

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo citogenético de espécies da subfamília  
Tetragonopterinae (PISCES, CHARACIDAE) da  
bacia do rio Paranaíba - Uberlândia, MG**

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

Uberlândia - MG

Julho -2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo citogenético de espécies da subfamília  
Tetragonopterinae (PISCES, CHARACIDAE) da  
bacia do rio Paranaíba - Uberlândia, MG**

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**Sandra Morelli**

**Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

Uberlândia - MG

Julho -2005

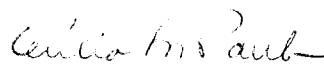
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo citogenético de espécies da subfamília  
Tetragonopterinae (PISCES, CHARACIDAE) da  
bacia do rio Paranaíba - Uberlândia, MG

LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli  
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas  
em 8/07/05



---

Cecília Lomônaco de Paula

Uberlândia - MG  
Julho -2005

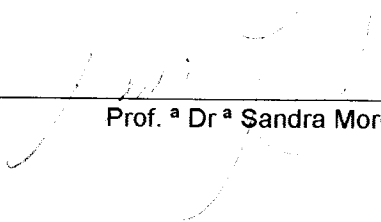
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo citogenético de espécies da subfamília  
Tetragonopterinae (PISCES, CHARACIDAE) da  
bacia do rio Paranaíba - Uberlândia, MG**


**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

Aprovado pela Banca Examinadora em   /  /  

Nota:   

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Sandra Morelli

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Msc Alessandra Ribeiro Torres-Mariano

  
\_\_\_\_\_  
Prof.º Dr Mário Antônio Spanó

Uberlândia, 6 de julho de 2005

Aos meus pais Bimbo e Lila e aos meus irmãos Felipe, Hugo, Mariana e Vitor, pelo carinho, confiança e apoio que sempre me dedicaram.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Morelli por acolher, orientar, sugerir, compreender, auxiliar, ter paciência e por me tratar com afeto, sempre me incentivando e tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo e por sempre terem me apoiado em todas as minhas decisões.

À Universidade Federal de Uberlândia, particularmente ao Instituto de Genética e Bioquímica.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal pela agradável convivência e companheirismo, em especial à Alessandra e ao Robson por auxiliarem, serem prestativos e acima de tudo amigos.

Ao José Clidenor dos Santos - Pé Trocado, pela colaboração nas coletas e pelos momentos de descontração.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Francisco Langeani pela identificação dos exemplares utilizados neste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Mário Antônio Spanó por aceitar ser Membro da Banca Examinadora.

Aos queridos Stela, Ritinha, Luísa, Letícia, Fábio Lucas, Alexandre e Léo por participarem de alguma forma da realização deste trabalho, compartilhando bons e maus momentos e tornando minha vida mais interessante.

Aos meus amigos e companheiros do curso de Biologia.

## RESUMO

Entre os peixes neotropicais a família Characidae é considerada a maior e mais complexa, representando o maior grupo de peixes de água doce, possuindo cerca de 170 gêneros e 885 espécies. Dentre as 30 subfamílias, Tetragonopterinae destaca-se por possuir o maior número de espécies no Brasil sendo o gênero *Bryconamericus* constituído por aproximadamente 30 a 40 espécies. Dentre os tetragonopteríneos mais freqüentes nos riachos do sudeste do Brasil encontram-se as espécies do gênero *Piabina*, que são amplamente distribuídas e devido a isto mais facilmente encontradas. As Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs), que são regiões do DNA responsáveis pela transcrição de RNA ribossômico são observados na família Characidae com dois padrões de distribuição, mas a ocorrência de sistema múltiplo parece ser característica do gênero *Bryconamericus*. Já no gênero *Piabina* há predominância de marcação pelo nitrato de Prata em um par de cromossomos A heterocromatina constitutiva é um interessante marcador cariotípico de DNA inativo, usada para caracterizar diversas variações nos cromossomos de peixes, sendo uma importante ferramenta para o entendimento da evolução cariotípica. O presente estudo visa caracterizar citogeneticamente populações de *Bryconamericus* sp e de *Piabina* de córregos pertencentes à bacia do rio Paranaíba (município de Uberlândia). Os cromossomos metafásicos foram obtidos através da técnica de preparação direta, corados com Giemsa, as localizações das Regiões Organizadoras de Nucléolos foram obtidas pelo método de impregnação com nitrato de Prata e a localização da heterocromatina constitutiva por Banda C. As análises citogenéticas em 10 exemplares (5 machos e 5 fêmeas) de *Bryconamericus* sp evidenciaram número diplóide de 52 cromossomos, sistema de NOR múltiplo com marcação na região telomérica do braço curto de um cromossomo submetacêntrico e a heterocromatina constitutiva distribuída nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos. Os exemplares de *Bryconamericus* sp apresentaram os cariótipos assimétricos, uma vez que se notou a presença de cromossomos de todos os tipos (metacêntrico, submetacêntrico, subteloentríco e acrocêntrico) e tamanhos, obtendo-se fórmulas cromossômicas com  $18M + 14SM + 12ST + 8A$  ou com  $16M + 14SM + 14ST + 8A$ . Esta variação nos citótipos dos indivíduos pode ser devido à diferença de condensação entre os cromossomos. Foi observada a presença de um exemplar do sexo masculino com um par heterólogo de cromossomos constituído por um cromossomo metacêntrico e um subteloentríco grande, tendo, portanto, fórmula cromossômica igual a  $19M + 14SM + 11ST + 8A$ . Os resultados obtidos confirmam o número diplóide de cromossomos, o padrão de NORs múltiplas e a heterocromatina constitutiva distribuída nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos de *Bryconamericus* sp. Em relação ao gênero *Piabina*, foram preparados e analisados 6 exemplares de *Piabina* (5 fêmeas e 1 macho) provenientes do córrego dos Caetano (Uberlândia, MG). O número cromossômico diplóide observado para o gênero foi de  $2n=52$  cromossomos para machos e fêmeas. As metafases analisadas evidenciaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subteloentrícos e acrocêntricos. O padrão de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos mostrou-se múltiplo, com duas a quatro marcações com nitrato de Prata, com a NOR detectada na região telomérica dos cromossomos. Por fim, o emprego da técnica de bandamento C permitiu a visualização de bandas heterocromáticas em regiões biteloméricas dos cromossomos de *Piabina*. Os resultados obtidos constituem dados interessantes para um maior entendimento da estrutura cariotípica destes gêneros e sua evolução dentro da subfamília Tetragonopterinae.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
1.1.	ASPECTOS GERAIS DA CITOGENÉTICA DE PEIXES .....	1
1.2.	CITOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA TETRAGONOPTERINAE .....	3
1.3.	MARCAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM PEIXES .....	4
2.	OBJETIVOS .....	7
2.1.	Objetivo Geral .....	7
2.2.	Objetivos Específicos .....	7
3.	JUSTIFICATIVA .....	8
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	9
4.1.	Material .....	9
4.2.	Metodologia .....	9
4.2.1.	Obtenção de cromossomos mitóticos .....	9
4.2.2.	Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) .....	11
4.2.3.	Detecção da Heterocromatina Constitutiva-Banda C .....	11
4.2.4.	Detecção da Heterocromatina Constitutiva modificada .....	12
4.2.5.	Medidas cromossômicas .....	12
4.2.6.	Montagem dos cariótipos .....	13
5.	RESULTADOS .....	14
5.1.	Gênero <i>Bryconamericus</i> .....	14
5.2.	Gênero <i>Piabina</i> .....	19
6.	DISCUSSÃO .....	21
6.1.	Gênero <i>Bryconamericus</i> .....	21
6.2.	Gênero <i>Piabina</i> .....	23
7.	CONCLUSÃO .....	25
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26



## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Número diplóide para exemplares de fêmeas de *Bryconamericus* sp..... 15
- **Figura 2.** Número diplóide para exemplares de machos de *Bryconamericus* sp..... 15
- **Figura 3.** Metáfase de macho (a) e de fêmea (b) de *Bryconamericus* sp com coloração Giemsa convencional; (c) Metáfase tratada com nitrato de Prata; (d) Metáfase de *Bryconamericus* sp evidenciando as regiões de heterocromatina constitutiva. .... 16
- **Figura 4.** Cariótipos de fêmea (a) e macho (b) de *Bryconamericus* sp..... 17
- **Figura 5.** Cariótipo de macho de *Bryconamericus* sp com heteromorfismo no primeiro par de cromossomos metacêntricos. Dois tipos de cromossomos não pareados são observados. .... 18
- **Figura 6.** Alteração cromossômica do tipo inversão pericêntrica observada em um indivíduo macho de *Bryconamericus* sp..... 18
- **Figura 7.** Número diplóide igual a 52 cromossomos para *Piabina*. sp..... 19
- **Figura 8.** Metáfase de *Piabina* com coloração Giemsa convencional (a); Metáfase de *Piabina* evidenciando as regiões de heterocromatina constitutiva (b); Metáfases de *Piabina* tratadas com nitrato de Prata (c) e (d). .... 20

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. ASPECTOS GERAIS DA CITOGENÉTICA DE PEIXES**

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988).

Cariótipo, por definição, é a descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie. Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie. As características mais evidentes do cariótipo são a posição do centrômero e o número e tamanho dos cromossomos (GUERRA, 1988).

O estudo cariotípico depende fundamentalmente da obtenção de boas preparações cromossômicas, onde os cromossomos podem ser contados, medidos e terem sua morfologia analisada. Durante o ciclo celular mitótico a cromatina se condensa e os cromossomos tornam-se visíveis ao microscópio na fase de metáfase em que os cromossomos atingem o grau máximo de condensação (LUCCA; ROCHA, 1992).

Através da determinação do número diplóide do cariótipo, morfologia dos cromossomos, padrão de heterocromatina constitutiva, de regiões organizadoras de nucléolos, enfim, padrões de bandamento, é possível caracterizar espécies e muitas vezes entender os mecanismos de evolução intra e interespecíficos (ARCHANGELO, 1996).

Os peixes constituem cerca de 50% das espécies de vertebrados existentes e a cada dia novas espécies estão sendo descritas (DENTON, 1973). Assim, são um dos grupos mais favoráveis para estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos por apresentarem uma série de características biológicas peculiares e por ocuparem uma posição central na evolução dos vertebrados (TOLEDO et al. 1978). A quantidade de estudos realizada nestas áreas tem crescido bastante nos últimos anos, mas os dados citogenéticos sobre a ictiofauna neotropical ainda são muito restritos (OLIVEIRA e FORESTI, 1994).

A citogenética de peixes neotropicais tem se desenvolvido de modo notável nas últimas décadas, embora os dados cromossômicos obtidos ainda sejam poucos frente à grande

variedade de espécies existentes (GUERRA, 1988). No Brasil, a maioria das referências de estudos citogenéticos de peixes é a partir da década de 70. Nas últimas décadas houve um desenvolvimento notável na citogenética de peixes neotropicais, sendo que até o presente momento são conhecidos os números diplóides e/ou haplóides de 921 espécies (113% a mais que em 1988), 252 gêneros (74% a mais que em 1988) (OLIVEIRA, 2000). Com a recente descoberta de novas técnicas foi possível o estudo mais detalhado da citogenética animal, ampliando o conhecimento do cariótipo dos peixes, cuja aplicabilidade se dá em estudos de evolução, sistemática, melhoramento genético e ecologia.

Diferenças e semelhanças entre os organismos passaram a ser vistas como os produtos da história evolutiva, ou filogenia. Uma das características que se pode utilizar para classificar os peixes de um gênero ou de uma família qualquer, com base na análise filogenética, por exemplo, é o padrão cariotípico, os tipos de cromossomos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico), o tamanho destes, os seus padrões de banda, enfim, pode-se fazer um “mapa cromossômico” de cada peixe e compará-los para relacioná-los com alguma linhagem da evolução das espécies do grupo em questão.

Os peixes, nos estudos realizados, apresentam grande variabilidade cromossômica referente ao número e tamanho (DENTON, 1973), não somente entre grupos taxonômicos básicos, podendo também ocorrer dentro de ordens, famílias, gêneros ou mesmo entre espécies (KIRPICHNIKOV, 1973).

Os peixes se apresentam como um grupo cariotipicamente diversificado, no qual o número diplóide conhecido varia de 12 a 250 cromossomos e os cariótipos podem apresentar desde um único tipo cromossômico até aqueles que possuem todos os tipos de cromossomos (KIRPICHNIKOV, 1981 apud FELDBERG, 1990).

A fauna de peixes neotropicais é constituída, principalmente, por grupos bastante numerosos de Characiformes, Siluriformes e Perciformes, (VENERE, 1998). A ordem Characiformes é o grupo dominante entre peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a maior e mais complexa desta ordem (BRITSKI et al. 1999).

A citogenética dos peixes Characiformes revelaram a ocorrência de grupos apresentando considerável evolução divergente dos cromossomos, enquanto outros grupos apresentaram uma maior conservação em sua macroestrutura (GALETTI JÚNIOR et. al. 1994). Entre os peixes que apresentaram transformações cariotípicas marcantes durante o processo de diversificação estão os caracídeos.

Considerando a posição filogenética dos peixes em relação aos demais vertebrados, o conhecimento mais detalhado a respeito da citogenética dos peixes poderá contribuir para o melhor entendimento de alguns aspectos da citogenética dos vertebrados de um modo geral.

## 1.2. CITOGÊNÉTICA DA SUBFAMÍLIA TETRAGONOPTERINAE

A família Characidae é o maior grupo de peixes de água doce da América do Sul, contendo cerca de 170 gêneros e 885 espécies (NELSON, 1994), sendo que o grande número de espécies que compreende esse grupo de peixes pode ser agrupado em 30 subfamílias, dentre elas a Tetragonopterinae. Os representantes da subfamília Tetragonopterinae são espécies de origens distintas, representando provavelmente um grupo não natural filogeneticamente (BRITSKI et al. 1986).

No Brasil, a subfamília Tetragonopterinae compreende a maioria das espécies e consiste de aproximadamente 50 gêneros e de 400 a 500 espécies. A maioria desses peixes é de pequeno porte e vive em ambientes variados, sendo na sua maioria onívoros, apresentando hábitos de forrageamento muito ativos e servindo de alimento para outros peixes (BRITSKI et al. 1986). Ocorrem desde a fronteira dos Estados Unidos com o México até a Argentina e são popularmente conhecidos no Brasil como lambaris ou piabas (BRITSKI, 1972).

Os tetragonopteríneos mais freqüentes nos riachos do sudeste Brasil são espécies dos gêneros *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Deuteron*, *Hollandichthys*, *Moenkhausia*, *Piabina*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (BUCKUP, 1999).

O gênero *Astyanax* é um dos mais numerosos da subfamília Tetragonopterinae e o mais estudado citogeneticamente. Apresenta vasta distribuição geográfica ocupando diferentes nichos em uma mesma bacia hidrográfica, resultando assim, em grande diversidade citogenética. O grupo apresenta grande variação cariotípica inter e intraespecífica e seu número diplóide varia de  $2n=36$  a  $2n=50$  (OLIVEIRA et al. 1988).

O gênero *Bryconamericus* é um dos menos diversificados da subfamília Tetragonopterinae, contendo de 30 a 40 espécies bastante similares entre si e distribuídas entre diferentes regiões da América Central e do Sul (GÉRY, 1977 apud PAINTNER-MARQUES et al. 2003).

Os cromossomos do gênero *Bryconamericus* são pouco conhecidos, bem como existem poucos estudos citogenéticos sobre esse grupo de peixes. A maioria das espécies de *Bryconamericus* analisada possui um número diplóide de 52 cromossomos (PORTELA et al.

1988; WASKO et al. 1996; CARVALHO et al. 1998; WASKO; GALETTI, 1999; PAINTNER-MARQUES et al. 2002a, 2002b, 2003).

Da mesma maneira, estudos citogenéticos em populações de *Piabina* são bastante escassos havendo um campo de pesquisa bem amplo a ser estudado neste gênero. O número diplóide de cromossomos descrito para *Piabina* é de 52 cromossomos (PORTELA et al. 1988; OLIVEIRA, 1994; CARVALHO et al. 1998).

Estudos citogenéticos na subfamília Tetragonopterinae, além de servir para trazer informações para o entendimento da evolução desse grupo de peixes, auxilia nos estudos e na revisão da sistemática animal.

### 1.3. MARCAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM PEIXES

Em relação aos padrões de marcação dos cromossomos de peixes, podem-se detectar as Regiões Organizadoras de Nucléolos bem como a distribuição de heterocromatina constitutiva.

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) são regiões do DNA responsáveis pela transcrição de RNA ribossômico e podem ser identificadas, de forma indireta, pela técnica de impregnação pelo nitrato de Prata, onde são coradas as proteínas residuais que permaneceram aderidas as NORs após as atividades transcricionais desta região para a formação do nucléolo (MILLER, 1977). Esta técnica é uma das mais empregadas em estudos de espécies de peixes neotropicais e tem sido observado que os padrões de AgNORs podem variar em número, localização, intensidade de coloração e tamanho, podendo ocorrer entre indivíduos de uma mesma espécie e mesmo entre células de um mesmo indivíduo (MOREIRA-FILHO, 1983).

O estudo das NORs, além de contribuir para o conhecimento da estrutura cromossômica, pode fornecer informação a respeito da atividade gênica dessas regiões, bem como possíveis alterações cromossômicas estruturais que tenham ocorrido ao longo da evolução das espécies.

Os peixes neotropicais podem apresentar dois padrões de distribuição de NORs: alguns grupos as NORs localizam-se em um único par de cromossomos (NORs simples), enquanto outros grupos apresentam NORs em vários cromossomos do cariótipo (NORs múltiplas).

Oliveira e Foresti (1994) citam 231 espécies de peixes com número e/ou localização das NORs, sendo que destas, 164 apresentaram NORs simples, 35 apresentaram dois pares de NORs, 32 apresentaram mais de dois pares de cromossomos contendo NORs.

Assim, de acordo com Gold (1984); Galleti et al. (1984); Moreira Filho, et al. (1984), a ocorrência de NORs simples tem se mostrado mais freqüente entre os peixes estudados. No entanto, dentre os grupos que apresentam NORs em mais de um cromossomo do cariótipo, estão algumas espécies da família Characidae.

No gênero *Astyanax* são encontradas populações com marcação em apenas um par cromossômico como em mais de um par de cromossomos. Esta variação pode ser observada em espécies da bacia do rio Paranaíba, como em *A. scabripinnis* e *A. bimaculatus* (ARAÚJO, 1999) que apresentaram NORs simples, e *A. altiparanae* e *A. fasciatus* que apresentaram NORs múltiplas (TORRES-MARIANO, 2001).

Na subfamília Tetragonopterinae, a análise das AgNORs em espécies de *Bryconamericus* estudados por Wasko et al. (1996), Wasko e Galetti, (1999) e Paintner-Marques et al. (2002b) indica ser este gênero um grupo de NORs múltiplas.

Já no gênero *Piabina* há predominância de marcação pelo nitrato de Prata em um par de cromossomos (PORTELA et al. 1988).

A evidenciação de regiões cromossômicas diferencialmente coradas devido à localização da heterocromatina fornece uma importante ferramenta para caracterização dos cromossomos dos peixes, além de fornecer informações sobre o mecanismo de evolução do cariótipo entre espécies próximas. A técnica de bandamento C permite a identificação de cromossomos particulares, revelando informações muito úteis para estudos taxonômicos e evolutivos (AMORES et al. 1993).

A heterocromatina constitutiva é um tipo de material genético que ocorre em porções homólogas do par cromossômico, estando inativa (BROWN, 1996 apud PIECZARKA e MATTEVI, 1998). Está diretamente relacionada às regiões do DNA que possuem seqüências altamente repetitivas, presentes geralmente nas NORs, centrômeros, telômeros e às vezes em algumas regiões intersticiais de alguns cromossomos.

Sumner (1990 apud MORELLI, 1998) comenta que as heterocromatinas variam pela localização cromossômica, composição e organização de seu DNA. Conseqüentemente, respondem de forma diversa a alguns métodos de coloração. Isto pode ser detectado não só em diferentes blocos, mas também dentro de um mesmo bloco heterocromático.

Os padrões de distribuição de heterocromatina são bastante variados no gênero *Astyanax*, uma vez que estão presentes desde regiões centroméricas e pericentroméricas em *A.*

*bimaculatos* a regiões teloméricas dos cromossomos de *A. fasciatus* (NÉO, 1999). Bandas heterocromáticas intersticiais, centroméricas e teloméricas foram observadas em um grande número de cromossomos de populações de *A. altiparanae* do Alto Paraná (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2004).

Da mesma forma, a distribuição de heterocromatina constitutiva é variável no gênero *Bryconamericus*. Estudos mostram que cromossomos tratados pelo bandejamento C apresentam blocos heterocromáticos em regiões centroméricas e teloméricas na maioria dos *Bryconamericus aff. iheringii* analisados (PAINTNER-MARQUES et al. 2003). Já Wasko e Galetti Jr. (1998), observaram blocos heterocromáticos nas regiões intersticiais, teloméricas e centroméricas em cinco populações de *Bryconamericus* sp e Portela-Castro (1999 apud PAINTNER-MARQUES et al. 2003) observou que esses blocos heterocromáticos se restringem às regiões centroméricas em praticamente todos os cromossomos das populações de *Bryconamericus* sp analisadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar citogeneticamente espécies da subfamília Tetragonopterinae. Tal estudo visa a contribuir para uma ampliação do conhecimento da citogenética desses peixes de água doce da região neotropical, especificamente, apresentando subsídios teóricos sobre a história evolutiva do grupo.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Estudar as características cromossômicas de populações do gênero *Bryconamericus* sp e do gênero *Piabina*, utilizando a coloração Giemsa convencional;
- Definir a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) nestes representantes da subfamília Tetragonopterinae através da técnica de impregnação pelo nitrato de Prata;
- Observar o padrão de distribuição de heterocromatinas constitutivas com técnica de Banda C em *Bryconamericus* sp e *Piabina*.



### 3. JUSTIFICATIVA

A classificação taxonômica animal baseada na filogenia não é apenas uma classificação informativa e útil, mas que também espelha as relações evolutivas entre os organismos.

Para que se obtenha sistematicamente um táxon natural é necessário que o grupo em questão seja monofilético, ou seja, o grupo deve possuir um ancestral comum recente e todos os seus descendentes (RAVEN, 1985). Embora esse ideal que resulta em grupos naturais soe de modo relativamente simples, freqüentemente torna-se difícil consegui-lo.

Em muitos casos os biólogos não têm conhecimento suficiente sobre a história evolutiva dos organismos para estabelecer táxons que sejam monofiléticos com um razoável grau de segurança.

Os Tetragonopterinae possuem parte de sua sistemática mal definida, representando um aglomerado polifilético (BUCKUP, 1999).

Ao se estudar a citogenética desses peixes, pode se fazer um levantamento do padrão cromossômico das espécies, dos tipos de cromossomos existentes e com isso estudar os possíveis modos da evolução cariotípica dentro da subfamília Tetragonopterinae.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

A coleta de 10 exemplares de *Bryconamericus* sp (5 fêmeas e 5 machos) e de 6 exemplares de *Piabina* (5 fêmeas e 1 macho) para a pesquisa foi feita em ocasiões diferentes do ano, respectivamente, no rio Araguari e no córrego dos Caetano, pertencentes à bacia do rio Paranaíba.

### 4.2. Metodologia

#### 4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

- Tratamento "in vitro"

Técnica descrita por Foresti et al. (1993):

1. Colocar rim cefálico (ou porções em regeneração de brânquias ou nadadeiras) em 6 ml de solução salina de Hanks em uma placa de Petri.
2. Dissociar bem o material
3. Retirar o sobrenatante com um pipeta Pauster, colocando o material em tubo de centrifuga.
4. Pingar uma gota de colchicina 0,025%
5. Pipetar mais ou menos 50 vezes
6. Levar o material à estufa (36°C) por 15 minutos
7. Centrifugar por 7 minutos a 500 rpm por minuto
8. Desprezar o sobrenatante e completar para 6 ml de cloreto de potássio (KCl)
9. Suspender novamente pipetando por mais 100 vezes
10. Levar novamente à estufa a 36°C por mais 20 minutos
11. Pingar 6 gotas de metanol-acético proporção 3:1
12. Pipetar devagar por mais 100 vezes
13. Deixar o material descansar por 5 minutos
14. Dobrar o volume com fixador e pipetar por mais 100 vezes
15. Centrifugar por 10 minutos
16. Desprezar o sobrenatante e completar para 6 ml com o fixador, pipetando por 100 vezes.
17. Centrifugar por 7 minutos, repetindo essa lavagem por duas vezes.
18. Diluir o material de forma a se obter uma suspensão não muito turva

19. Pingar o material nas lâminas que deverão estar previamente aquecidas em banho-maria a 64°C
20. Corar por 10 minutos com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8.

- Preparações diretas

Técnica de preparações diretas, adaptada por Bertollo (1978), para estudos cromossômicos em peixes, com pequenas mudanças:

1. Injetar, intra-peritonealmente, colchicina a 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal.
2. Deixar o peixe em um aquário bem aerado, por aproximadamente uma hora, sacrificando-o a seguir e retirando os órgãos desejados.
3. Lavar rapidamente um fragmento do órgão retirado (rim cefálico) em solução hipotônica de KCl 0,075M
4. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 6 ml de solução hipotônica de KCl a 0,075M.
5. Fragmentar bem o material, com auxílio de pinças de dissecação, completando-se este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando-se a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea.
6. Colocar a suspensão obtida a 36-37 °C, durante 20 minutos.
7. Suspender novamente o material com bastante cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferir a suspensão obtida para um tubo de centrifuga.
8. Acrescentar algumas gotas de fixador, recém preparado, (álcool metílico : ácido acético-3:1), suspender novamente o material e centrifugar por 10 minutos, a 700 rpm, descartando o sobrenatante com pipeta Pasteur
9. Adicionar, vagarosamente 5-7 ml de fixador recém preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo.
10. Suspender novamente o material, cuidadosamente, com auxílio da pipeta Pasteur.
11. Repetir os itens 8 a 10 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenatante, adicionar 1 ml de fixador e suspender novamente bem o material. Este poderá então ser guardado em geladeira, acondicionado em pequenos frascos tipo "ependorff", ou trabalhado conforme os seguintes passos.

12. Pingar 3-4 gotas da suspensão obtida, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e seca a 64 °C.
13. Deixar secar ao ar.
14. Corar com solução de Giemsa a 5%. Em tampão fosfato (pH=6,8), durante 10 minutos.
15. Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar.

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

Técnica descrita por Howell e Black (1980):

1. Pingar sobre a lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 ml para cada 100 ml de solução).
2. Adicionar, sobre a gota anterior, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%.
3. Misturar bem e cobrir com lamínula.
4. Incubar em estufa a 60°C, por um período de aproximadamente 7 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da lâmina e dos cromossomos, ao microscópio.
5. Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumem uma tonalidade amarelada e as NORs e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água.

#### **4.2.3. Detecção da Heterocromatina Constitutiva-Banda C**

Técnica descrita por Sumner (1972):

1. Tratar a lâmina contendo cromossomos mitóticos com uma solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.
2. Lavar em água deionizada e secar ao ar.
3. Submergir as lâminas numa cuba contendo solução de hidróxido de bário a 5% por 5 a 30 minutos, a 41°C.
4. Lavar em solução de HCl 0,2N.
5. Lavar em água deionizada e secar ao ar.
6. Incubar as lâminas numa solução salina 2xSSC, aquecida, por 1 hora a 60°C.
7. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

8. Corar com Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos.
9. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

#### **4.2.4. Detecção da Heterocromatina Constitutiva modificada**

Técnica descrita por Sumner (1972) com algumas modificações:

1. Tratar a lâmina contendo os cromossomos mitóticos com uma solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.
2. Lavar em água deionizada e secar ao ar.
3. Submergir as lâminas numa cuba com 2 x 2xSSC por 15 minutos.
4. Lavar e secar ao ar.
5. Submergir as lâminas em uma cuba com hidróxido de Bário a 5% por 30 minutos, a 41°C.
6. Lavar em solução de HCl 0,2N e em seguida em água deionizada e secar ao ar.
7. Incubar as lâminas numa solução salina de 2xSSC, aquecida por 45 minutos a 60°C.
8. Lavar em água deionizada e secar ao ar.
9. Corar com Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos.
10. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

#### **4.2.5. Medidas cromossômicas**

As melhores metáfases serão escolhidas para montagem final dos diferentes cariótipos, com a finalidade de determinar os tipos cromossômicos, seu tamanho e número fundamental (NF) de cada cariótipo. Assim, as melhores fotografias serão recortadas e os cromossomos organizados em ordem decrescente de tamanho, em seguida cada um será medido utilizando-se um compasso com duas pontas secas e um paquímetro. Cada segmento retilíneo de cada cromátide será transportado para uma folha branca ou papel milimetrado, através do compasso, até se compor o tamanho total da cromátide, este procedimento será utilizado para calcular a relação de braços (RB) e a morfologia de cada cromossomo será estabelecida.

#### **4.2.6. Montagem dos cariótipos**

As fotografias serão recortadas e os cromossomos dispostos em ordem decrescente de tamanho, combinando-se o ajuste visual e as medidas efetuadas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Gênero *Bryconamericus*

Foram preparados e analisados 10 exemplares de *Bryconamericus* sp (5 fêmeas e 5 machos) provenientes do rio Araguari (Uberlândia, MG).

O número cromossômico diplóide observado foi de  $2n=52$  cromossomos para machos e fêmeas (Figuras 1 e 2) de *Bryconamericus* sp. As metáfases analisadas apresentaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos (Figuras 3a e 3b).

No caso dos exemplares analisados do gênero *Bryconamericus*, o padrão de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos mostrou-se múltiplo com duas a quatro marcações com nitrato de Prata com a NOR detectada na região telomérica do braço curto de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos, como mostrado na Figura 3c.

O emprego da técnica de bandamento C permitiu a visualização de bandas heterocromáticas em regiões centroméricas e teloméricas de cromossomos de todos os tipos. Há presença de marcações bem evidentes e outras mais pálidas nos cromossomos analisados (Figura 3d).

No cariótipo os 52 cromossomos de *Bryconamericus* sp foram arranjados em ordem decrescente (Figuras 4a e 4b).

Um indivíduo macho apresentou em seu cariótipo um par heterólogo bastante evidente em todas as metáfases analisadas, formado por um cromossomo metacêntrico e um subtelocêntrico (Figura 5).

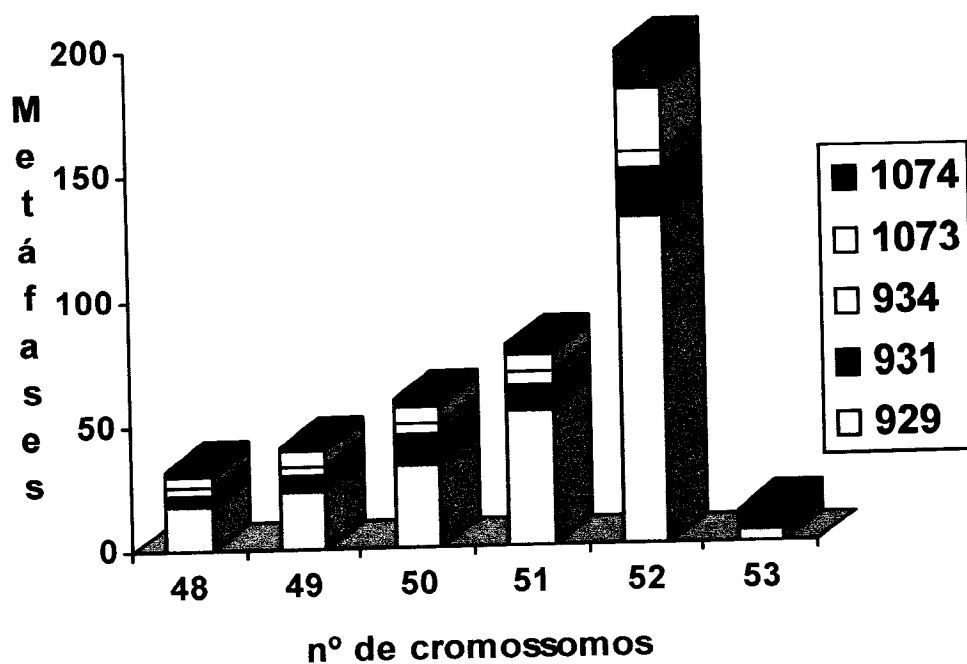


Figura 1. Número diplóide para exemplares de fêmeas de *Bryconamericus* sp.

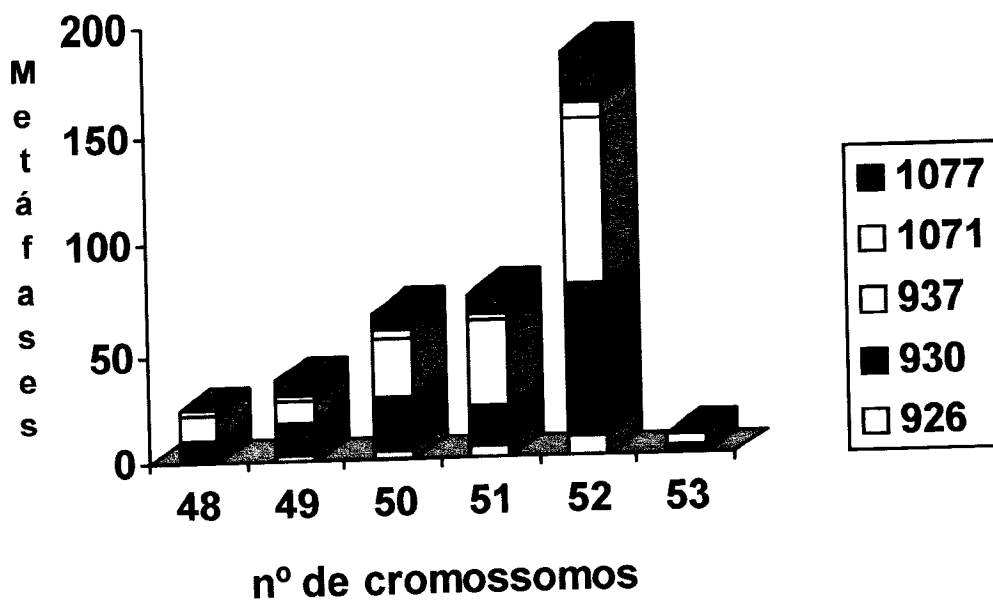
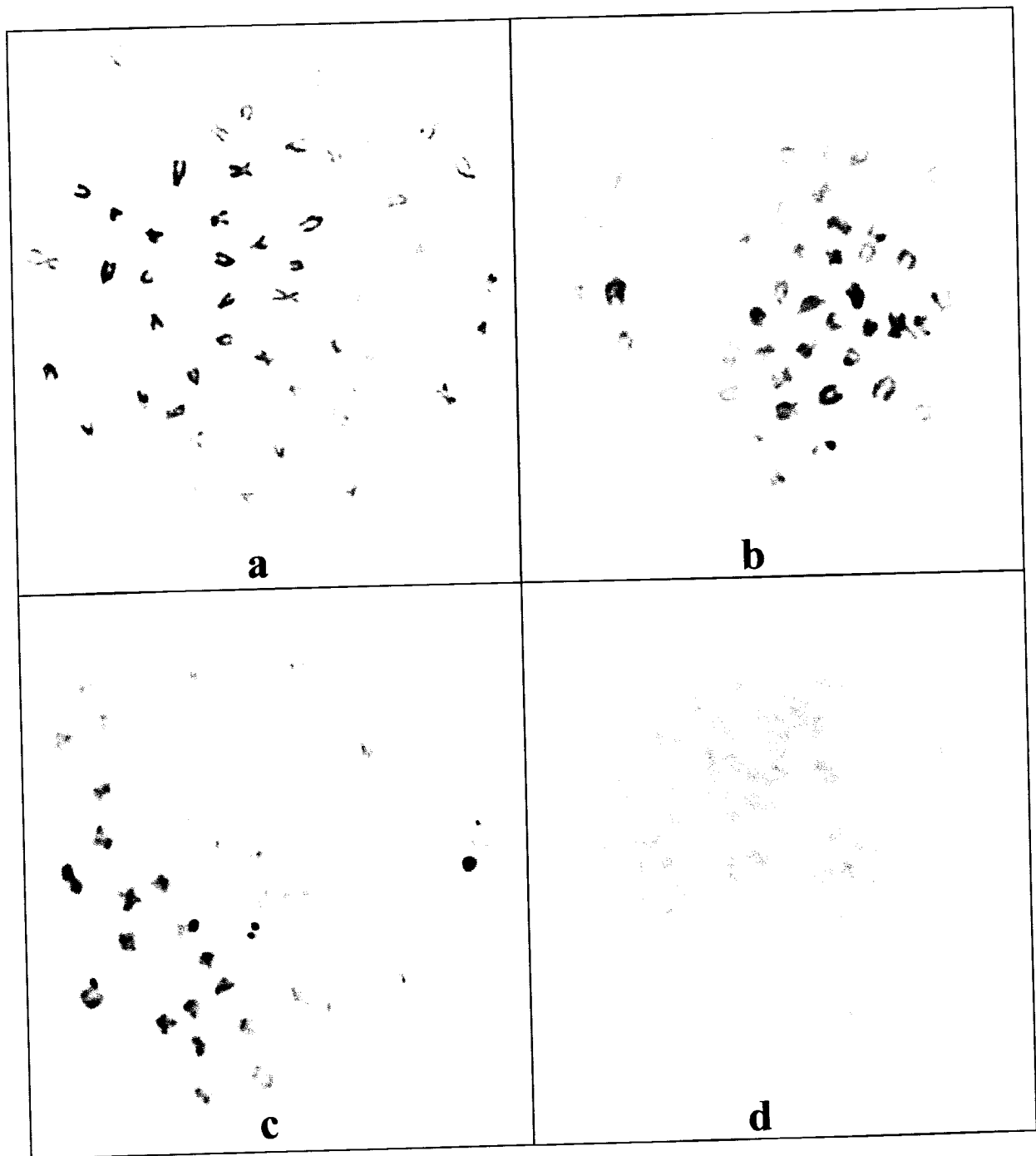


Figura 2. Número diplóide para exemplares de machos de *Bryconamericus* sp.





**Figura 3.** Metáfase de macho (a) e de fêmea (b) de *Bryconamericus* sp com coloração Giemsa convencional; (c) Metáfase tratada com nitrato de Prata; (d) Metáfase de *Bryconamericus* sp evidenciando as regiões de heterocromatina constitutiva.

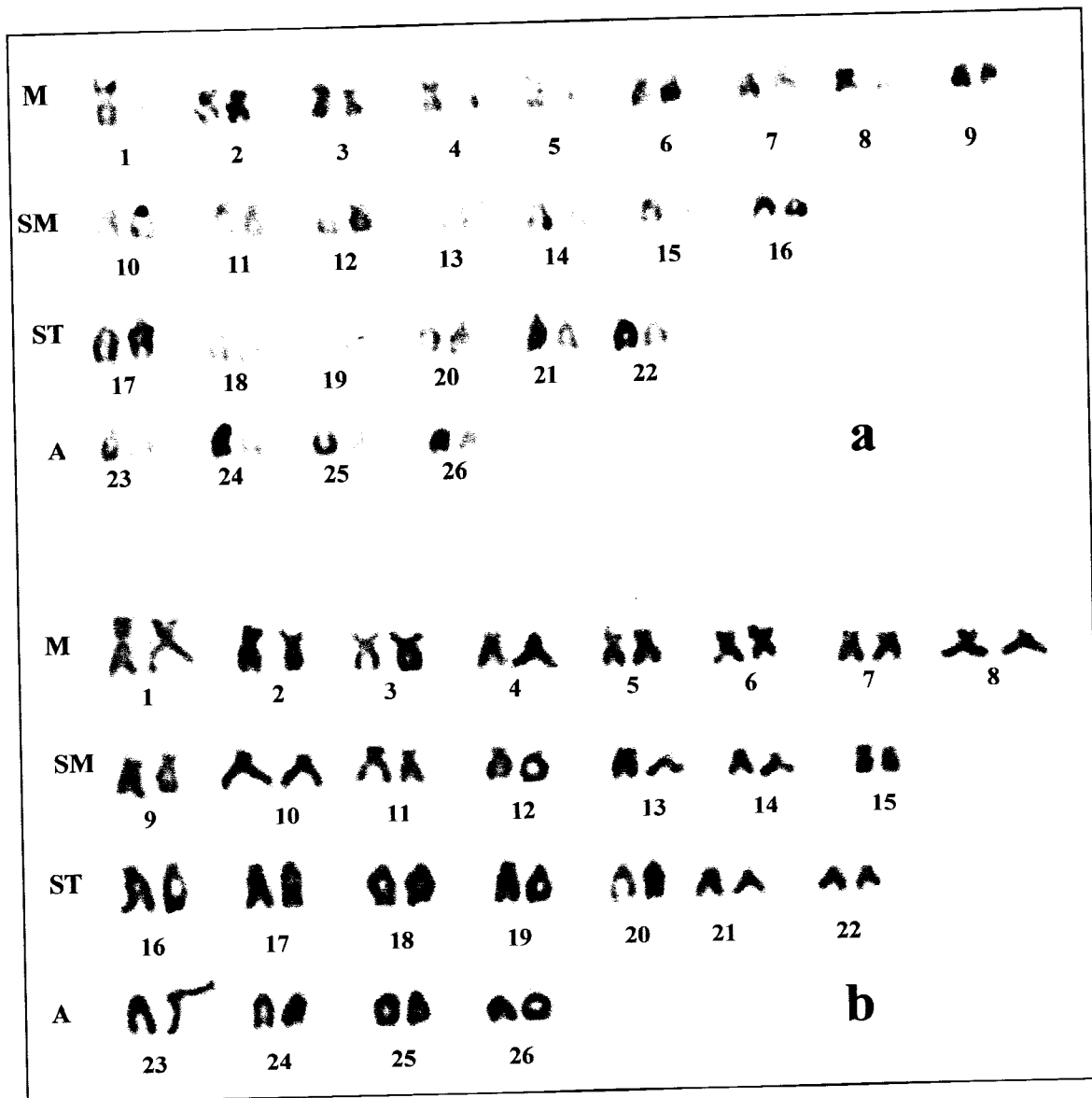
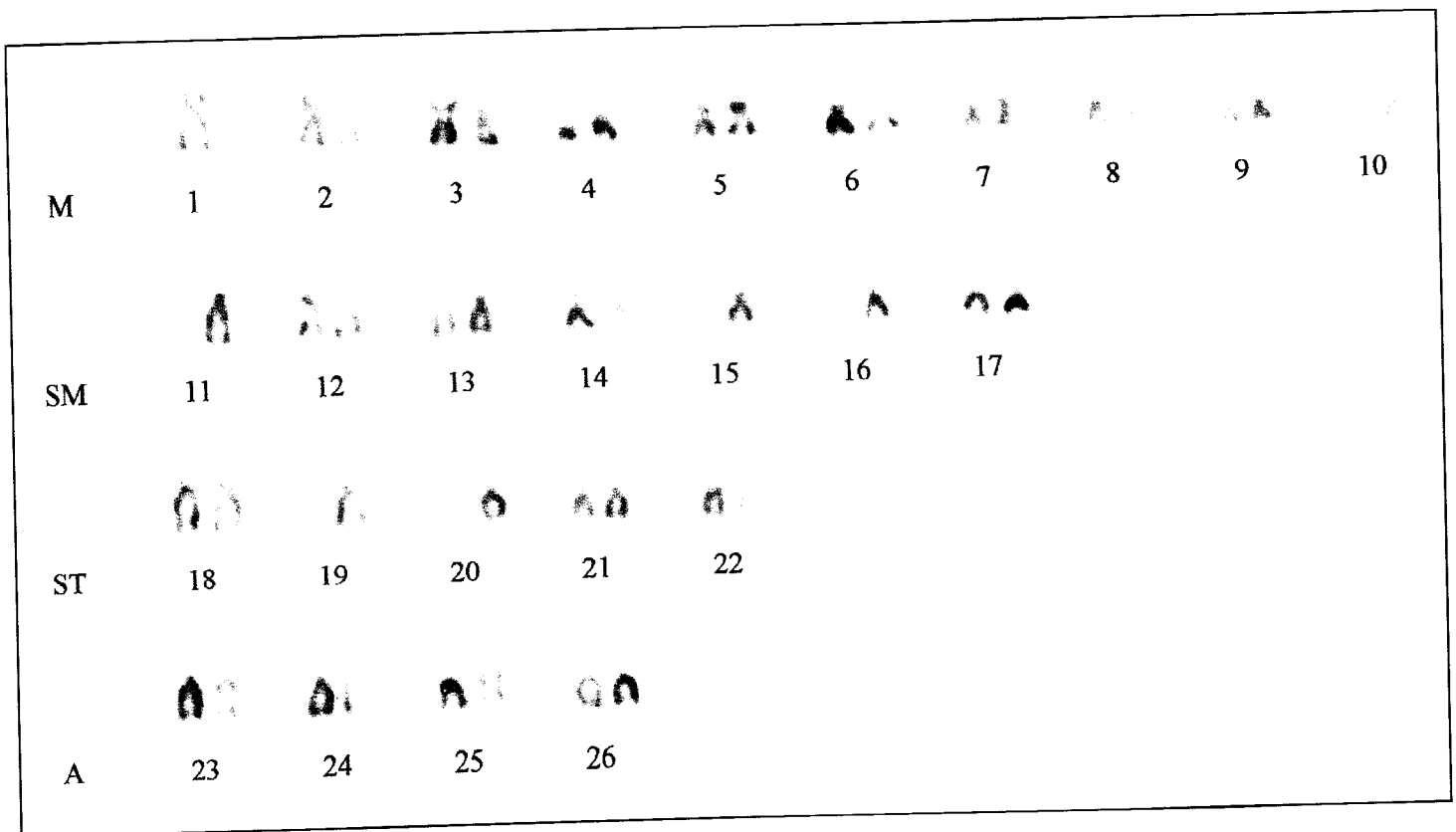
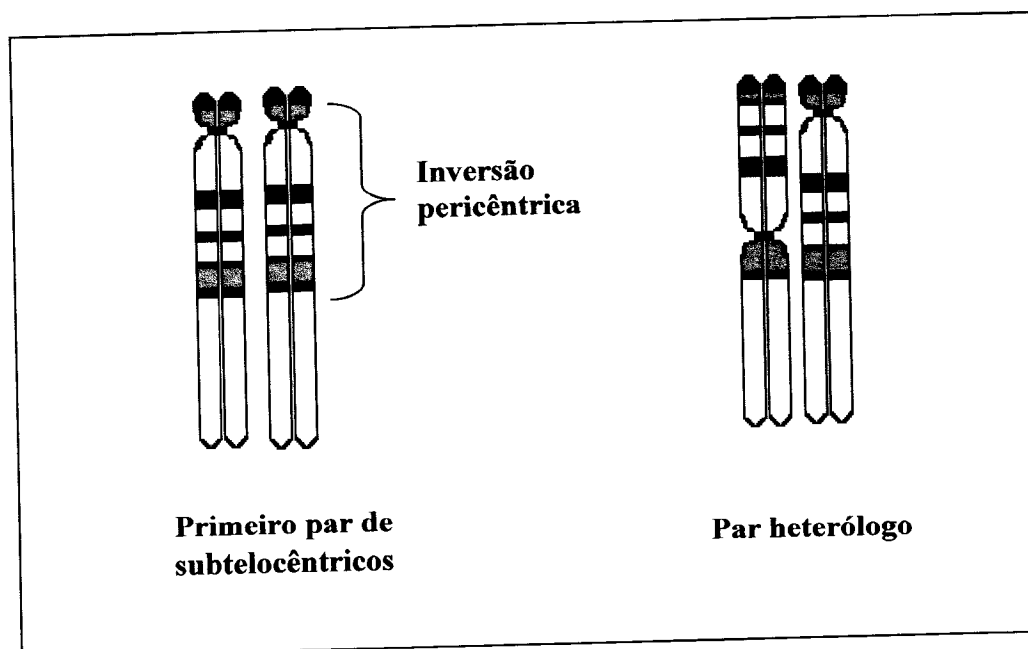


Figura 4. Cariótipos de fêmea (a) e macho (b) de *Bryconamericus* sp.



**Figura 5.** Cariótipo de macho de *Bryconamericus* sp com heteromorfismo no primeiro par de cromossomos metacêntricos. Dois tipos de cromossomos não pareados são observados



**Figura 6.** Alteração cromossômica do tipo inversão pericêntrica observada em um indivíduo macho de *Bryconamericus* sp. As bandas cromossômicas são representativas.

## 5.2. Gênero *Piabina*

Foram preparados e analisados 6 exemplares de *Piabina* (5 fêmeas e 1 macho) provenientes do córrego dos Caetano (Uberlândia, MG).

O número cromossômico diplóide observado para o gênero foi de  $2n=52$  cromossomos para machos e fêmeas (Figura 7).

As metáfases analisadas de *Piabina* evidenciaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subteloentrícos e acrocêntricos (Figura 8a).

O emprego da técnica de bandamento C permitiu a visualização de bandas heterocromáticas em regiões biteloméricas dos cromossomos (Figura 8b).

O padrão de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos mostrou-se múltiplo, com duas a quatro marcações com nitrato de Prata, com a NOR detectada na região telomérica dos cromossomos (Figuras 8c e 8d).

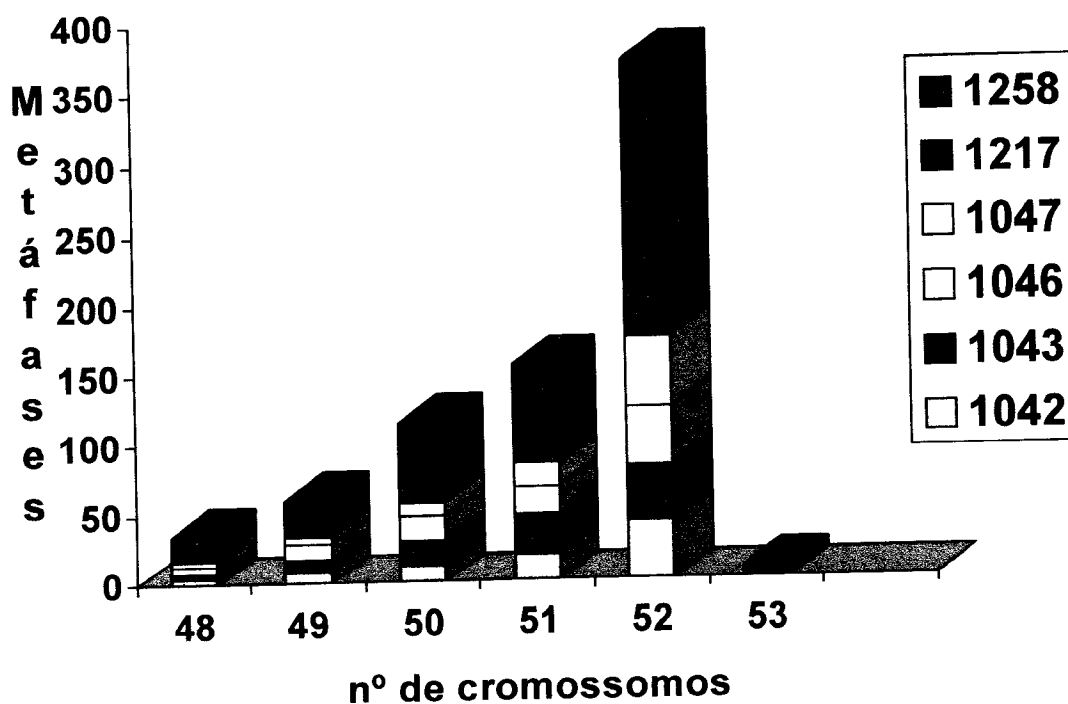
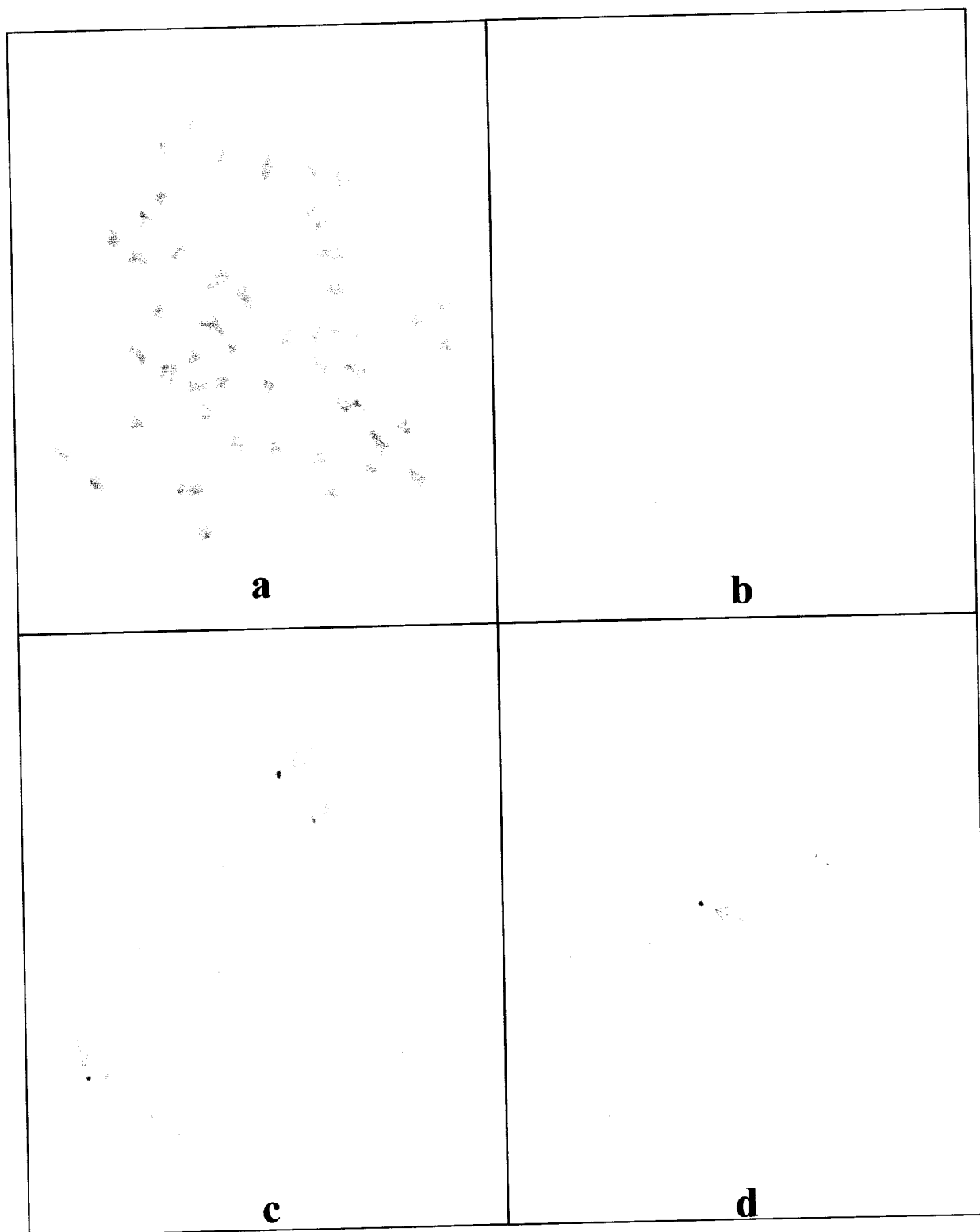


Figura 7. Número diplóide para exemplares do gênero *Piabina*.



**Figura 8.** Metáfase de *Piabina* com coloração Giemsa convencional (a), evidenciando as regiões de heterocromatina constitutiva (b) e metáfases tratadas com nitrato de Prata (c) e (d).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Gênero *Bryconamericus*

A estrutura do cariótipo de *Bryconamericus* sp proporciona condições de caracterização individual de diferentes espécies, podendo ser considerados como diagnósticos dados como: número diplóide, fórmula cromossômica, número e posição de NORs como também quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva.

Através da técnica de preparação direta dez indivíduos do gênero *Bryconamericus* apresentaram metáfases em condições possíveis de análise, sendo 5 machos e 5 fêmeas. O número cromossômico diplóide observado para o gênero foi de  $2n=52$  cromossomos para machos e fêmeas.

Estudos da população de *Bryconamericus stramineus* também revelaram um número diplóide de  $2n = 52$  cromossomos, com a ocorrência de 13 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 13 pares de cromossomos subtlocêntricos e acrocêntricos (PORTELA et al. 1988). A análise citogenética feita por Paintner-Marques et al. 2003, em indivíduos de *Bryconamericus aff. iheringii* revelou um número diplóide de 52 cromossomos e um cariótipo com  $8M+22SM+10ST+12A$ .

As espécies machos e fêmeas de *Bryconamericus* sp do presente estudo apresentaram o cariótipo assimétrico, uma vez que se notou a presença de cromossomos de todos os tipos e tamanhos. Apesar dos exemplares machos e fêmeas possuírem o mesmo número diplóide,  $2n=52$ , a estrutura cariotípica dos indivíduos variou, obtendo-se fórmulas cromossômicas com  $18M + 14SM + 12ST + 8A$  e com  $16M+14SM+14ST+8A$ . Esta variação nos citótipos dos indivíduos pode ser devido à diferença de condensação entre os cromossomos. Variação nos citótipos foi observada também nos estudos de Wasko et al. (1996), em que indivíduos de *Bryconamericus* sp apresentaram o mesmo número diplóide de 52 cromossomos, porém com dois citótipos distintos ( $6M+30SM+6ST+10A$  e  $10M+ 6SM+18ST+18A$ ).

No entanto, um indivíduo macho de *Bryconamericus* sp apresentou um par heterólogo bastante evidente em todas as metáfases analisadas, formado por um cromossomo metacêntrico e um subtlocêntrico, tendo, portanto, fórmula cromossômica igual a  $19M + 14SM + 11ST + 8A$ .

Apesar da necessidade de maiores confirmações, provavelmente, o cariótipo desse indivíduo macho sugere uma alteração cromossômica estrutural do tipo inversão pericêntrica

de um dos cromossomos do primeiro par do subtelocêntrico, fazendo com que este cromossomo se tornasse um metacêntrico, formando, assim, o par heterólogo (Figura 6).

A presença de um par heterólogo de cromossomos foi observada por Paintner-Marques et al. (2002a), em que 40% dos citótipos de *Bryconamericus aff. exodon* analisados apresentaram heteromorfismo no primeiro par de cromossomos metacêntricos. Os autores atribuem essa variação a rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica com a perda de um segmento ou a direta deleção de um dos homólogos, uma vez que o número diplóide de 52 cromossomos foi mantido.

