. Águas de Lindóia: SBG, 2002. **Resumos...** São Paulo: 2002. p. 76-76.

PEIXOTO, R.M.; ERDTMANN, B. Estudos citogenéticos no gênero *Gymnogeophagus* (Pisces, Perciformes, Cichlidae). In: II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, Maringá, 1988. **Resumos...** Maringá: UEM, 1988. p. 27.

PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Citogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83:2934-2938, 1986.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* paranae in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, 20:337-380, 1997.

POST, A. Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen bei süsswasser teleosteein. **Zoologische Systematik Und Evolutionsforschung**, 3:47-93, 1965.

PRIOLI, S.M.A.; SEKINE, E.S.; JÚLIO JR, H.F. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 25:421-432, 2002.

REIS, R.R.; KULLANDER, S.O.; FERARIS Jr. (org). Check list of the freshwater fishes of south and central América. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.106-113, 2003.

ROCON-STANGE, E.A.; ALMEIDA-TOLEDO L.F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, 16:601-615, 1993.

SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O.B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, 69:50-56, 1992.

SCHEEL, J.J. **Fish chromosomes and their evolution**. Danmarks: Charlottenlund Internal Report of Danmarks Akvarium, 1973. 22p.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersal and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today**, 9:61-74, 1987.

STIVARI, M.K.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). **Cytologia**, 69:25-34, 2004.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, A.C. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia**, 60:273-281, 1995.

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

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exploration Cell Research**, 75:304-306, 1972.

STRIPECKE, R.; NOGUEIRA PINTO, M.T.; HACKEL, C.; SAZIMA, T.O. cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes Characidae). In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA. Campinas, 1985. **Resumos...** Campinas: SBZ, 2002, p. 173-174.

SWERTS, C.P.; PRADO, G.C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Análises citogenéticas preliminares na espécie *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: VII SIMPÓSIO DE. CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA - PEIXES NEOTROPICAIS. Londrina, 1998. 1998. **Resumos...** Londrina: UEL, 1998. p. A.7.

SWERTS, C.P.; CASTRO, G.C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Análises citogenéticas preliminares na espécie *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) provenientes do rio Sapucaí, represa de Furnas, MG. **Genetics and Molecular Biology**, 21:66-66, 1998.

TAKAHASHI, E.K.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Estudo citogenético em *Astyanax bimaculatus*. Análise meiótica. **Revista Brasileira de Genética**, 1995. (Suplemento nº 18 - sem paginação).

TORRES-MARIANO, A.R.; MORELLI, S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 66:161-165, 2004.

VARI, R.P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). **Smithsonian contributions to zoology**, 378:1-60, 1983.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. 603p.

VAZZOLER, A.E.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 169p.

VENERE, P.C.; GALETTI-JR, P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Brazilian Journal of Genetics*, 12:17-25, 1989.

VENERE, P.C. **Diversidade cariotípica em peixes do médio rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi)**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução).

VICENTE, V.E; MOREIRA-FILHO, O. Estudos da frequência do cromossomo B em três diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, 1994. (Suplemento nº 17 - sem paginação).

VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 74:1-2, 1996.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Chromosome Science**, 3:9-13, 1999.

WEITZMAN, S.H.; W.L.; FINK. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World characiforms. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, 150:339-395, 1983.

WASKO, A.P. **Estudos citogenéticos no gênero *Bryconamericus* (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonômica-evolutiva.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1996. 165p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução).