

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
E45:53
A663C
TES/MEM

**COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA DE QUATRO POPULAÇÕES DE
Astyanax scabripinnis (PISCES, CHARACIDAE) DA REGIÃO DO
TRIÂNGULO MINEIRO**

Aluna: Ana Cristina dos Santos Araujo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Genética).

SISBI/UFU



1000210968

UBERLÂNDIA-MG
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

SISBI/UFU

210968

D

FU 000277561

FICHA CATALOGRÁFICA

A663c Araujo, Ana Cristina dos Santos, 1976-
Comparação citogenética de quatro populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro / Ana Cristina dos Santos Araujo. - Uberlândia, 2003.
67f. : il.
Orientador: Sandra Morelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Citogenética animal - Teses. 2. *Astyanax scabripinnis* - Citogenética - Teses. 3. Cromossomo supranumerário - Teses. 4. Heterocromatina - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575:59 (043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**COMPARAÇÃO CITOGENÉTICA DE QUATRO POPULAÇÕES DE
Astyanax scabripinnis (PISCES, CHARACIDAE) DA REGIÃO DO
TRIÂNGULO MINEIRO**

Aluna: Ana Cristina dos Santos Araujo

COMISSÃO EXAMINADORA

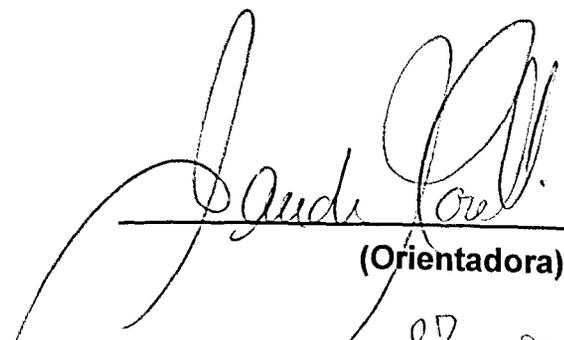
Presidente: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Lúcia Giuliano Caetano (UEL)

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti (UFU)

Data da Defesa: 27/05 /2003



(Orientadora)
Uberlândia, 27 / 05 / 2003

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem sofrem muito, nem gozam muito, porque vivem nesta penumbra cinzenta, que não conhece a vitória nem a derrota”

Franklin Roosevelt

“Os vencedores da batalha da vida são homens perseverantes que, sem se julgarem gênios, se convenceram de que só pelo esforço e perseverança poderiam chegar ao fim almejado”

Emerson

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Dedicatória

Aos meus pais João e Ivone pelo amor, carinho e o grande incentivo em tudo que faço; sou eternamente grata;

Aos meus queridos irmãos Cristiano e Ronaldo que me ajudaram de várias formas;

Ao meu amado noivo Edmilson, por atuar de forma sempre marcante na minha vida, pela compreensão, incentivos, sugestões e por me proporcionar uma vida maravilhosa e me mostrar o quanto é importante a presença de uma pessoa companheira ao nosso lado.

Agradecimentos

À Deus pelas oportunidades que têm me concedido;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio e oportunidades dadas durante a realização deste trabalho;

À Prof^ª. Dra. Sandra Morelli, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, minha querida orientadora, pelo grande apoio, paciência, dedicação, sugestões e críticas que foram de fundamental importância na realização desse trabalho. Muito obrigada.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora pela disposição em ler esse trabalho, pelas sugestões e críticas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica por serem sempre atenciosos e por contribuírem na minha formação científica;

Aos amigos de "ontem" e "hoje" de do laboratório de Citogenética Animal pelo companheirismo e momentos de descontração;

À amiga Sabrina sempre tão meiga e companheira;

À amiga Gisele pelo *Abstract* e pela amizade;

Ao amigo Roosevelt que se dispôs a ler esse trabalho e pelas sugestões;

Ao amigo Luiz Guilherme pela paciência;

Em especial à amiga Alessandra, sempre presente, companheira e que nunca mediu esforços para me ajudar;

Ao técnico do laboratório de Citogenética Animal, José Clidenor dos Santos "Pé trocado", pelo grande auxílio no campo, como também pela amizade;

Ao técnico Anselmo Oliveira sempre disposto em ajudar e pelo alto astral;

Ao Prof. Dr. Paulo Eugênio (Instituto de Biologia) pela gentileza no empréstimo do Laboratório de Microscopia e Imagem;

Ao técnico em fotografia, Jairo, pelo empréstimo do Laboratório Fotográfico;

Aos proprietários das fazendas da Cruz (José P. A. da Silva), Campo Belo (Sydney C. Gonçalves) e à Estação de Piscicultura do Parque do Sabiá, pela gentileza em cederem os exemplares estudados nessa pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida;

Ao CNPq, CAPES e UFU pelo apoio financeiro.

Índice

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. OS PEIXES COMO MATERIAL DE ESTUDO	1
1.2. A CITOGENÉTICA NO GRUPO DOS PEIXES	3
1.3. BANDAMENTOS CROMOSSÔMICOS.....	5
1.4. CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS	10
2. CAPÍTULO I	15
2.1. ABSTRACT.....	15
2.2. INTRODUÇÃO	15
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.4. RESULTADOS.....	17
2.5. DISCUSSÃO	25
2.6. RESUMO	29
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
3. CAPÍTULO II	31
3.1. ABSTRACT.....	31
3.2. INTRODUÇÃO	31
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.4. RESULTADOS.....	33
3.5. DISCUSSÃO	38
3.6. RESUMO	41
3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4. CONCLUSÃO GERAL.....	43
5. ANEXOS	44
5.1. MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1.1. Material e Locais de Coletas.....	44
5.1.2. Métodos	46
5.1.2.1. Indução de Mitoses	46
5.1.2.2. Obtenção de Cromossomos Mitóticos.....	46
5.1.2.2.1. Tratamento "in vitro"	46
5.1.2.2.2. Preparações Diretas.....	47
5.1.2.3. Bandamentos Cromossômicos	49
5.1.2.3.1. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs).....	49
5.1.2.3.2. Detecção da Heterocromatina Constitutiva – Banda C.....	49
5.1.2.3.3. Coloração pelo Fluorocromo Cromomicina A ₃	50
5.1.2.4. Montagem dos cariótipos.....	51
5.2. GRÁFICOS DAS FREQUÊNCIAS CROMOSSÔMICAS DAS QUATRO POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Cariótipos representativos de três populações *Astyanax scabripinnis*: (a) exemplar fêmea do córrego Cruz da Retirada Bonita, (b) exemplar fêmea do córrego da Manga e (c) exemplar macho do córrego dos Caetano.....18
- Figura 2.** Cariótipos representativos da população de *Astyanax scabripinnis* do córrego Jataí: (a) exemplar fêmea e (b) exemplar macho portador de microcromossomo supranumerário.....19
- Figura 3.** Variação das Ag-NORs observadas em cromossomos de *Astyanax scabripinnis*: (a) e (b) metáfases de indivíduos da população do córrego Cruz da Retirada Bonita, (c) e (d) córrego da Manga, (e) e (f) córrego dos Caetano e (g) e (h) córrego do Jataí.....21
- Figura 4.** Metáfases de exemplares de *Astyanax scabripinnis* mostrando resposta ao fluorocromo Cromomicina A₃. As setas azuis indicam regiões correspondentes a NORs, as setas amarelas indicam regiões não correspondentes a NORs e a cabeça da seta indica cromossomo B: (a) e (b) exemplares do córrego Cruz da Retirada Bonita, (c) exemplar do córrego dos Caetano e (d), (e) e (f) exemplares da população do córrego Jataí.....22
- Figura 5.** Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. As setas indicam blocos heterocromáticos: (a) córrego Cruz da Retirada Bonita. A seta verde indica heterocromatina intersticial, a seta laranja possível cromossomo doador de heterocromatina, (b) córrego dos Caetano, (c) córrego Jataí. A seta verde mostra cromossomo supranumerário totalmente heterocromático, (d) córrego Jataí e (e) córrego da Manga.....24

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Cariótipos de *Astyanax scabripinnis*, coletados no córrego Jataí, corados com Giemsa, contendo: (a) 50 cromossomos, (b) 51 cromossomos.....35

Figura 2. Metáfases de *Astyanax scabripinnis* mostrando as respostas à solução de nitrato de Prata e ao bandamento C: (a) e (b) as setas indicam os cromossomos AgNORs⁺, (c) e (d) as setas azuis indicam bandas C⁺ coincidentes com as NORs e a seta verde mostra o cromossomo supranumerário totalmente heterocromático.....36

Figura 3. Metáfases de *Astyanax scabripinnis* tratadas com Cromomicina A₃ (CMA₃): (a),(b) e (c) mostram as variações interindividuais. As setas azuis mostram regiões CMA₃⁺ correspondentes às NORs, as setas amarelas indicam regiões CMA₃⁺ não correspondente às NORs e a cabeça da seta indica o cromossomo supranumerário CMA₃⁻.....37

Lista de Abreviaturas

2n	Número diplóide
A	Cromossomo acrocêntrico
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AgNORs	Regiões organizadoras de nucléolos evidenciadas pela Prata
banda C	Heterocromatina constitutiva
CMA _s	Cromomicina
DA	Distamicina A
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
FISH	Hibridação "in situ" fluorescente
m	Metro(s)
M	Cromossomo metacêntrico
mg	Miligrama(s)
ml	Mililitro(s)
MM	Mitramicina A
NF	Número fundamental
NOR	Região organizadora de nucléolo
pb	Pares de bases
rDNA	DNA ribossômico
rRNA	RNA ribossômico
SM	Cromossomo submetacêntrico
ST	Cromossomo subtelocêntrico

Resumo Geral

A família Characidae é o grupo mais complexo entre os Characiformes e representa um grande grupo de peixes de água doce da América do Sul. A subfamília Tetragonopterinae destaca-se na família Characidae por englobar o maior número de espécies entre os peixes. Sua distribuição geográfica compreende desde a fronteira do México com Estados Unidos até a Argentina. O gênero mais estudado citogeneticamente dentro dessa família é o *Astyanax* popularmente conhecido por lambari, piabas e outros. Devido a ampla variabilidade cariotípica observada na espécie *Astyanax scabripinnis*, o presente trabalho teve por objetivo comparar citogeneticamente quatro populações dessa espécie da região do triângulo mineiro (municípios de Uberlândia e Campina Verde), sendo três populações da bacia do rio Paranaíba, (córregos Jataí, dos Caetano e Cruz da Retirada Bonita) e uma da bacia do rio Grande (córrego da Manga). As quatro populações apresentaram número diplóide igual 50 cromossomos com exceção de quatro exemplares machos do córrego Jataí, que apresentaram um cromossomo supranumerário ($2n=50+1B$). A impregnação pela Prata evidenciou um sistema de NORs múltiplas. Os blocos de heterocromatina constitutiva foram localizados na região centromérica e pericentroméricas de alguns cromossomos, além de uma banda intersticial num cromossomo acrocêntrico na população do córrego Cruz da Retirada Bonita. A utilização da Cromomicina A₃ (CMA₃) em metáfases de indivíduos dos córregos Cruz da Retirada Bonita, dos Caetano e Jataí indicou que os sítios AgNORs, apresentaram-se CMA₃⁺. Os fluorocromos evidenciaram outras regiões cromossômicas ricas em bases GC além daquelas correspondentes às NORs evidenciadas pela Prata. As diferenças citogenéticas (número e posicionamento das NORs, quantidade de segmentos heterocromáticos) observadas nas quatro populações de *A. scabripinnis* provavelmente podem ser atribuídas ao tipo de habitat ocupado por esta espécie. Apesar de três populações pertencerem à mesma bacia hidrográfica, o comportamento de habitar preferencialmente cabeceiras de pequenos riachos é um forte indício que justifica tais diferenças, pois as barreiras físicas e a distância que separam as populações ocasionam o isolamento das mesmas e impedem a ocorrência de fluxo gênico favorecendo a fixação de possíveis alterações.

Abstract

The characidae family is the most complex group among the characiformes and represents a huge group of sweet water fish from South America. The Tetragonopterinae subfamily detaches itself in the characidae family because it has the most species among the fishes. Its geographic distribution goes from the frontiers of Mexico and United State of America to Argentina. The most genus studied cytogenetically within this family is the *Astyanax* which is popularly known as lambari, piaba and others. Despite the huge karotypic variability observed in the *Astyanax scabripinnis* specimen, the present work had the purpose to compare cytogenetically four populations this specie from the Triangulo Mineiro region (Uberlândia and Campina Verde town), being three populations from Paranaíba River basin (Jataí, dos Caetano and Cruz da Retirada Bonita Streams) and one from Grande River basin (da Manga Stream). All of them presented a 50 chromosomes diploid number but four male samples from Jataí Stream presented a supernumerary chromosome ($2n=50+1B$). The silver staining showed a multiple NORs system. The constitutive heterochromatine blocks were localized in the centromeric and pericentromeric regions in some chromosomes beyond an interstitial band in an acrocentric chromosome in the Cruz da Retirada Bonita Stream population. The use of chromomycine A₃ (CMA₃) in metaphases of individuals from Cruz da Retirada Bonita, dos Caetano and Jataí Streams indicated that the AgNORs sites were CMA₃⁺. The fluorochromes showed other chromosomic regions GC bases rich beyond those NORs regions silver stained. The cytogenetic regions (number and positioning of NORs quantity of heterochromatic sections), observed in the four *A. scabripinnis* populations probably can be attributed to the environment of this specie. Despites three of the populations are belonged to the same hydrographic basin, the behavior to inhabit preferentially the head of small rivers is a strong sign that justify such differences, because the physical barriers and the distance that separate these populations lead to their isolation and prevent the genic flow favouring establishment of possible alterations.

1. Introdução Geral

1.1. Os peixes como material de estudo

Os peixes primitivos deram origem a todos os outros vertebrados existentes. A partir dos grupos primitivos, Agnathas (a = sem, gnathos = maxila) e Placodermis (placo = placa, derma = pele) surgiram duas classes dominantes de peixes modernos: Chondrichthyes e Osteichthyes (McALESTÉR, 1971), os quais formam um grupo muito numeroso e diversificado.

Segundo Brum (1995) a maioria dos peixes atuais está contida na classe Osteichthyes (ou dos peixes ósseos) que se divide em quatro subclasses: Dipnoi (peixes pulmonados); Crossopterygii (a do celacanto), Brachyopterygii e Actinopterygii (peixes com nadadeiras que apresentam raios de sustentação).

Entre os Osteichthyes um grupo de peixes com grande distribuição mundial é o Ostariophysi representado por um quarto dos teleósteos (FINK; FINK, 1981). Neste grupo destaca-se a ordem Characiformes, que apresenta grande diversidade de espécies e seus representantes encontram-se amplamente distribuídos em águas neotropicais.

Pelo fato dos peixes ocuparem posição central na evolução dos vertebrados e apresentarem características biológicas peculiares, os mesmos constituem um grupo importante para estudos genéticos e citogenéticos que auxiliam na compreensão dos processos evolutivos dos vertebrados (TOLEDO-FILHO et al., 1978).

Há muito tempo já se conhece que a ictiofauna do Brasil está entre as mais diversificadas do mundo. Três grandes bacias e dois complexos de bacias hidrográficas contribuem com grande potencial hídrico existente neste território. Estas bacias são a do rio Amazonas, a do rio Tocantins e a do São Francisco e os dois complexos de bacias são o do Prata e do Atlântico. Na bacia Amazônica, encontra-se o maior número de espécies de peixes da região Neotropical, "a fauna de outras bacias nada mais é do que frações desta imensa fauna" (DARLINGTON, 1957 apud MENEZES, 1972).

Na América do Sul, o grupo mais complexo entre os Characiformes, segundo Britski et al. (1988) é a família Characidae, compreendendo cerca de 30

subfamílias e representando um grande conjunto de peixes de água doce. Nesta família é encontrada grande "parte" dos peixes de escamas conhecidos no Brasil e que apresentam imensa variedade de formas. Alguns representantes desta família são: lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, etc, com espécies medindo desde 2cm, como as pequiras até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972).

A morfologia básica da maioria dos peixes é fusiforme, forma hidrodinâmica que lhes oferece menor resistência ao deslocamento na água. A variedade de formas é muito grande, podendo ser achatados dorsoventralmente, lateralmente, serpentiformes (em forma de fita) dentre outras. Os peixes podem habitar locais muito variados como águas frias de montanha, águas quentes, doce ou salgadas, estagnadas ou correntes, com variadas concentrações de oxigênio e minerais, o que acarreta grande plasticidade genotípica e fenotípica para habitar tão diferentes locais.

A subfamília Tetragonopterinae destaca-se na família Characidae por englobar o maior número de espécies entre os peixes. Sua distribuição geográfica compreende desde a fronteira do México com os Estados Unidos até a Argentina (BRITSKI, 1972). Esta subfamília é constituída por espécies de pequeno porte, com até 200mm (GARUTTI, 1999). O gênero *Astyanax* é o mais comum na subfamília Tetragonopterinae e algumas espécies que compreendem este gênero são: *A. scabripinnis*, *A. fasciatus*, *A. eigenmanniorum*, *A. shubarti*, *A. taeniatus*, *A. lineatus*, *A. mexicanus*, *A. altiparanae*, *A. janae*, dentre outras. Popularmente, esses peixes são conhecidos por lambaris, piabas, matupiri, canivete e caracterizam-se por apresentarem duas séries de dentes no pré-maxilar, com cinco dentes na série interna, linha lateral completa e nadadeira caudal nua, com escamas apenas na base. Além disso, os dentes da mandíbula decrescem de tamanho, abruptamente, após o 3^o – 4^o dente anterior (BRITSKI, 1972). As espécies do gênero *Astyanax* alimentam-se, principalmente, de larvas de insetos aquáticos, pupas, imagos e algas, sendo elementos importantes para a manutenção do equilíbrio ecológico. Apresentam comportamento reprodutivo semelhante aos peixes de piracema, realizando curtas migrações ascendentes na época das cheias, que lhes permitem um certo estímulo necessário para

reprodução. Na cadeia alimentar, tem papel relevante como “espécies forrageiras” para indivíduos ictiófagos, de maior porte, como o dourado (GODOY, 1975).

Astyanax scabripinnis é uma espécie restrita às cabeceiras de rios, riachos e córregos, onde formam populações isoladas. Melo (2000 apud MANTOVANI, 2001) demonstrou, em seus estudos, que indivíduos dessa espécie são especialistas nesses ambientes e, dificilmente, sobreviveriam em outros. As características biológicas somadas às ecológicas, torna essa espécie um importante material para estudos citogenéticos e evolutivos.

1.2. A citogenética no grupo dos peixes

Em 1943, com o trabalho de Wickbom nasceu a citogenética de peixes Neotropicais, com estudos de espécies da ordem Cyprinodontiforme (OLIVEIRA, 1994). Embora informações sobre citogenética de peixes estejam cada vez mais disponíveis, com o incremento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes, em função do grande número de espécies, ainda é bastante reduzido e muito inferior ao de mamíferos e de outros grupos de seres vivos.

Os primeiros trabalhos citogenéticos em peixes de água doce realizados por pesquisadores brasileiros datam de 1970. Em 1978, iniciavam-se os estudos citogenéticos de *A. scabripinnis* com o trabalho realizado por Moreira-Filho et al. (1978) em uma população proveniente do ribeirão dos Bicudos (Brotas - SP), onde observou o número diplóide de 50 cromossomos. Em seguida vários outros estudos foram e estão sendo realizados em populações dessa espécie, provenientes de diferentes bacias hidrográficas, com descrição de três números cromossômicos distintos, $2n=46$ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; VIEIRA et al., 1998; KANAYAMA; GIULIANO-CAETANO, 2002), $2n=48$ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA et al., 1995; SOUZA et al., 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; MANTOVANI et al., 2000; MAISTRO et al., 2000a; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2002) e $2n=50$ que até o momento, é o número mais comum (MOREIRA-FILHO et al., 1978; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; VICENTE et al., 1996; MESTRINER et al. 2000, entre outros). Além da variabilidade presente no número diplóide, também, é observada grande

diversificação quanto à distribuição de heterocromatina constitutiva, morfologia cromossômica, tamanho e quantidade de regiões organizadoras de nucléolos e presença ou ausência de cromossomos supranumerários.

