

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

JOSIELE PAULA KLASSMANN

**Estudo citogenético em três espécies da ordem Characiformes (Pisces) do
Rio São Francisco, Bacia do Rio Iguaçu**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL**

**FEVEREIRO – 2009
JOSIELE PAULA KLASSMANN**

**Estudo citogenético em três espécies da ordem Characiformes (Pisces) do
Rio São Francisco, Bacia do Rio Iguaçu**

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^a Dr^a Isabel Cristina Martins dos Santos

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2009**

À minha mãe, Lorena Klassmann (*in memoriam*), por todo o amor com que me deu a vida, por ter sido a melhor mãe do mundo e por permanecer sempre comigo mesmo que distante.

Ao meu pai, Libório Klassmann, pelo incentivo, pela paciência e pelas palavras de conforto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas graças concebidas e por conceber-me sabedoria e força para continuar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por proporcionar condições para a realização desse trabalho, e ao Secretário do Programa, Francisco José da Cruz, pela competência no auxílio prestado.

À minha Orientadora, professora doutora Isabel Cristina Martins dos Santos, pela orientação, dedicação, disposição, paciência, confiança e amizade dedicados a mim e a este trabalho.

Aos professores Coorientadores, doutor Horácio Ferreira Júlio Júnior e doutora Ana Luiza Portela Castro pelas grandes contribuições.

A todos os professores do Programa, em especial à professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado e ao professor doutor Erasmo Renesto.

Aos membros da banca examinadora, doutor Carlos Alexandre Fernandes e professora doutora Luciana Andréia Borin de Carvalho, pelas valiosas sugestões.

Aos meus irmãos, Jacson, Jaciane, Jeferson e Evelyn Klassmann, pelo amor, carinho, cumplicidade e ajuda incondicional.

À minha cunhada, Carla, e aos meus sobrinhos Renato, Luiza e Isadora, por estarem sempre presentes e alegrarem a minha vida.

Aos meus familiares, em especial ao Valter, Geni, Guto, Marina, Valmor, Cheila, Gabriela, Tomás, Rose, Suzi, Bárbara, Belinha e Sarah, pelo companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

À Fernanda, Kika, Larissa, Paula Moraes, Adriana, Michele, Dani Emy, Sheila, Aliussa, Taline, Claudinha, Paula Rauber, Cássia, Crislaine, Juliana, Mariana, Arielly, Daya, Ana, Polly, Luciele, Karol, Andréia, Sandra, Ana Daniela, Roseane, Jhenny, Mauro, Marlinho, Ferraz, Pedro e Vagner por serem inesquecíveis.

Ao Leonardo e à Masé, por não medirem esforços em ajudar e, acima de tudo, pela amizade.

À Fernanda, Suzana, Bibiana, ao Paulo e ao Renan, por fazerem dos meus dias uma grande alegria.

Aos amigos do laboratório, Ana Paula, Edner, Carla, Jocicléia, Fernando, Valéria, Lana e a todos os amigos do curso de pós-graduação, pelo companheirismo durante as aulas e as pesquisas.

A todos que contribuíram, durante toda a minha vida, para o meu crescimento humano e intelectual.

BIOGRAFIA

Josiele Paula Klassmann, filha de Libório e Lorena Klassmann, nasceu, em 18 de maio de 1983, na cidade de Toledo, estado do Paraná.

Em 1988, iniciou seus estudos na Escola Municipal Arsênio Heiss. Em 1993, passou a estudar no Colégio Estadual Pedro Ernesto Garlet, na cidade de Cascavel, Paraná, onde concluiu o Ensino Fundamental em 1996.

Em 1997, iniciou o Ensino Médio, no Colégio Estadual Jardim Porto Alegre, em Toledo, Paraná, e o concluiu em Goiânia, Goiás, no Colégio Ávila, no ano de 1999.

Ingressou, em fevereiro de 2000, no curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia, na Universidade Paranaense, campus Toledo-PR. Durante o curso de Graduação, participou, dentre outras atividades, de estágios, projetos de pesquisa e iniciação científica. Graduou-se ao final do ano letivo de 2004.

Em 2005, ingressou no curso de Especialização em Biotecnologia e Análise da Biodiversidade, na mesma instituição, concluindo-o em dezembro de 2006.

Em março de 2006, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Ordem Characiformes	4
2.2. Aspectos citogenéticos da família Characidae	4
2.3. Aspectos citogenéticos da família Prochilodontidae	7
2.4. Cromossomos B	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Material	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Indução de mitoses	11
3.2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos	11
3.2.3. Bandeamento Cromossômico	12
3.2.3.1. Bandeamento C	12
3.2.3.2. Regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)	13
3.2.4. Identificação dos cromossomos	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

KLASSMANN, Josiele Paula. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2009. **Estudo citogenético em três espécies da ordem Characiformes (Pisces) do Rio São Francisco, Bacia do Rio Iguaçu.** Professora Orientadora: Isabel Cristina Martins dos Santos. Professores Conselheiros: Horácio Ferreira Júlio Júnior e Ana Luiza Portela Castro.

A ictiofauna de água doce da América do Sul e Central é uma das mais diversificadas e ricas do mundo e, atualmente, a ordem mais representativa em número de espécies conhecidas nessa região é a Characiformes. Essa ordem inclui as famílias Characidae e Prochilodontidae. No presente trabalho foram analisadas populações de *Astyanax scabripinis*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus* do Rio São Francisco, Toledo-PR. Dos 28 indivíduos de *Astyanax scabripinis* estudados, 25 apresentaram número diplóide de $2n = 50$ cromossomos (citótipo I) distribuídos em $10m + 20sm + 8st + 12a$, com $NF = 88$. Os outros 3 apresentaram $2n = 48$ cromossomos (citótipo II), com fórmula cariotípica de $11m + 18sm + 9st + 10a$ e $NF = 86$. Nesses indivíduos ainda foi observada a presença de um par heteromórfico no cariótipo e, em algumas células, foi observada a presença de um cromossomo supranumerário acrocêntrico. Para o citótipo I, o padrão de Banda C mostrou heterocromatina centromérica e telomérica em todos os cromossomos. A região organizadora do nucléolo apresentou marcações múltiplas em 3 pares organizadores nucleolares. Para o citótipo II, as regiões heterocromáticas mostraram marcações centroméricas, na maioria dos cromossomos, e teloméricas, em apenas alguns. A marcação da Ag-NOR apresentou-se múltipla, indicando também a presença de 3 pares. A análise dos 15 espécimens de *Piaractus mesopotamicus* mostrou um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos, fórmula cariotípica de $36m + 18sm$ e $NF = 108$. Além disso, foi observado a presença de um cromossomo B acrocêntrico, heterocromático, em 20% dos indivíduos com variação intraindividual de 26,6%. Os segmentos heterocromáticos foram visualizados na região centromérica da maioria dos cromossomos, assim como em posição intersticial. A impregnação pelo nitrato de prata apresentou 5 cromossomos marcados em regiões terminais. Os indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus*

apresentaram $2n = 54$ cromossomos, fórmula cariotípica de $40m + 14 sm$ e $NF = 108$. Dos 10 indivíduos analisados, 2 (20%) apresentaram $2n = 55$ cromossomos, devido à presença de um cromossomo metacêntrico extra em 100% das células analisadas. O padrão de banda C mostrou blocos de heterocromatina bem evidentes, presentes nas regiões centroméricas e mais pálidas nas regiões intersticiais, e o cromossomo B mostrou-se totalmente heterocromático. O estudo das NORs revelou um sistema de NOR múltiplas com 2 a 4 marcações presentes em região terminal.

Palavras-chave: Citogenética de Peixes, Characiformes, Diversidade Cariotípica.

ABSTRACT

KLASSMANN, Josiele Paula. M. Sc. State University of Maringá, February of the 2009. **Cytogenetic study in three species of the Characiformes order (Pisces) of the São Francisco River, Paraná river basin.** Adviser: Isabel Cristina Martins dos Santos. Committee Members: Horácio Ferreira Júlio Júnior and Ana Luiza Portela Castro.

The freshwater fish fauna of South and Central America is one of the most diverse and richest in the world and, currently, the order more representative number of species known in this region is the Characiformes. This order includes the families Characidae and Prochilodontidae. In the present study were analyzed populations of *Astyanax scabripinis*, *Piaractus mesopotamocus* and *Prochilodus lineatus* of the São Francisco River, Toledo-PR. In 28 individuals of *Astyanax scabripinis* studied, 25 showed diploid number of $2n = 50$ chromosomes (cytotypes I) distributed in $10m + 20sm + 8st + 12a$, with $NF = 88$. The other three individuals analyzed showed $2n = 48$ chromosomes (cytotypes II), with karyotypic formula of $11m + 18sm + 9st + 10a$ and $NF = 86$. In these individuals was also observed the presence of a heteromorphic pair in the karyotype. Beside this some cells showed the presence of a small acrocentric supernumerary chromosome. The pattern of C band of the cytotypes I, revealed centromeric and telomeric heterochromatin in all chromosomes. The NOR had multiple markings on 3 pairs nucleolar organizers. Cytotypes II showed marked heterochromatic centromeric regions in most chromosomes and telomeric in just a few. The marking of the Ag-NOR was presented multiple, indicating the presence of 3 pairs. Although the two cytotypes showed same number of NOR the types and position were different. The analysis of 15 specimens of *Piaractus mesopotamicus* showed a diploid number of $2n = 54$ chromosomes, karyotypic formula of $36m + 18sm$ and $NF = 108$. The heterochromatic segments were visualized in the centromeric region of most chromosomes, and in interstitial position. Beside this, was observed the presence of the one heterochromatic B chromosome in 20% of the individuals and 26,6% intraindividual variation. The impregnation by silver nitrate showed 5 marked chromosomes in terminals regions. *Prochilodus lineatus* showed $2n = 54$ chromosomes, karyotypic formula of $40m + 14 sm$ and $NF = 108$. Two of the 10

specimens analyzed showed $2n = 55$ chromosomes, due to the presence of an extra metacentric chromosome in 100% of the cells examined. The standard C-band showed evident blocks of heterochromatin present in the centromeric regions and interstitial regions more pale. The B chromosome was totally heterochromatic. The study of NORs revealed a system of multiple NOR with 2 to 4 markings present in the terminal region.

Key words: Fishes Cytogenetic, Characiformes, Karyolitic Diversity.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam o maior grupo de vertebrados existente, com cerca de 28 mil espécies (Nelson, 2006). De acordo com Bolhke et al. (1978), na América do Sul, o número de peixes de água doce pode chegar a 5000. A América do Sul, juntamente com a América Central, representa uma das mais diversificadas e ricas ictiofaunas do mundo, englobando aproximadamente 8000 espécies descritas, representando cerca de 30% de toda a diversidade de peixes do mundo.

Na região neotropical de água doce, as duas ordens mais representativas em número de espécies de peixes conhecidas são os Characiformes e os Siluriformes (Lowe-McConnell, 1999). Os estudos desenvolvidos em citogenética de peixes brasileiros concentram-se basicamente nestas duas ordens.

A citogenética de peixes tornou-se uma importante ferramenta na abordagem de questões evolutivas e de sistemática, além de estudos de polimorfismo e poliploidia cromossômica. Segundo Guerra (1988), a análise citotaxonomica tem trazido uma grande contribuição ao estudo da evolução, principalmente pelo fato de que os cromossomos constituem o próprio material genético e, portanto, alterações destes parâmetros são quase sempre significativas para o rumo evolutivo das espécies.

Os primeiros dados sobre a estrutura cariotípica de peixes neotropicais foram descritos por Jim e Toledo, em 1975, por meio do que apresentaram o cariótipo de duas espécies de *Astyanax*. Em 1988, Oliveira et al. listaram os dados citogenéticos disponíveis para 433 espécies de peixes. Em uma revisão mais recente, foram mostrados números diplóides e/ou haplóides para 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias de peixes neotropicais, com registro de grande diversidade cariotípica (Oliveira et al., 2000). Os números diplóides de cromossomos de peixes apresentam uma variação que vai de $2n = 20$ em *Pterolebias longipinnis* à $2n = 134$ para *Corydoras aeneus* (Oliveira et al., 1996). Estes dados incluem, além de números e fórmulas cromossômicas, informações sobre cromossomos sexuais diferenciados, presença de cromossomos supranumerários, padrões de heterocromatina constitutiva, número e distribuição de regiões organizadoras de nucléolos.

Embora os estudos citogenéticos mostrem uma ampla variabilidade cromossômica, alguns grupos de peixes têm apresentado números diplóides mais conservados, como é o caso das famílias Curimatidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Anostomidae e Prochilodontidae (Vari, 1983).

A ordem Characiformes apresenta 18 famílias com cerca de 270 gêneros e pelo menos 1674 espécies, sendo poucas destas africanas e o restante é do sudoeste dos Estados Unidos, do México e das Américas Central e do Sul (Nelson, 2006). Dentro desta Ordem encontram-se as famílias Characidae com 167 gêneros, entre eles *Astyanax* e *Piaractus* (Froese et al., 2008), e Prochilodontidae com 3 gêneros, entre eles o *Prochilodus* (Castro e Vari, 2004).

A região hidrográfica do Paraná apresenta uma área de 879.860 Km², abrangendo os estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e Distrito Federal. No estado do Paraná, entre os municípios de Guaíra e Foz do Iguaçu, esta região ocupa 170 km de trecho contíguo aos territórios brasileiro e paraguaio, onde foi formado o Reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu. A rede hidrográfica do território paranaense, que drena suas águas diretamente ao reservatório de Itaipu, é denominada Bacia do Paraná III. Com 8.000 km², esta bacia envolve os municípios de Altônia, Cascavel, Céu Azul, Diamante do Oeste, Entre Rios do Oeste, Foz do Iguaçu, Guaíra, Itaipulândia, Marechal Cândido Rondon, Maripá, Matelândia, Medianeira, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa, Ouro Verde do Oeste, Pato Bragado, Quatro Pontes, Ramilândia, Santa Helena, Santa Tereza do Oeste, Santa Terezinha de Itaipu, São José das Palmeiras, São Miguel do Iguaçu, São Pedro do Iguaçu, Terra Roxa, Toledo e Vera Cruz do Oeste. Entre os rios que formam esta bacia, podemos destacar o São Francisco, o Guaçu, o São Francisco Falso, o Ocoí, além do São Vicente e Passo Cuê (Sonegatti, 2009).

O rio São Francisco possui 72,1 km de extensão e uma área de 2.219,1 km² que abrange 11 municípios do oeste do estado do Paraná. Sua nascente está localizada na área urbana de Cascavel e o rio deságua no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu (Unesco Help Program, 2009). Entre os peixes de ocorrência neste rio estão algumas espécies dos gêneros *Astyanax*, *Piaractus* e *Prochilodus*.

Considerando a alta variabilidade encontrada entre populações de *Astyanax scabripinnis* e os escassos estudos em *Piaractus mesopotamicus* e

Prochilodus lineatus, além do fato de que não existem estudos citogenéticos no rio São Francisco, o presente trabalho tem como objetivo iniciar um levantamento da caracterização cromossômica das diferentes espécies de Characiformes deste rio. O trabalho será investigar as possíveis variabilidades inter e intraespecíficas existentes no grupo, utilizando diferentes técnicas de bandeamentos com a finalidade de detectar possíveis polimorfismos numéricos e estruturais existentes e/ou rearranjos cromossômicos que permitam estabelecer os mecanismos evolutivos presentes na diversificação cariotípica destas populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ordem Characiformes

Segundo Britski et al. (2007), a ordem Characiformes é um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul. Os membros desta ordem ocorrem na África subsahariana, Américas Central e do Sul, atingindo sua maior diversidade na região neotropical, habitando os mais diversos ambientes (Moreira, 2007).

Os characiformes compreendem formas herbívoras, onívoras, iliófagas e carnívoras. Os peixes desta ordem possuem algumas características externas que os diferenciam dos demais grupos, como o corpo coberto de escamas, nadadeiras pélvicas (ventrais) geralmente situadas bem atrás da inserção das peitorais, raios das nadadeiras moles e, geralmente, pela presença de uma nadadeira adiposa (Britski et al., 2007).

Pode-se dizer que os Characiformes apresentam dois padrões de diversificação cromossômica: aqueles que apresentam uma grande diversidade cariotípica, entre os quais podemos citar o gênero *Astyanax* (grupo *Incertae Sedis*) e, de uma forma geral, os Characidae, e aqueles cuja diversidade de estrutura cariotípica é extremamente conservada, como é o caso dos indivíduos pertencentes às famílias Anostomidae, Prochilodontidae, Curimatidae, Chilodontidae e Hemiodontidae, inseridas por Vari (1983) como grupos naturais, sendo assim considerados como monofiléticos.

2.2. Aspectos citogenéticos da família Characidae

Dentre as 18 famílias pertencentes à Ordem Characiformes, a Characidae é a mais complexa. A complexidade desta família é tal que se torna muito difícil caracterizá-la como um todo e diferenciá-la das demais famílias de Characiformes (Britski, 2007). Seus representantes estão presentes em praticamente todos os ambientes de água doce da América, desde a fronteira do México-Estados Unidos até a Argentina (Lucena, 1993; Froese e Pauly, 2005). A maior parte das suas subfamílias foram propostas por Eigenman no início do século passado e, desde

então, novos gêneros têm sido descritos e não se encaixam em nenhuma destas subfamílias (*Incertae Sedis*).

Além de ser a mais importante, é também a família que apresenta maior número de peixes de água doce da América do Sul, com cerca de 170 gêneros e 980 espécies (Nelson, 2006), sendo que cerca de 400 destas espécies são encontradas em território brasileiro (Britski, 1972).

De acordo com Vari (1983), a família Characidae apresenta-se confusa quanto às suas relações filogenéticas, pois é difícil estabelecer grupos que tenham origem monofilética. Do mesmo modo, Britski (1986) considera que muitos gêneros atuais desta família não constituem grupos naturais, embora algumas de suas subfamílias reúnam especializações as quais supostamente formariam grupos naturais monofiléticos. Portanto, de um modo geral, a família Characidae necessita de revisões e pouco se conhece sobre as relações dos grupos que a compõe.

Post (1965) apresentou os primeiros dados citogenéticos de alguns peixes da família Characidae. A faixa de variação do número de cromossomos diplóides para os membros desta família é de $2n = 28$ cromossomos para uma espécie de *Hemigrammus* (Scheel, 1973) à $2n = 102$ cromossomos para *Potamorhina altamazonica* (Feldberg et al., 1993).

A família Characidae inclui 12 subfamílias. Atualmente, a subfamília *Incertae Sedis* é a que reúne o maior número de espécies, sendo também a mais complexa. Em geral, os peixes pertencentes a esta subfamília são de pequeno porte, sendo muitos dos gêneros e espécies mal definidos (Britski et al., 2007).

O gênero *Astyanax* é o mais comuns dos gêneros desta subfamília e tem recebido atenção especial por parte de alguns pesquisadores devido às suas características morfológicas e citogenéticas. (Kantek, 2005). Este gênero mostra uma grande variabilidade cariotípica, que vai desde $2n = 36$ em *A. schubarti* (Moreli et al., 1983) à $2n = 50$ em outras espécies do gênero, como os *A. scabripinnis* (Fauaz et al., 1994; Souza e Moreira-Filho, 1995).

Do ponto de vista citogenético, *A. scabripinnis* tem sido intensivamente a espécie mais estudada do gênero *Astyanax*, por apresentar grande diversidade cariotípica, tanto em número quanto em morfologia dos cromossomos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Fernandes e Martins-

Santos, 2003; Fernandes e Martins-Santos, 2005). A variação no número diplóide de $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$ cromossomos entre as espécies de *A. scabripinnis* indica um “complexo de espécies” (Moreira-Filho e Bertollo, 1991).

Cromossomos B também têm sido detectados em diferentes populações de *Astyanax scabripinnis*, podendo se apresentar como um macrocromossomo ou um microcromossomo (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992; Maistro et al., 1994; Maistro et al., 1994; Vicente et al., 1996; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Moreira-Filho et al., 2001; Alves e Martins-Santos, 2002; Moreira-Filho et al., 2004; Fernandes e Martins-Santos, 2005). Também foi descrita a ocorrência de triploidia natural em algumas espécies deste gênero, como em *A. scabripinnis* (Maistro et al., 1994), em *A. fasciatus* (Malacrida et al., 2000), dentre outros.

A subfamília Myleinae inclui como membros os pacus e também os tambaquis. Estes representantes são peixes herbívoros, que apresentam como características básicas duas séries de dentes molariformes ou incisiformes no prémaxilar e no dentário, corpo alto e quilha ventral provida de espinhos (Canan e Gurgel, 1997).

O *Piaractus mesopotamicus*, conhecido popularmente como pacu, é um dos membros mais conhecidos desta subfamília. É um peixe originário das bacias dos rios Paraguai e Prata (Souza, 1998), sendo uma das espécies brasileiras mais cultivadas e apreciadas gastronomicamente.

Atualmente, existem controvérsias em relação à classificação taxonômica das espécies de *Piaractus*. Machado-Allison (1983) e Jégu (2003) as consideram como sendo membros da subfamília Serrasalminae (família Characidae). Já Géry (1972) reorganizou o grupo, pacus juntamente com as piranhas, dentro de uma família distinta, a Serrasalmidae. Estudos mais recentes as consideram como membros da família Characidae, subfamília Myleinae (Britski et al. 2007).

Uma pequena quantidade de dados citogenéticos da subfamília Myleinae está disponível. Mas sabe-se que esta subfamília é um grupo que apresenta pouca variabilidade na estrutura cariotípica, sendo que a maioria das espécies permanece com o número diplóide mais primitivo, o de $2n = 54$ cromossomos (Parra e Feldberg, 2000).

2.3. Aspectos citogenéticos da família Prochilodontidae

A família Prochilodontidae é constituída de 3 gêneros e 21 espécies válidas, sendo que o gênero *Prochilodus* contém 13 destas espécies (Castro e Vari, 2004). A distribuição geográfica desta família restringe-se à América do Sul (Schubart, 1947) e sua ocorrência é registrada em quase todas as bacias hidrográficas sul-americanas, ressaltando sua abundância e valor econômico.

Os prochilodontídeos são peixes iliófagos de tamanho mediano a grande, caracterizados por possuírem lábios espessos, móveis e providos de numerosos dentículos (Britski et al., 2007).

Os representantes do gênero *Prochilodus* são caracterizados pela presença de um cariótipo altamente conservado de $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Em muitos casos, como em indivíduos das espécies *P. lineatus* e *P. cearensis*, a estabilidade cariotípica é alterada pela presença de variação do número de cromossomos B (Pauls e Bertollo, 1990).

Estes cromossomos foram detectados pela primeira vez em populações de *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983) e, logo após, foram descritos em muitas outras famílias, dentre elas a família a Characidae.

Em *Prochilodus lineatus*, os cromossomos B podem apresentar algumas variações no número (0 a 7 cromossomos B por célula) e na morfologia (metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos), aparecendo geralmente em tamanho pequeno (Oliveira et al., 1996; Cavallaro et al., 2000).

Os cromossomos B em *Prochilodus lineatus*, citados anteriormente como *Prochilodus scrofa* Steindachner (1881), apresentam-se preferencialmente como pequenos metacêntricos, mas podem ocorrer nas formas de submetacêntricos e acrocêntricos, com diferenças em relação ao tamanho. Com isso, sugere-se que os demais tipos destes cromossomos observados se originaram da forma cromossômica básica, os metacêntricos (Cavallaro, 1992). Ao realizar um estudo comparativo entre cromossomos B em *P. lineatus*, este mesmo autor sugeriu a ocorrência de números específicos de cromossomos B relacionados a determinadas faixas etárias da espécie estudada.

Jesus et al. (2003), estudando famílias de DNA satélite em *Prochilodus lineatus*, propuseram que os cromossomos B destas espécies podem ter duas origens: uma é a origem por isocromossomos e a outra é pela não-disjunção com

posterior modificação estrutural. Artoni et al. (2006) também propuseram que os cromossomos B de *Prochilodus lineatus* tenham se originado por isocromossomos.

2.4. Cromossomos B

Os cromossomos B ou cromossomos supranumerários são cromossomos extras ao complemento A, geralmente pequenos e heterocromáticos. Seu número por indivíduo é muito variável e esta variação numérica se deve, em parte, ao comportamento meiótico irregular. Em alguns casos, os Bs interferem em características críticas para as espécies, como pareamento de homólogos A, frequência de quiasmas ou fertilidade dos gametas (Guerra, 1988).

Podem variar na morfologia, tamanho, grau de heterocromatização e número de ocorrência por populações (Araújo et al., 1998). Porém, a estrutura, a função e o comportamento destes cromossomos são particulares de cada grupo, dificultando a elucidação da sua importância para as espécies (Oliveira et al., 1997).

Estes cromossomos são classificados de acordo com o tamanho. Os menores do que o menor cromossomo do complemento A são denominados microcromossomos, os maiores ou de mesmo tamanho que o maior cromossomo do complemento A são denominados macrocromossomos. Os microcromossomos são encontrados nos gêneros *Schizodon*, *Astyanax*, *Moenkhsusia*, *Cyphocharax*, *Steindachnerina* e *Prochilodus*; os macrocromossomos ocorrem em espécies de *Astyanax fasciatus*, *Astyanax schubarti*, *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax scabripinnis paranae* (Moreira-Filho et al., 2001; Carvalho et al., 2008).

A origem e função dos cromossomos B ainda não estão bem esclarecidas (Guerra, 1988). Diversas hipóteses sobre a origem destes cromossomos em peixes neotropicais têm sido propostas, tais como a não-disjunção de um autossomo, a formação de isocromossomos, fragmentos cênicos resultantes de rearranjos cromossômicos ou ampliações de regiões paracentroméricas (Carvalho et al., 2008).

Jones e Rees (1982) relatam que a ausência de homologia com os demais cromossomos do cariótipo indica que os cromossomos B devem ter divergido de seus antecessores A, através de modificações estruturais e em seu

comportamento de pareamento na meiose. E que em muitos casos, seu isolamento em relação aos cromossomos normais na meiose envolveu um processo de heterocromatização.

Há, de acordo com alguns autores, dois critérios básicos que podem diferenciar os cromossomos B dos outros tipos de cromossomos. O primeiro diz respeito a sua distribuição na espécie, onde os indivíduos que não apresentam cromossomos B são normais quanto ao crescimento e reprodução, de modo que estes cromossomos parecem não serem essenciais à sobrevivência dos organismos. O segundo está relacionado ao seu comportamento na meiose, onde os cromossomos B podem parear entre si, formando quiasmas, mas não pareiam com os cromossomos normais do complemento, o que implica em uma ausência de homologia entre os cromossomos B e os membros regulares do cariótipo (Cavallaro, 1992).

A presença destes cromossomos está associada a um grande número de variações em nível celular e, aparentemente, eles podem intervir na regulação da atividade genética dos cromossomos normais (Cavallaro, 1992).

Segundo Jones e Rees (1982), um fator importante na qualificação dos cromossomos B está na sua habilidade de dispersão e manutenção como elementos permanentes na população, não se tratando de uma ocorrência de natureza transitória.

Os cromossomos B podem tanto representar eventos esporádicos em determinadas populações como uma característica comum das mesmas. (Araújo et al., 1998).

O primeiro relato de cromossomos B em peixes neotropicais foi em populações de *Prochilodus lineatus*, citado anteriormente como *P. scrofa* Steindachner (1881), onde apareceram como sendo um pequeno metacêntrico, totalmente heterocromático (Pauls e Bertollo, 1983). Atualmente, muitas outras espécies de peixes têm evidenciado cromossomos B em seus cariótipos (Néo et al., 2000; Ferro et al., 2003).

Em peixes da região neotropical, os cromossomos B têm sido encontrados em 61 espécies, distribuídos em 16 famílias de 7 ordens diferentes e distintas bacias hidrográficas. A ordem Characiformes é a que apresenta o maior número de espécies com estes cromossomos, incluindo 31 espécies das famílias

Anostomidae, Characidae, Grenuchidae, Curimatidae, Prodontidae e Prochilodontidae (Carvalho et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram analisados espécimes de *Astyanax scabripinis*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus* (Quadro 1) do Rio São Francisco, cidade de Toledo, Paraná (Figura 1). Os exemplares foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70%.

3.2. Métodos

3.2.1. Indução de mitoses

Para aumentar o índice de células em divisão foi utilizada a técnica descrita por Cavallini e Bertolo (1988) com algumas modificações. Esta técnica consiste na aplicação subcutânea da solução de leveduras (0,5g de fermento biológico + 1,5g de dextrose + 6ml 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.

3.2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células extraídas do rim, segundo a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978) com algumas modificações. O procedimento consiste em:

1. Injetar intraperitonealmente colchicina (0,05%) na proporção de 1ml para cada 100g do peso do animal.
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado, por 30 minutos.
3. Sacrificar o animal com tesoura, retirando o rim, e quando necessário as brânquias.
4. Colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo 10ml de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M.
5. Fragmentar bem o material com o auxílio de pinças de dissecação, completando o processo com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, para se obter uma suspensão celular homogênea.

6. Colocar a suspensão obtida a 37°C, em estufa, durante 25 minutos.
7. Retirar da estufa, ressuspender o material com o auxílio de pipeta Pasteur, transferir a solução para um tubo de centrifuga e adicionar 6 gotas de fixador (Metanol:Ácido Acético, na proporção de 3:1).
8. Centrifugar durante 9 minutos a 900rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
9. Adicionar, cuidadosamente, 10ml de fixador. deixando-o escorrer através da parede do tubo.
10. Ressuspender o material, cuidadosamente, com o auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a 900rpm.
11. Repetir os itens 9 e 10 por mais duas vezes
12. Após a última centrifugação, retirar o sobrenadante e adicionar 2ml de fixador, levando a solução para um frasco plástico do tipo Ependorff.
13. Pingar o material em lâmina quente ou gelada, aquecê-la a 70°C e deixar secar ao ar.
14. Corar com Giemsa 5%, por 15 minutos.
15. Lavar em água corrente, deixar secar ao ar e, em seguida, analisar a lâmina em microscópio.

3.2.3. Bandeamento Cromossômico

3.2.3.1. Bandeamento C

Para o estudo da heterocromatina constitutiva. foi utilizada a técnica de Summer (1972) por meio do bandeamento C, com algumas modificações, seguindo os procedimentos abaixo:

1. Tratar a lâmina já contendo o material para análise com HCl em temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Lavar a lâmina em água deionizada e deixar secar ao ar.
3. Incubar em solução salina de 2xSSC a 60°C em banho-maria por 15 minutos.
4. Lavar em água deionizada e deixar secar ao ar.
5. Incubar a lâmina por 30 segundos em solução de hidróxido de bário (BaOH), aquecida em banho-maria a 42°C, com o BaOH sendo recém preparado e filtrado.

6. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, depois em água deionizada e deixar secar ao ar.
7. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora.
8. Lavar em água deionizada e deixar secar ao ar.
9. Corar com Giemsa 5% durante 10 minutos.
10. Lavar em água deionizada, deixar secar ao ar e analisar a lâmina em microscópio.

3.2.3.2. Regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)

A detecção das regiões organizadoras de nucléolo com uso de nitrato de prata (AgNO₃) seguirá a metodologia descrita por Howell e Black (1980), com algumas modificações:

1. Hidrolisar a lâmina já contendo o material para análise em HCl 1N a 60°C, por 3 minutos.
2. Lavar em água deionizada e deixar secar ao ar;
3. Pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina e sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada.
4. Adicionar sobre as gotas anteriores duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO₃) e cobrir a lâmina com lamínula.
5. Incubar em estufa a 60°C por um período de 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada.
6. Lavar em água corrente, deixar secar ao ar e analisar a lâmina em microscópio.

3.2.4. Identificação dos cromossomos

Quadro 1 - Espécies coletadas no Rio São Francisco, da cidade de Toledo-Pr, e submetidas a análises citogenéticas.

Espécies	Macho	Fêmea	Total
<i>Astyanax scabripinnis</i>			
Citótipo I	11	14	25
Citótipo II	1	2	3
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	8	7	15
<i>Prochilodus lineatus</i>	4	6	10

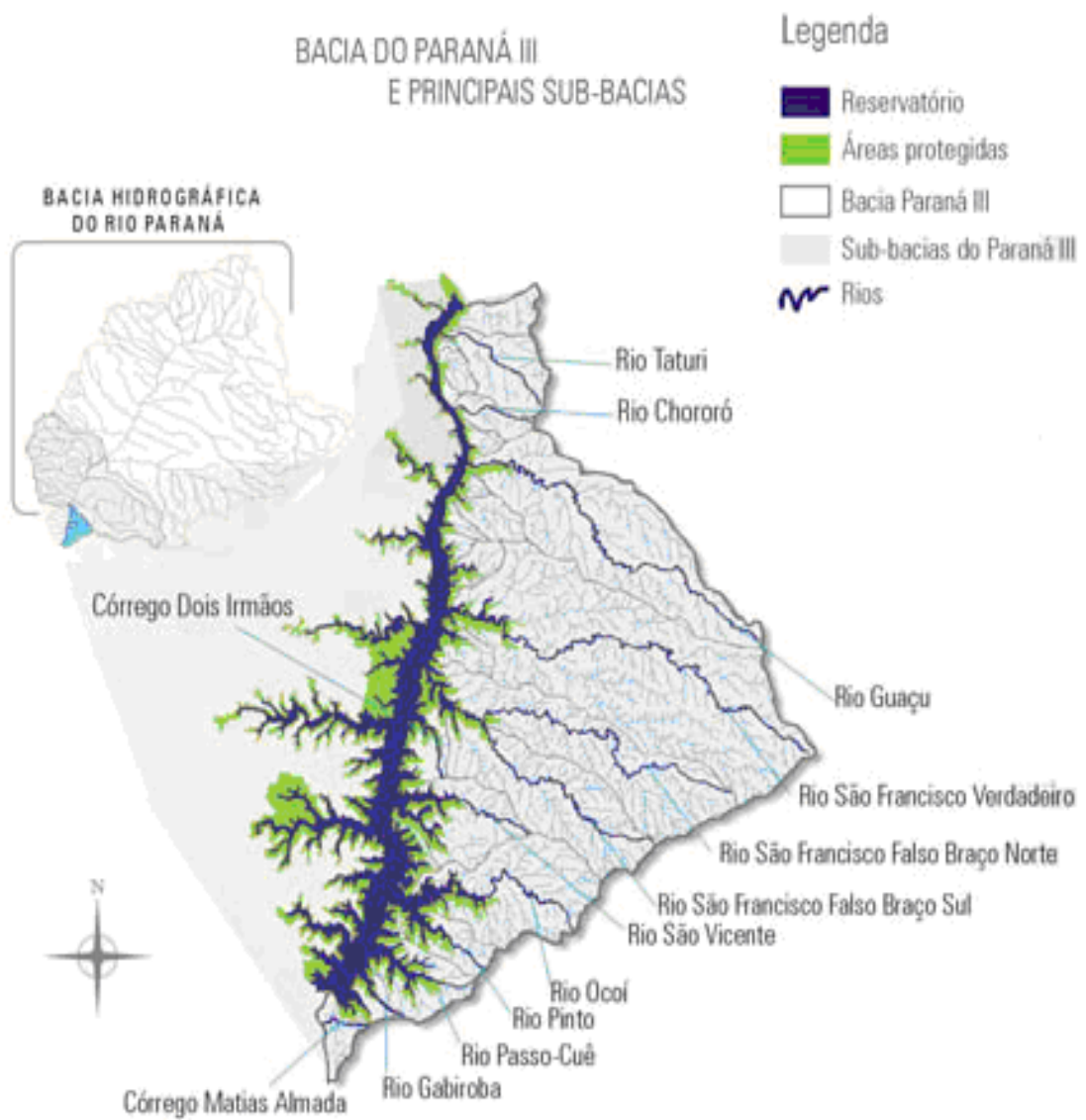


Figura 1 - Bacia do Rio Paraná mostrando seus afluentes, dentre eles o Rio São Francisco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou três espécies da ordem Characiformes do rio São Francisco: *Astyanax scabripinnis*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*.

Astyanax scabripinnis

Para a espécie de *A. scabripinnis* foram analisados 28 indivíduos que mostraram a presença de dois números diplóides diferentes, sendo 25 espécimens com $2n = 50$ cromossomos, denominados de citótipo I (Figura 2a), e 3 espécimens com $2n = 48$ cromossomos, denominados de citótipo II (Figura 3a). Os dois citótipos foram observados vivendo em simpatria e sintopia sem a presença de híbridos intermediários, caracterizando um isolamento reprodutivo e indicando tratarem de espécies diferentes. Estudos citogenéticos nesta espécie têm mostrado variabilidade cromossômica em relação ao número diplóide com $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$ cromossomos, tanto em diferentes populações (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Moreli et al., 1983; Mantovani et al., 2000), como em populações simpátricas e sintópicas (Fernandes e Martins Santos, 2005; presente trabalho), corroborando, assim, a hipótese sugerida por Moreira-Filho e Bertollo (1991) da existência de um complexo de espécie para o “grupo scabripinnis”.

A análise cariotípica dos indivíduos com citótipo I mostrou, para machos e fêmeas, número diplóide de $2n = 50$ cromossomos distribuídos em 10 metacêntricos, 20 submetacêntricos, 8 subtlocêntricos e 12 acrocêntricos e com número fundamental (NF) igual a 88 (Figura 2a). Cariótipos com $2n = 50$ cromossomos correspondem à maioria das populações de *A. scabripinnis* estudadas e as do presente trabalho se assemelham em especial aquelas do rio Paranapanema (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2000), ribeirão Maringá (Abeline, 2007) e córrego Tagaçaba (Abeline, 2007), os quais apresentaram 5 pares de metacêntricos e mesmo número fundamental, diferindo apenas no número de submeta-acrocêntrico.

A análise citogenética de diferentes populações desta espécie tem mostrado variabilidade cariotípica mesmo entre as populações de mesmo número

diplóide. Portanto, além da diversidade cariotípica envolvendo número diplóide, pode-se também observar variações de fórmula cariotípica, número fundamental, número e localização da NOR e padrão de banda C. Embora muitas das diferenças de classificação de cromossomos possam ser atribuídas a erros de medidas, algumas indicam, pelo número de acrocêntrico e após bandeamentos cromossômicos, serem diferenças efetivas entre as populações.

A análise do padrão de banda C para o citótipo I (Figura 2b) mostrou fortes marcações centroméricas e teloméricas em todos os cromossomos, diferindo do padrão geral de *A. scabripinnis*, os quais apresentam blocos conspícuos de heterocromatina localizados em regiões teloméricas de cromossomos subtelo-acrocêntricos. O primeiro par do complemento apresentou blocos heterocromáticos em ambos os telômeros e uma banda intersticial em cada um dos braços. Banda intersticial também foi observada nos pares 17, 20 e 24.

A região organizadora do nucléolo apresentou-se localizada em 3 pares de cromossomos: na região do braço curto de um par de submetacêntrico (provavelmente o par 12) e de um subtlocêntrico e região telomérica do braço longo de um dos maiores acrocêntricos (Figura 4a). NOR múltipla tem sido observada na maioria dos Characidae e do “complexo scabripinnis”.

Os espécimens com o citótipo II apresentaram, em ambos os sexos, $2n = 48$ cromossomos, com fórmula cariotípica de $11m + 18sm + 9st + 10a$ e $NF = 86$ (Figura 3a). Todos os indivíduos deste citótipo apresentaram um par heteromórfico, sendo um metacêntrico semelhante ao par 2 e um subtlocêntrico semelhante ao par 18. Além disso, nos 3 indivíduos foram observadas algumas células com $2n = 49$ cromossomos, sendo o cromossomo extra um acrocêntrico menor que o último do complemento (Figura 3b).

Fernandes e Martins-Santos (2005) também observaram em uma população do riacho Tatupeba três citótipos simpátricos com números diplóides diferentes ($2n = 50$, $2n = 48$ e $2n = 46 + 2B$). O citótipo com $2n = 46 + 2B$ cromossomos apresentou, em todos os indivíduos (machos e fêmeas), um par heteromórfico adicional, composto de um metacêntrico grande (semelhante ao primeiro par) e um acrocêntrico pequeno. Este par, após bandeamento C, apresentou-se parcialmente heterocromático, sendo o metacêntrico semelhante em padrão a macrocromossomos B observados nas populações de $2n = 50$

cromossomos de Campos de Jordão (Vicente et al., 1996) e Maringá (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997), o que levou os autores a caracterizá-lo como cromossomo B.

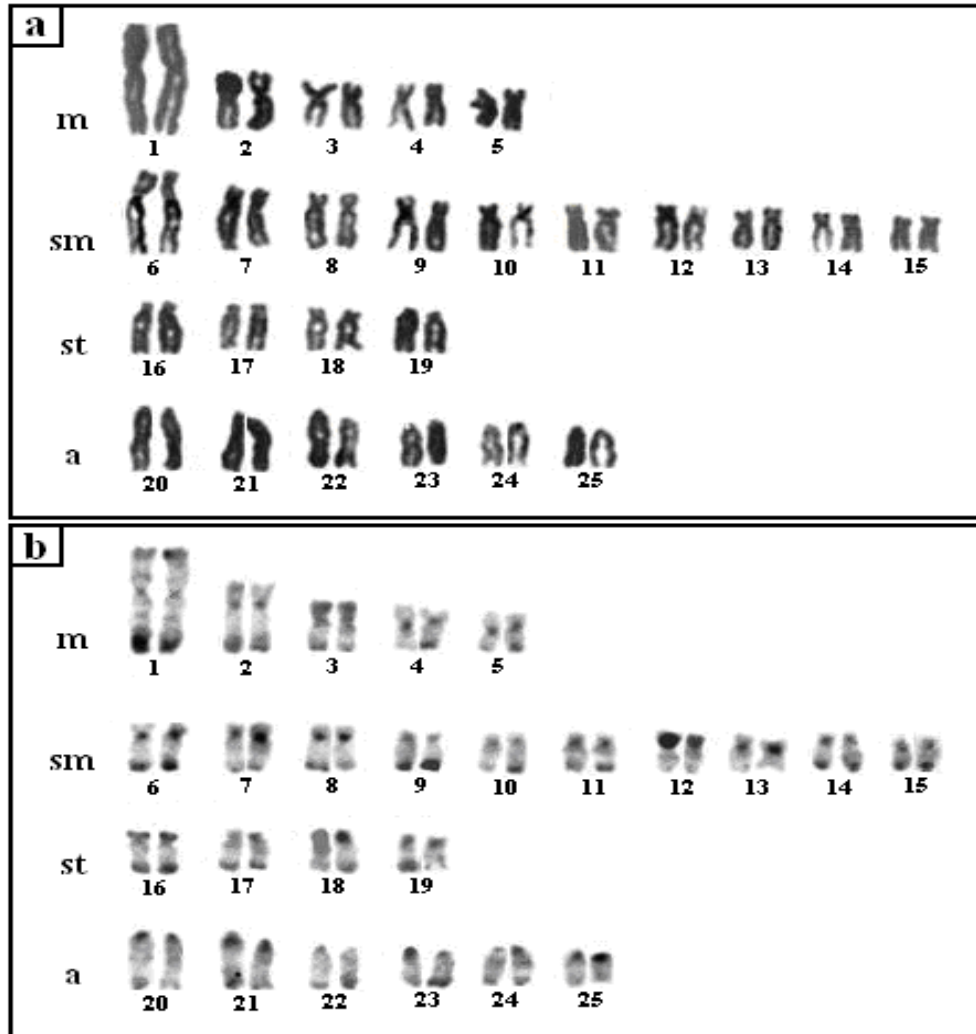


Figura 2 - (a) Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com citótipo I ($2n = 50$ cromossomos) submetido à coloração convencional de Giemsa. (b) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva da população de *Astyanax scabripinnis* com citótipo I.

Diferentemente da população de Tatupeba, o par heteromórfico do citótipo II no presente trabalho é semelhante ao segundo par do complemento e não apresentaram padrão de banda C que pudessem caracterizá-los como cromossomos B. O metacêntrico do par heteromórfico mostrou banda heterocromática apenas na região centromérica, semelhante ao segundo par do complemento A. Neste citótipo as regiões heterocromáticas mostraram marcações centroméricas na maioria dos cromossomos e teloméricas em apenas

alguns (Figura 3c), diferindo do padrão de banda C encontrado no citótipo III da população de Tatuteba (Fernandes e Martins-Santos, 2005). Este padrão também difere do observado no citótipo I simpátrico analisado no presente trabalho.

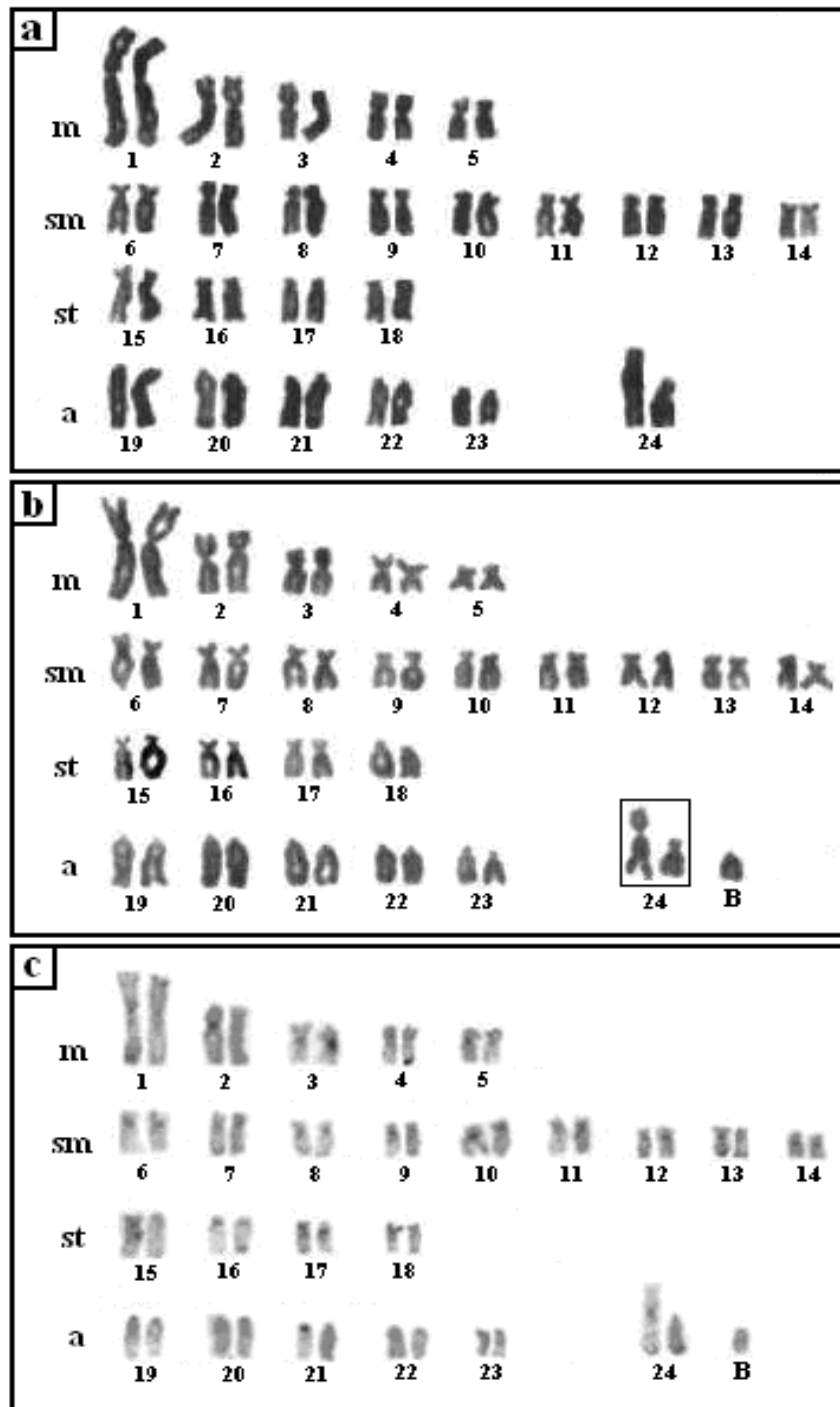


Figura 3 - (a) Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com citótipo II ($2n = 48$ cromossomos) submetido à coloração convencional de Giemsa. (b) Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com citótipo II ($2n = 48 + 1$ cromossomos) submetido à coloração convencional de Giemsa. (c) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva da população de *Astyanax scabripinnis* com citótipo II.

Em relação à região organizadora do nucléolo, os dois citótipos apresentaram NORs múltiplas com 5 cromossomos marcados, indicando a presença de 3 pares organizadores nucleolares, porém localizados em posição e cromossomos diferentes. No citótipo II, as marcações foram observadas no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, no braço curto de um par de cromossomos subteloicêntricos e no braço longo de um cromossomo subteloicêntrico (Figura 4a e 4b).

Desta forma, os dois citótipos simpátricos analisados mostram diferenças não só de número diplóide, mas também em relação aos padrões de bandeamentos C e NOR. Uma análise populacional mais detalhada, utilizando outros tipos de análises, deve elucidar melhor o cariótipo do citótipo II ($2n = 48$ ou $2n = 46 + 2B$). Um aumento da amostra desta população poderá indicar, inclusive, se o par heteromórfico, no caso de serem B, pode ser considerado como integrado ao genoma, uma vez que, tanto na população do Tatupeba (citada como citótipo III) como na do São Francisco (citada como citótipo II), os poucos indivíduos analisados, machos e fêmeas, apresentavam dois cromossomos heteromórficos em tamanho, em 100% das células analisadas.

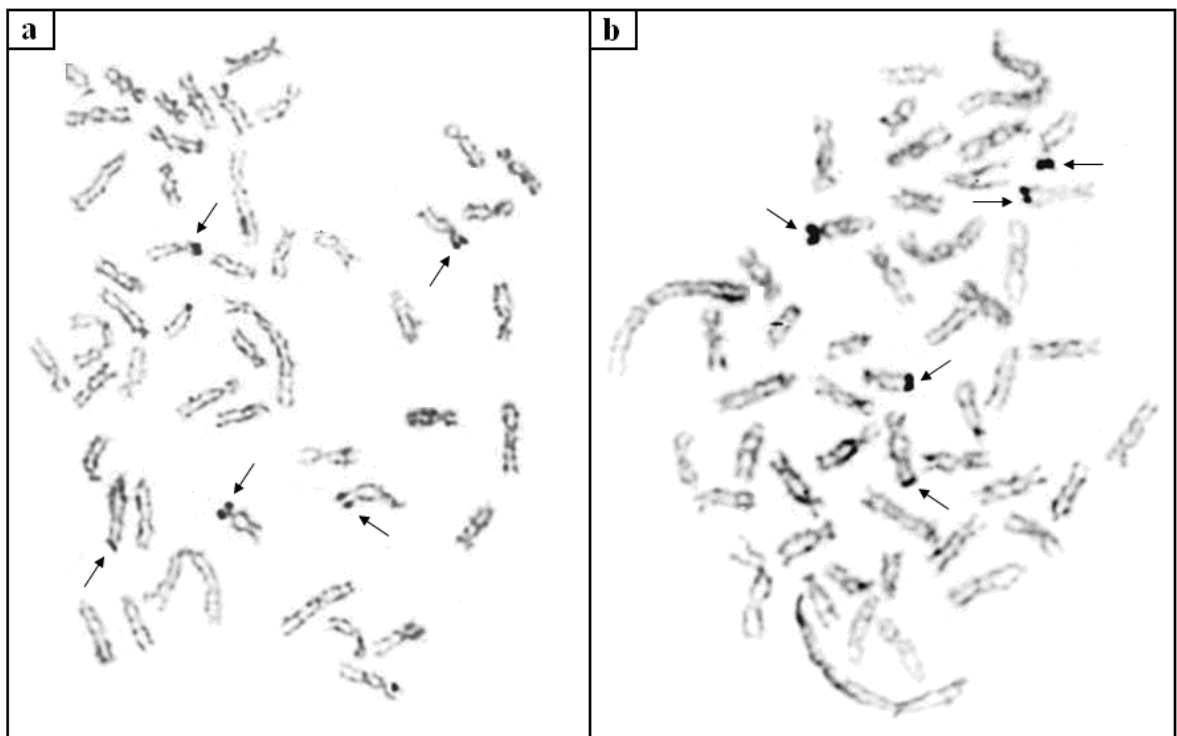


Figura 4 - (a) Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com citótipo I submetido à coloração por nitrato de prata – Ag-NORs. (b) Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com citótipo II submetido à coloração por nitrato de prata – Ag-NORs.

Piaractus mesopotamicus

A análise dos 15 espécimens de *Piaractus mesopotamicus* (8 machos e 7 fêmeas) mostrou um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos, sendo 36 metacêntricos e 18 submetacêntricos, com $NF = 108$ (figura 5a). Estes dados diferiram em relação aos de Almeida-Toledo et al. (1988) que mostraram 20 metacêntricos e 34 submetacêntricos para a população de Pirassununga. Contudo, estas diferenças de fórmula cariotípica entre as duas populações da mesma espécie podem não representar diferenças efetivas, mas sim de classificação dos cromossomos.

O gênero *Piaractus* é representado por duas espécies reconhecidas como válidas (*P. brachypomus*, *P. mesopotamicus*), sendo extremamente difícil de serem identificadas. Estudos citogenéticos destas espécies mostram mesmo número diplóide de $2n = 54$ cromossomos, todos m/sm. *P. brachypomus* apresenta fórmula cariotípica de $34m + 20sm$ (Nakayama et al., 1990) e, portanto, muito semelhante ao cariótipo de *P. mesopotamicus*. Diante disso, a análise cariotípica pela técnica convencional com Giemsa não constitui bom marcador para distinção das mesmas.

A população analisada no presente trabalho mostrou para 3 indivíduos, correspondendo a 20% da população, uma variação de $2n = 54$ a 56 cromossomos (Figura 6b), devido à presença de 1 a 2 pequenos cromossomos acrocêntricos, os menores do complemento, caracterizados como cromossomos B devido à variação intra e interindividual e o caráter heterocromático, observado após bandejamento C (Quadro 2). Sendo assim, este é o primeiro relato de cromossomos B em populações de *Piaractus mesopotamicus*.

Segmentos heterocromáticos, detectados pelo bandejamento C, foram visualizados na região centromérica da maioria dos cromossomos, assim como em posição intersticial no braço longo dos pares 2 e 4, no braço curto do par 19 do cariótipo e em toda extensão do braço curto do par 27 (figura 5b). O padrão de banda C tem sido utilizado como marcadores úteis no diagnóstico dos conjuntos haplóides parentais nos produtos F1, tanto no “tambacu” como no “paqui”, com padrões distintos de bandas C entre os parentais que puderam ser reconhecidos nos híbridos interespecíficos (Almeida-Toledo et al., 1988). Da

mesma forma, pode-se considerar este como um caráter citotaxonômico de distinção de duas espécies do gênero *Piaractus*.

A região organizadora do nucléolo também tem sido usada como um caráter citotaxonômico na identificação de espécies (Amemiya e Gold, 1988). *P. mesopotamicus* mostrou até 6 cromossomos marcados pela prata em localizações que permitem inferir a presença de pelo menos quatro pares de cromossomos envolvidos com a região organizadora do nucléolo (Figura 6a). As marcações foram observadas na região terminal do braço curto de três pares de cromossomos submetacêntricos de tamanho diferentes (um deles provavelmente o par 27) e na região terminal de um dos braços de um metacêntrico (provavelmente o par 7). Nakayama et al. (1990) também observou em *P. brachypomus* organizadores nucleolares presentes em regiões terminais de 3 pares cromossomos m/sm, indicando que, em termos de marcadores, o bandeamento C parece ser mais eficiente como caractere citotaxonômico para o gênero.

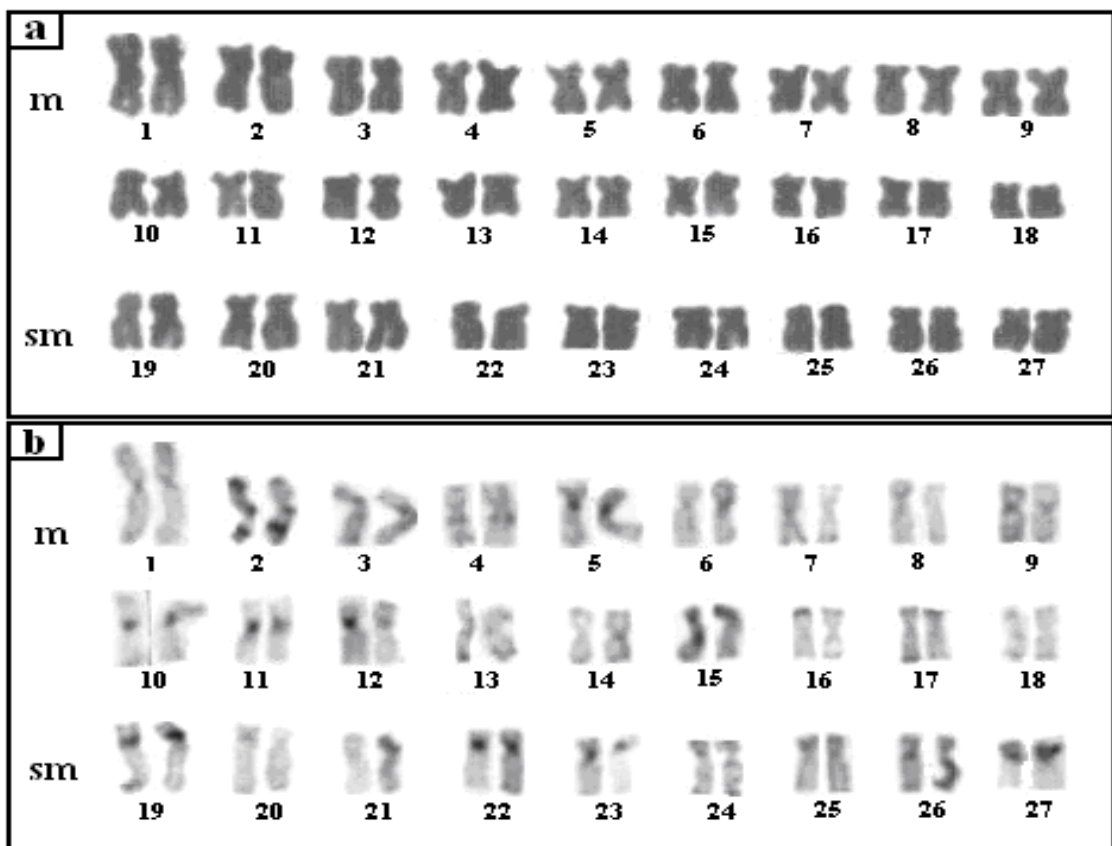


Figura 5 - (a) Cariótipo convencional de Giemsa e (b) Banda C da população de *Piaractus mesopotamicus*.

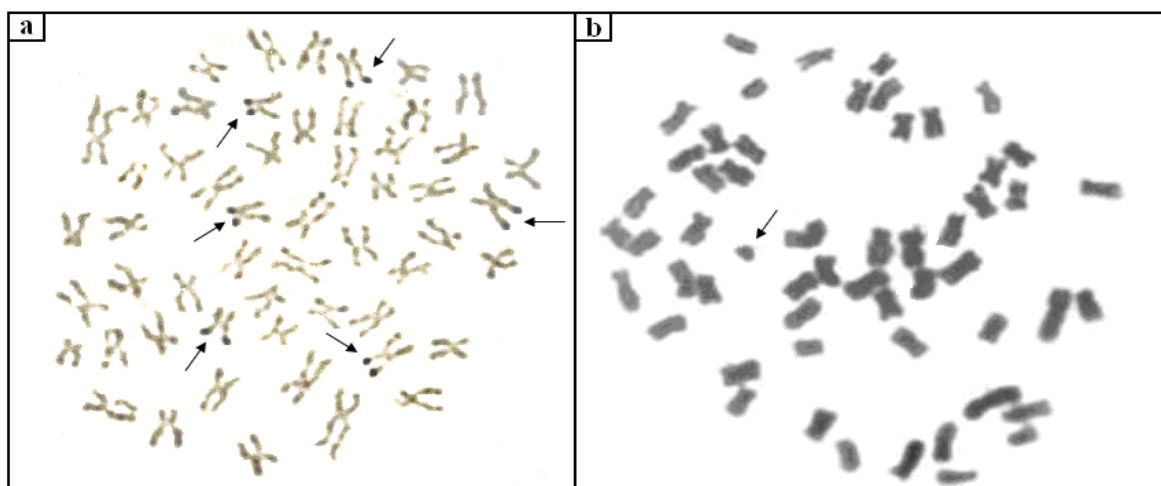


Figura 6 - (a) Localização das NORs em *Piaractus mesopotamicus* pela impregnação por nitrato de prata. (b) Metáfase somática de *Piaractus mesopotamicus* coradas por Giemsa mostrando um cromossomo acrocêntrico extra.