Em peixes, já foram descritos números e/ou localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos em 231 espécies sendo que entre estas, 71% apresentam NOR simples, 15% apresentam NORs múltiplas, com dois pares de cromossomos evidenciados e 14% apresentam mais de dois pares cromossômicos marcados (OLIVEIRA; FORESTI, 1994).

Situações polimórficas que envolvem diferenças de tamanho das marcações entre cromossomos homólogos, são muito frequentes entre várias espécies (FORESTI et al. 1981, entre outros).

No caso dos exemplares analisados do gênero *Bryconamericus*, o padrão de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos mostrou-se múltiplo com duas a quatro marcações com nitrato de Prata com a NOR detectada na região telomérica do braço curto de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos.

Estudos com *Bryconamericus aff. exodon* mostraram NORs detectadas na região telomérica de braços curtos e longos de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (PAINTNER-MARQUES et al. 2002b). Wasko e Galetti Jr. (1999) identificaram nove fenótipos distintos em quatro espécies de *Bryconamericus*, considerando o número e a localização das NORs.

De todas as espécies analisadas até o presente, somente *Bryconamericus aff. ihieringii* da bacia do rio Tibagi (PR), apresentou sistema de NOR simples (PAINTNER-MARQUES et al. 2002b). Assim, a ocorrência de NORs múltiplas, como ocorre na população do rio Araguari, parece ser a característica do gênero *Bryconamericus*.

A distribuição de heterocromatina constitutiva é variável no gênero *Bryconamericus*. Estudos mostram que cromossomos tratados pelo bandeamento C apresentam blocos heterocromáticos em regiões centroméricas e teloméricas na maioria dos *Bryconamericus aff. ihieringii* analisados (PAINTNER-MARQUES et al. 2003). Já Wasko e Galetti Jr. (1998), observaram blocos heterocromáticos nas regiões intersticiais, teloméricas e centroméricas em cinco populações de *Bryconamericus* sp e Portela-Castro (1999 apud PAINTNER-

MARQUES et al. 2003) observou que esses blocos heterocromáticos se restringem às regiões centroméricas em praticamente todos os cromossomos das populações de *Bryconamericus* sp analisadas.

O emprego da técnica de bandamento C na população do rio Araguari permitiu a visualização de bandas heterocromáticas em regiões centroméricas e teloméricas de cromossomos de todos os tipos. Há presença de marcações bem evidentes e outras mais pálidas nos cromossomos analisados. Este padrão da população de *Bryconamericus* sp do rio Araguari mostrou-se similar ao descrito por outros autores op cit.

## 6.2. Gênero *Piabina*

O número cromossômico diplóide observado para o gênero foi de  $2n=52$  cromossomos para machos e fêmeas, assim como descrito por Portela et al. 1988; Oliveira, 1988 e Carvalho et al. 1998.

As metáfases analisadas evidenciaram cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos neste gênero. Portela et al. (1988) constataram tanto para *Bryconamericus stramineus* como para *Piabina argentea* a ocorrência de 13 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 13 pares de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos.

No presente estudo, a coloração com nitrato de Prata evidenciou NOR múltipla em *Piabina*, com 2 a 4 cromossomos marcados na região telomérica. Apesar de ter sido observado até quatro cromossomos marcados com o nitrato de Prata, Portela et al. (1988), observou com mais frequência em *Piabina argentea* apenas um par de cromossomos marcados sendo, entretanto, constatadas variações em número e tamanho destas regiões.

A Região Organizadora de Nucléolo, detectada em 4 espécies, mostrou um comportamento característico entre cada uma delas. Neste caso, a situação mais frequente foi a presença de um par de NOR. A multiplicidade das NORs observadas em *P. argentea* e as diferenças interespecíficas na posição destas nos cromossomos sugerem que as modificações no cariótipo do grupo também podem envolver regiões contendo cistrons ribossomais (PORTELA et al. 1988).

Em relação ao emprego da técnica de bandamento C, visualizaram-se cromossomos com marcações centroméricas e biteloméricas, diferentemente da população de



*Bryconamericus* sp do presente estudo que apresentou cromossomos com marcas intersticiais, centroméricas e teloméricas.

De acordo com Eigenmann (1917), os gêneros *Piabina* e *Bryconamericus* estão estritamente relacionados. Já os gêneros *Astyanax* e *Moenkhausia*, típicos da subfamília Tetragonopterinae, estão mais relacionados entre si do que com outros grupos, sugerindo que diversas linhagens se diferenciaram a partir deles.

Dessa forma, estes dados cromossômicos ajudam no esclarecimento das interrelações existentes entre os peixes da subfamília Tetragonopterinae, uma vez que os gêneros *Bryconamericus* e *Piabina* apresentaram semelhanças como o número diplóide igual a 52 cromossomos, cromossomos de todos os tipos (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos) e sistema de NOR múltiplo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORES, A; THODE, G; MARTINEZ, G; GILEZ, V. Chromosome complement, C-banding and Ag-NOR in *Gymnammodytes cicerehus* (Ammodytidae, Perciformes). **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 649-651. 1993.
- ARAÚJO, A.C.S. A. R. **Caracterização cariotípica de duas espécies do gênero Astyanax (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Paranaíba da Região do Triângulo Mineiro**. 1999. 33f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- ARCHANGELO, L. **Estudos cromossômicos em Psittacidae (Aves)**. 1996. 72f. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA F., O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103 - 120, 1978.
- BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática**. São Paulo: USP, Faculdade de Saúde Pública; Instituto de Pesca, 1972. 216p.
- BRITSKI, H.A., SATO, Y. e ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de Peixes da Região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3. ed. CODEVASF-Divisão de Piscicultura e Pesca, Brasília, 1986. 115p.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 184 p.
- BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos In: CARAMACHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed.) **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: Computer e Publish Editoração, (Série Ecologia Brasiliensis), 1999. p. 91-138.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n.1, p.47-54, 1998.

DENTON, T. E. **Fish Chromosome Metodology**. Charles C. Thomas Publisher, Illinois, 1973. 166 p.

EIGENMANN, C. H. The American Tetragonopterinae. In: The American Characidae. Mem. **Mus. Comp. Zool.** (Harvard College), n. 43, p. 38-49, 1917.

FELDBERG, E. **Estudos citogenéticos em 12 espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia Central**. 1990. 126f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), Manaus, AM.

FORESTI, F. TOLEDO-ALMEIDA, L.F. e TOLEDO-FILHO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 31, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. **Experientia**, v. 49, p. 810-813. 1993.

GALETTI JR., P.M., BERTOLLO, L.A.C. e MOREIRA FILHO, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. **Caryologia**, v. 37, p. 401-406, 1984.

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

GUERRA, S., M. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara, 1988, 137 p.

GOLD, J. R. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American Cyprinid fishes. **Copeia**, n.1. p.133-139, 1984.

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

OLIVEIRA, C. e FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: IV SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 1994. **Resumos**, Botucatu-São Paulo. 1994.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C. Síntese dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais. In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, **Resumos**, Manaus, AM, 2000, p.128.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. J.; TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. Análise comparativa através do padrão de Banda C, entre duas populações de *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIDAE). 2004. In: X SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, **Resumos**, Natal, RN, 2004, p.101.

PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. S. Heterocromatina constitutiva. **Sociedade Brasileira de Genética**, v. 7, p.185-225, 1998.

PAINTNER-MARQUES, T. R., CAETANO, L. G.; DIAS, A.L. Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus aff. exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 67, n. 4, p. 397-402, 2002a.

PAINTNER-MARQUES, T. R., CAETANO, L. G.; DIAS, A. L. Multiple NORs in *Bryconamericus aff. exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**, v. 137, n. 2, p. 107-112, 2002b.

PAINTNER-MARQUES, T.R., CAETANO, L.G. e DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus aff. iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 145-149, 2003.

PORTELA, A.L.B.S., GALETTI Jr., P.M. e BERTOLLO, L.A.C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 307-316, 1988.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. Trad. P. VOEUX et al. 2. ed. Guanabara Dois, R. J. 1985.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell. Res.** v. 74, p. 304-306, 1972.

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

TORRES-MARIANO, A. R. **Descrição citogenética de espécies do gênero Astyanax (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Araguari - Uberlândia (MG)**. 2001. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

WASKO, A.P. and GALETTI Jr. P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**, v. 94, p. 185-193, 1998.

WASKO, A.P. e GALETTI Jr. P.M. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). **Cytologia**, v. 64, p. 63-67, 1999.

WASKO, A.P., VENERE, P.C. e GALETTI Jr., P.M. Chromosome divergence between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 225-230, 1996.

VENERE, P.C. **Diversificação cariotípica em peixes do médio Rio Araguaia, com ênfase em Characiformes e Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi)**. 1998. 130f. Dissertação (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.