Moreira-Filho e Bertollo (1991) estudando populações de *A. scabripinnis* das bacias do rio São Francisco, Tietê e Paraná, observaram o quão complexa é essa espécie, pois os dados obtidos indicaram três números diplóides, $2n=46$, 48 e 50, variação no padrão da banda C e NOR. Estes dados somados aos dados morfométricos levaram os autores a sugerirem que *A. scabripinnis* se trata de um complexo de espécies, o qual foi denominado de "complexo *scabripinnis*".

Frente ao aumento significativo desses estudos nota-se diversos comportamentos da organização do cariótipo deste pequeno peixe. Vieira et al. (1998) descreveram o cariótipo de animais de três populações diferentes, todas da região de Botucatu - SP. A população do ribeirão da Quinta apresentou um número diplóide $2n=50$, a do rio Capivara, com dois citótipos diferentes tendo $2n=48$ e $2n=50$ e a terceira, a do córrego Água de Madalena, com três citótipos diferentes sendo $2n=46$, 48 e 50 e, ainda, alguns exemplares com cromossomos supranumerários. Abel e Moreira-Filho (1998) descreveram outras duas populações com distintos números diplóides, sendo cada uma proveniente de riachos diferentes da bacia do rio São Francisco ($2n=46$ e 50).

Além das variações do número $2n$, o número fundamental (NF) também, tem se mostrado bastante variável. De acordo com Souza e Moreira-Filho (1995), duas populações da bacia Paraíba do Sul - SP, localizadas em altitudes diferentes (1800m e 780m) apresentaram o mesmo número $2n=50$ mas, com diferentes números fundamentais (NF), sendo que na população localizada a 1800m de altitude, o NF foi igual a 86 ($3M+12SM+3ST+7A$) em exemplares machos e para a população de 780m, $NF=70$ ($2M+5SM+3ST+15A$) em ambos os sexos, somadas às variações no bandamento C e NOR, evidenciando um aumento expressivo de cromossomos do tipo submetacêntrico em uma população e do tipo acrocêntrico, em outra.

1.3. Bandamentos cromossômicos

A heterocromatina é um interessante marcador cariotípico e é usada para caracterizar diversas variações nos cromossomos de peixes.

O termo heterocromatina foi, primeiramente, descrito por Emil Heitz em 1928, que demonstrou a existência de dois tipos de cromatina: a eucromatina e a heterocromatina (GUERRA, 1988).

Brown (1966 apud ABEL, 2001) diferenciou a heterocromatina em duas categorias: heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva. A última pode ser constituída por seqüências altamente repetitivas de DNA, referidas também, por DNA repetitivo ou satélite (THERMAN; SUSMAN, 1996). Os blocos de heterocromatina normalmente distribuem-se em torno das regiões organizadoras de nucléolos, nos centrômeros, telômeros ou intercaladas em outras regiões ao longo do cromossomo (GUERRA, 1988; MOLINA, 1995). A ausência de atividade gênica é uma das principais características desse tipo de heterocromatina (GUERRA, 1988). Este fato tem sido contestado uma vez que já foi observado que em alguns animais como anfíbios (VARLEY et al., 1980) e mamíferos (SPERLING et al., 1987) que essa região pode apresentar atividade transcricional. Apesar de vários estudos sobre a heterocromatina constitutiva, não é possível, ainda, afirmar a sua verdadeira função.

Pieczarka e Mattevi (1998) relacionam hipóteses propostas por alguns autores sobre as possíveis funções da heterocromatina constitutiva, que são: importância na especiação; hipótese do guarda costas, isto é, proteger regiões eucromáticas do genoma contra qualquer "fator" prejudicial a estes locais; organização centromérica. Outros autores acreditam que a heterocromatina seja apenas porções de DNA "lixo" (junk).

Darlington e La Cour, em 1940, pela técnica de "tratamento a frio" (2^oC), observaram heterocromatina constitutiva de plantas. Nessa temperatura, a heterocromatina de cromossomos metafásicos apresentava-se como regiões mais descondensadas que a eucromatina mas, esta técnica é pouco viável, pois poucas espécies apresentam esse tipo de comportamento. Mais tarde foram desenvolvidas técnicas que tornaram possíveis a sua observação com maior detalhes. Tais técnicas são: auto radiografia do DNA de síntese tardia, hibridação

“*in situ*” do DNA satélite, bandamento C e fluorocromos base-específicos (GUERRA, 1988).