Quadro 2 - Variação intraindividual do número de cromossomos B por metáfase em *Piaractus mesopotamicus*

Indivíduos	Variação do número de cromossomos B			
	0B	1B	2B	Total
PAC-02	49	30	1	80
PAC-12	58	35	0	93
PAC-14	55	33	0	88

Prochilodus lineatus

Os indivíduos da espécie *P. lineatus*, tanto machos como fêmeas, apresentaram $2n = 54$ cromossomos distribuídos em 38 metacêntricos e 16 submetacêntricos e um número fundamental igual a 108 (figura 7a). Estudos citogenéticos têm mostrado que os prochilodontídeos apresentam um número diplóide constante, além de uma macroestrutura e uma morfologia cromossômica altamente conservativa. (Pauls e Bertollo, 1983; Dias et al., 1998; Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Grãs et al., 2007). Embora o gênero *Prochilodus* apresente uma estrutura cromossômica altamente conservada, algumas espécies apresentam uma variação no número relacionada com a ocorrência de cromossomos supranumerários.

Dos 10 indivíduos analisados, 2 deles apresentaram $2n = 55$ cromossomos, devido à presença de um cromossomo metacêntrico extra de tamanho pequeno observado em 100% das células analisadas (figura 7a), indicando uma alta estabilidade cariotípica.

Exceto para uma população do médio rio Paraná, Argentina (Gras et al., 2007), a presença de cromossomos B tem sido observada em todas as demais populações analisadas de *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Artoni et al., 2006), sendo que estes podem variar em número intra e interindividualmente.

Para a bacia do rio Mogi-Guaçu, três populações naturais mostraram variação intra e interindividual de 0 a 7 cromossomos B por célula. A frequência destes cromossomos nestas populações sugere uma instabilidade mitótica manifestada pela variação intraindividual de número, com frequência duplicada no período de 1979 a 1989 e, após, um decréscimo em amostras coletadas em 1991 e 1992, indicando um possível mecanismo de acúmulo e instabilidade causado pelo aumento de frequência nos 10 primeiros anos de invasão destes cromossomos (Pauls e Bertollo, 1983).

No presente trabalho, o cromossomo B de *P. lineatus* da bacia do Rio Paraná (rio São Francisco) apresentou alta estabilidade de cromossomos B, demonstrado pela ausência de variação intraindividual, com um único de Bs em todas as células, em 20% dos indivíduos. Portanto, nesta população, os cromossomos B parecem não ter apresentado o mesmo comportamento de acúmulo apresentado no período de invasão para as populações da bacia do rio Mogi-Guaçu – 1979-80 e 1987-89 (Pauls e Bertollo, 1983; Cavallaro, 1992). Oliveira et al. (1996), analisando estes cromossomos no período de 1991-92, não observaram diferenças significativas no número médio de Bs em relação ao de 1979-80 e 1987-89. Isso indica que os mesmos devem ter atingido o seu grau máximo de estabilidade mitótica.

Artoni et al. (2006), analisando populações de *P. lineatus* da Lagoa Dourada (bacia do rio Tibagi) e do rio Mogi-Guaçu, mostraram que ambas as populações puderam ser diferenciadas pelo número de Bs (0 a 3 e 0 a 7 cromossomos B, respectivamente) e presença de variantes de tipos de Bs (metacêntrico e submetacêntrico pequenos) na população do rio Mogi-Guaçu, sugerindo caminhos evolucionários diferentes entre populações distintas. Os

resultados do presente trabalho corroboram com esta proposição, uma vez que o cromossomo B encontrado difere das demais populações por apresentar alta estabilidade intraindividual e por se apresentar único.

Pouco se sabe ainda sobre a origem destes cromossomos em populações de *Prochilodus lineatus*. Maistro et al. (2000), ao analisar os complementos A e B em *Prochilodus lineatus*, depois de digeridos por endonucleases, mostraram que a composição destes cromossomos é diferente, podendo indicar que a origem dos cromossomos B nesta espécie não é um evento recente e teve tempo suficiente para acumular algumas modificações na sua estrutura durante a evolução. Contudo, analisando 2 famílias de DNA repetitivos de *P. lineatus* (SATH1 e SATH2), Jesus et al. (2003) mostraram similaridade na composição molecular entre os cromossomos do complemento A e cromossomos B em relação a SATH1 e divergência em relação a SATH2, confirmando, portanto, a possível origem a partir de elementos do complemento padrão desta espécie, com diversificação durante o processo de fixação, indicando um evento não recente. A partir destes dados, estes autores propõem uma origem através de isocromossomos e/ou através da não-disjunção com posterior modificação estrutural.

O padrão de banda C das populações analisadas mostrou blocos de heterocromatina bem evidentes, presentes nas regiões centroméricas, o que é comumente encontrado em peixes desta espécie (Pauls e Bertollo, 1983; Cavallaro et al., 2000; Maistro et al., 2000; Artoni et al., 2006). Além destes blocos, foram observadas marcações intersticiais em um cromossomo metacêntrico e em 1 dos braços dos pares 8, 9 e 10. Contudo, estas últimas apresentaram-se mais pálidas, podendo indicar diferenças na composição de bases das mesmas (figura 7b). O cromossomo B mostrou-se totalmente heterocromático, como já observado anteriormente por Cavallaro et al. (2000) e Maistro et al. (2000).

O estudo das regiões organizadoras do nucléolo (NORs) marcadas pela prata revelou um sistema de NORs múltiplas com 2 a 4 marcações, presentes na região intersticial do braço longo de um par de cromossomos metacêntricos (provavelmente o par 2), em todas as células analisadas e em outros dois cromossomos não homólogos, 1 metacêntrico e 1 submetacêntrico, nem sempre presentes (em destaque na figura 7). Ag-NORs simples localizadas

intersticialmente no braço longo de um par de cromossomos metacêntrico de tamanho médio é uma condição comumente encontrada em *Prochilodus lineatus* (Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006). Além da presença constante desta marcação, diferenças posicionais de NORs também foram relatadas anteriormente por Gras et al. (2007), na qual encontraram, pela impregnação por nitrato de prata e marcação por FISH, um único par com NOR, mostrando banda intersticial ou terminal em espécimens de *P. lineatus*.

Por meio da análise de FISH, Jesus e Moreira-Filho (2003) encontraram variações em relação à localização, ao tamanho e ao número de regiões de rDNA 18S em populações de *Prochilodus lineatus*. Aliados aos dados obtidos de outras espécies do gênero *Prochilodus*, estes mesmos autores sugeriram que, apesar da macroestrutura cariotípica deste grupo ser altamente conservativa, diferenças em termos de localização de seqüências ribossomais podem ser observadas entre as espécies.

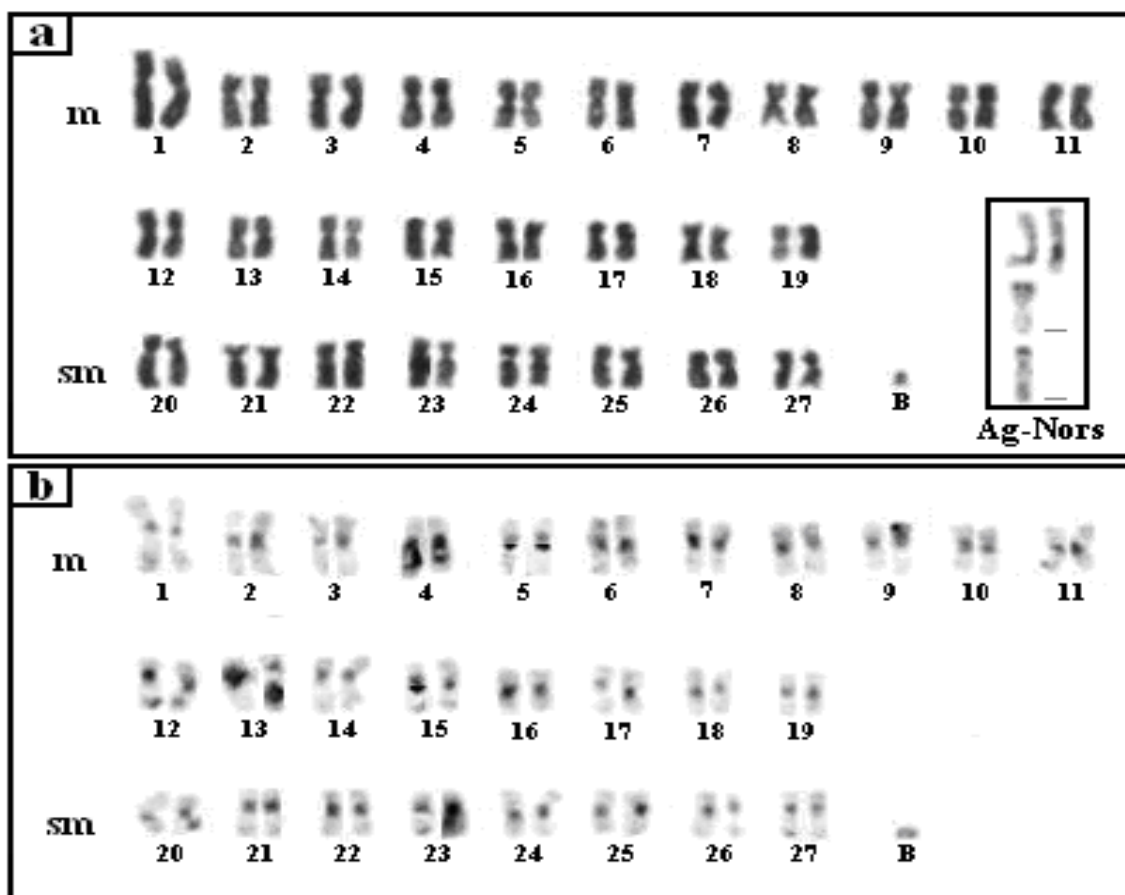


Figura 7 - Cariótipos convencionais de Giemsa (a), banda C (b) e NOR (em destaque) da população de *Prochilodus lineatus*.

Um heteromorfismo no tamanho das NORs também foi identificado no presente trabalho, e este tem sido frequentemente encontrado em populações de *Prochilodus lineatus* (Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003).

A família Prochilodontidae é um grupo cariotipicamente homogêneo e seus membros raramente divergem em relação ao cariótipo, mesmo que apresentem uma ampla distribuição geográfica. Porém, o conservadorismo nesta família vem sendo acompanhado por rearranjos microestruturais, evidenciados por padrões de bandas C e NORs (Gras et al., 2007).

Os Prochilodontidae e os gêneros *Piaractus* e *Colossoma*, dentre as espécies de Characidae, têm mostrado mesmo número diplóide de $2n = 54$ cromossomos, todos do tipo meta-submetacêntricos, indicando grande proximidade entre estes grupos. Os Characiformes apresentam um grande número de espécies com $2n = 54$ cromossomos, indicando ser este o número diplóide ancestral desta ordem (Oliveira et al., 1988), evidenciando que este número diplóide pode ser uma característica conservada deste grupo.

5. CONCLUSÃO

- 1) Os dados apresentados no presente trabalho indicam, dentro da ordem Characiformes, grupos com alta variabilidade cariotípica, como é o caso de alguns membros da família Characidae; e grupos cariotipicamente homogêneos, como é o caso dos membros pertencentes à família Prochilodontidae.
- 2) A população de *Astyanax scabripinnis* analisada mostrou a existência de dois citótipos diferentes vivendo em simpatria e sintopia. A ausência de híbridos intermediários mostra um isolamento reprodutivo, indicando tratar-se de espécies diferentes e, portanto, corrobora com a existência de um complexo de espécies.
- 3) *Piaractus mesopotamicus* apresentaram número cromossômico de $2n = 54$ cromossomos, todos m/sm, como já demonstrado em outras populações analisadas do mesmo gênero. Portanto, em nível de número diplóide e fórmula cariotípica, estas características não têm sido consideradas como bons caracteres citotaxonômicos, uma vez que apresentam muita semelhança com *Piaractus brachypomus*.
- 4) Os resultados apresentados para as populações de *Prochilodus lineatus* evidenciam a presença de uma alta estabilidade cariotípica, que vem sendo acompanhada por alguns rearranjos microestruturais, detectados por bandeamento C e Ag-NORs, ao longo da evolução desta espécie.
- 5) A alta estabilidade intraindividual de cromossomo B em *Prochilodus* contrasta com a instabilidade mitótica deste cromossomo em *Piaractus*. Este aspecto, aliado ao fato desta ter sido a única população do gênero *Piaractus* em que se observaram estes cromossomos, indica que o aparecimento deste último é mais recente.
- 6) O mesmo número diplóide ($2n = 54$ cromossomos m/sm) dos gêneros *Piaractus* e *Prochilodus* indica uma proximidade cariotípica entre estes dois grupos.
- 7) O padrão de banda C indicou ser um caráter citotaxonômico mais eficiente na distinção de espécie, em especial no gênero *Piaractus*.
- 8) As três espécies estudadas apresentaram NOR múltipla, sendo este sistema característica comum das famílias Characidae e Prochilodontidae.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELINI, E. Análise **Citogenética em três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characiformes)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; RAMOS, S.M.; ORMANEZI, R.; CAROLSFELD, V. I.S.; TOLEDO-FILHO, S.A. Estudos citogenéticos de híbridos entre fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Cepta**, 1:11-17,1988.

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.

AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. **Genética**, 76:81-90, 1988.

ARAÚJO, F.G.; CRUZ-FILHO, A.G.; AZEVEDO, M.C.C.; SANTOS, A.C.A. Estrutura da Comunidade de Peixes demersais da Baía de Sepetiba, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, 58:417-430, 1998.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; ENDLER, A.L.; CAVALLARO, Z.I.; JESUS, C.M.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genética**, 127:277-284, 2006.

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.

BÖHLKE, J.E.; WEITZMANN, S.H.; MENEZES, N.A. Estado atual da sistemática dos peixes de água-doce da América do Sul. **Acta Amazônica**, 8:657-677, 1978.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo - sistemática. In: **Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguay**. Poluição e Piscicultura, notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura. São Paulo: FSPUSP e Instituto de Pesca, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**, Brasília: Codevasf, 1986.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal**: manual de identificação. Brasília: Embrapa, 2007. 230p.

CANAN, B.; GURGEL, H.C.B. Estrutura populacional de *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915 (Characidae, Myleinae) da lagoa do Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte. **Revista Unimar**, 19:479-491, 1997.

CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L.B. Chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, 72:1907-1932, 2008.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. *Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the Rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 117:330-338, 2004.

CAVALLARO, Z.I. **Estudos sobre os cromossomos B de *Prochilodus scrofa* Steindachner (1881) (PISCES, PROCHILODONTIDAE) de diferentes localidades**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1992. 96p. (Dissertação de Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais).

CAVALLARO, Z.I.; BERTOLLO, L.A.C.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research**, 8:627-634, 2000.

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. Maringá, 1998. **Resumos...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1998, p. 32.

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, 2000.

DIAS, A.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Synapsis in supernumerary chromosome of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). **Caryologia**, 51:105-113, 1998.

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.

FELDBERG, G.E.; PORTO, J.I.R.; NAKAYAMA, C.M.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype evolution in *Curimatidae*(Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**, 36:372-376, 1993.

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

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. **Genética**, 124:301-306, 2005.

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

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 18, dezembro, 2008.

Géry, J. Poissons characoides des Guyanes: I. généralités, II. Famille des Serrasalminidae. **Zoologische Verhandelingen**, 122: 134-248, 1972.

GRAS, D.E.; BRASSESCO, M.S.; MARKARIANI, R.; RONCATI, H.A.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C. Cytogenetic polymorphism in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River. **Comparative Cytogenetics**, 1:113-119, 2007.

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 a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36:1014-1015, 1980.

JÉGU M. Characiformes: Characidae, Serrasalminae. In: KULLANDER. S.O.; FERRARIS. C.J.; REIS. R.E. (eds.). **Check-list of freshwater fishes from south and central america**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p. 182-196.

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

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, 56:281-287, 2003.

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

JONES, R.N.; REES, H. **B - Chromosomes**. New York: Academic Press, 1982. 266p.

KANTEK, D.L.Z. **Estudo citogenético comparativo entre populações de uma espécie de *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) endêmica do rio Iguçu**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005. 108p. Dissertação (Mestrado em Genética).

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais. São Paulo: EDUSP, 1999. 534p.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993. 158p. Tese (Doutorado em Biologia e Genética).

MACHADO-ALISSON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Pisces, Characiformes), parte II, discusión sobre la condición monofilética sobre la subfamilia. **Acta Biológica Venezuelica**, 11:45-194, 1983.

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

MAISTRO, E.L.; DIAS, A.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, 1994.

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, 1994.

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

MALACRIDA, A.C.C.; SHIBATA, 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: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES NEOTROPICAIS. Manaus, 2000. **Resumos**, Manaus: Universidade do Amazonas, 2000, p. 49.

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

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **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, 1998.

MOREIRA, C.R. **Relações Filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysii)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. 318p. Tese (Doutorado em Zoologia).

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a specie complex. **Brazilian Journal of Genetics**, 2:331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, 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-FILHO, O.; GALETTI JR, P.M.; BERTOLLO, L.A.C.B. Chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetraodonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, 106:230-234, 2004.

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

NAKAYAMA, C.W.; FELDBERG, E.; PORTO, J.R. Caracterização cromossômica em peixes da família Serrasalminidae: *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* (Myleinae). In: III SIMPÓSIO CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. Botucatu, 1990. **Resumos...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1990, p.23.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons, 2006. 601p.

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

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.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VI SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. São Carlos, 1996. **Resumos...** São Carlos: UFSC, 1996, p. 104.

OLIVERA, C.; SABOYA, S.M.R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; BERNARDINO, G. Increased B-chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, 79:473-476, 1997.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. Manaus: **Resumos...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2000, p. 24.

PARRA, W.J.G. **Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalmidae, Characiformes) da Amazônia Central.** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Universidade Federal do Amazonas, 2000. 116p. Tese (Doutorado em Genética).

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner (1881) (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36:307-314, 1983.

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

POST, A. Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen bei Susswasser Teleosteen. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, 3:47-93, 1965.

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

SCHUBART, A.C. Classificação dos estados sexuais do curimatá. **B. Min. Agric.**, 36:1-13, 1947.

SHEEL, J.J.; **Fish chromosome and their evolution. Internal report of danmarks akvarium.** Charlottenlund: Denmark, 1973. 22p.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, 60:1-11, 1995.

SOUZA, V.L. **Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no crescimento e metabolismo energético de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887).** Jaboticabal: Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, 1998. 118p. Tese (Doutorado em Aqüicultura).

SONEGATTI, O. **Planejamento Ambiental da Bacia do Rio São Francisco Verdadeiro–Paraná-Brasil.** Disponível em: <http://elistas.egrupos.net/lista/encuentrohumboldt/archivo/indice/2195/msg/2245/>. Acesso em: 12, março, 2009.

SUMMER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, 75:304-306, 1972.

UNESCO HELP PROGRAM. **Programa Hidrográfico Internacional: Bacia do Rio São Francisco Verdadeiro.** Disponível em: <http://saofrancisco.hidroinformatica.org/basin.html>. Acesso em: 12, março, 2009.

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

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 Cell Genetic**, 74:70-75, 1996.