Para evidenciar as regiões heterocromáticas, o bandamento C é a técnica mais empregada por ser econômica e apresenta resultados satisfatórios. Nesta técnica, a lâmina contendo cromossomos metafásicos é tratada com ácido, posteriormente solução básica e em seguida é exposta em solução salina quente (SUMNER, 1972). Um possível mecanismo é proposto por Holmquist (1979, apud MARGARIDO, 1995) para explicar como agem os reagentes “no DNA”, o ácido ocasiona a depurinação; a base faz a β -eliminação e a solução salina causa a extração do DNA. Estudos sugerem que há uma forte associação entre as proteínas e o DNA na heterocromatina, quando comparadas à eucromatina, sendo esse o motivo da extração do DNA da eucromatina formando bandas nos cromossomos quando os mesmos são corados com Giemsa (GUERRA, 1988).

O bandamento C nos permite observar a variabilidade da heterocromatina constitutiva, isto é, quantidades variáveis de heterocromatina constitutiva no cariótipo de plantas e animais. Em plantas da espécie *Gibasis karwinskyana* Kenton (1991 apud PIECKZARCA; MATTEVI, 1998) detectou variação e diversidade de heterocromatina. Em 14 animais da espécie *Callithrix emiliae* (Primata) analisados, foi observado alta variação interindividual, não sendo possível observar, no mínimo, dois padrões iguais de heterocromatina constitutiva (BARROS et al., 1990 apud PIECKZARCA e MATTEVI, 1998).

Em cada grupo de animais ocorre uma distribuição característica de heterocromatina no cariótipo. De acordo com Imai (1991 apud PIECKZARCA; MATTEVI, 1998) ela pode se distribuir, geralmente, de duas formas: em mamíferos, peixes e formigas, estão presentes, principalmente, na região telomérica; em anfíbios, gafanhotos e plantas, normalmente são encontradas em regiões teloméricas e intersticiais. O autor admite que “a evolução cariotípica dirige a evolução da heterocromatina”.

O emprego do bandamento C é extensamente usado na identificação de sistemas de cromossomos sexuais e auxilia no esclarecimento dos processos evolutivos ocorridos na diferenciação sexual. Um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW pôde ser identificado por Bertollo e Cavallaro (1992) em exemplares de *Triportheus guentheri* (Characidae) do reservatório de Três Maria

(rio São Francisco) e por Centofante et al. (2001), em espécimens de *Characidium gomesi*. Após o tratamento com hidróxido de Bário foi observada a presença de um par cromossômico heteromórfico em exemplares machos de *Pseudotocinclus tietensis* e um par homomórfico em fêmeas (rio Tietê em Paranapiacaba – SP) evidenciando um sistema do tipo XX/XY (ANDREATA et al., 1992).

O uso de fluorocromos na análise da heterocromatina constitutiva mostra-se de grande importância na diferenciação mais detalhada da mesma com base em suas características composicionais porque alguns fluorocromos são altamente específicos para determinados pares de bases. Os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e Mitramicina (MM), possuem afinidades pelas regiões “ricas” em bases GC enquanto que a Quinacrina, DAPI e o Hoescht 33258, evidenciam as regiões “ricas” em bases AT.

A utilização de contra corantes em preparações com fluorescência melhora, sensivelmente, o contraste das bandas nos cromossomos. As possíveis causas desse efeito podem ser devido a competição de ligação entre os diferentes corantes ou por transferência de energia entre os mesmos (SUMNER, 1982 apud DANIEL-SILVA, 1996).

Alguns trabalhos descrevem a combinação de corantes fluorescentes, que podem fornecer padrões de bandas complementares no mesmo cromossomo, uma vez que um determinado fluorocromo tem especificidade para um tipo de base de DNA e o outro para bases diferentes (SOUZA et al., 1996; MANTOVANI, 2001).

Os fluorocromos GC-específicos também são empregados na identificação de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) de vertebrados inferiores (SCHMID, 1980). Podem fornecer resultados mais esclarecedores em relação a quantidade e a localização das mesmas, quando comparados à coloração com nitrato de Prata, uma vez que os fluorocromos GC específicos coram os blocos GC que estão presentes nas regiões interespaçadoras das NORs (SCHMID; GUTTENBACH, 1988).

As regiões organizadoras de nucléolos (NOR) são segmentos do genoma onde se encontram os principais genes controladores da síntese de RNAs ribossomais (rRNA): o rDNA 5S e o rDNA 45S. Nos eucariotos, os genes 5S

arranjam-se repetidamente em tandem, separados por seqüências espaçadoras não transcritas – NTS. Foi demonstrado que as seqüências codificantes desses segmentos são altamente conservadas até mesmo em indivíduos de grupos taxonômicos não relacionados (LONG; DAVID, 1980 apud MARTINS; GALETTI-JÚNIOR, 2001).

Os genes 45S codificam rRNAs 5,8S, 18S e 28S, responsáveis pela formação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) (MANTOVANI, 2001). Esses genes, também, se repetem em tandem e possuem em cada repetição, um espaçador intergênico (IGS) e uma região codificante, cuja molécula com coeficiente de sedimentação 45S é transcrita.

As NORs são de fundamental importância na vida do organismo uma vez que ela transcreve rRNA, um componente dos ribossomos, responsáveis pelo processo traducional nos organismos (GARDNER, 1977).

Ocorrem nas regiões de rDNA, variabilidade que tornam possíveis diferenciar não somente espécies como, também, populações. A variabilidade das NORs é observada quanto ao número, localização, atividade, quantidade de rDNA ou número de cístrons ribossômicos presentes nas mesmas, bem como a organização das seqüências do rDNA e os mecanismos envolvidos na regulação da atividade desses cístrons (BICUDO, 1985). Aparentemente, o número de nucléolos visíveis, durante a intérfase, pode indicar o número mínimo de NORs ativas em um determinado animal (ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 1985).

A metodologia mais empregada para observar as NORs é a descrita por Howell e Black (1980) onde é utilizado sal de Prata. A Prata cora seletivamente as proteínas associadas ao rDNA dos cromossomos metafásicos. Contudo, esta metodologia indica apenas os genes do sítio rDNA que apresentaram atividades na intérfase precedente, sendo assim é necessário a associação de outras metodologias para indicar o número real de cromossomos portadores dos sítios rDNA.

As NORs são classificadas por sistema simples quando apenas um par cromossômico é portador de cístrons nucleolares ou sistema múltiplo, quando mais de um par é portador destes cístrons.

Há vários grupos de peixes onde as NORs parecem conservadas com localização invariável entre os indivíduos; para estes grupos elas são importantes

marcadores citotaxonômicos. Pode-se citar, como exemplo, o gênero *Brycon*. Wasco e Galetti-Júnior (2000), detectaram em sete espécies desse gênero, por hibridação *in situ* com sonda rDNA, sítios ribossômicos sempre presentes em apenas um par cromossômico, confirmando o alto nível de estabilidade das NORs nesse grupo de peixes. Contrastando com este fato vários outros grupos apresentam NOR amplamente variável (ABEL, 2001, entre outros).

Wasco et al. (1996) detectaram a presença de polimorfismo inter e intraindividual no tamanho da NOR além da variação no número de cromossomos de *Bryconamericus* sp A e *Bryconamericus* sp B do rio Piracicaba (Município de Piracicaba – SP). Diferenças no tamanho das NORs também foram notadas em exemplares de *Rineloricaria latirostris* da bacia do rio Paraná (GIULIANO-CAETANO, 1998), *Plagioscion squamosissimus* e *Plagioscion* sp (Scianidae) da bacia Amazônica (FELDBERG et al., 1999) além de outras espécies de diferentes bacias. Em análises citogenéticas de três gêneros da família Syngnathidae, apenas duas espécies, do gênero *Syngnathus*, apresentaram número diplóide, NOR e tipos cromossômicos semelhantes e duas espécies do gênero *Hippocampus* mostraram-se semelhantes apenas quanto ao sistema de NOR (VITTURI et al., 1998).

Em ampla revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais, Oliveira e Foresti (2000) descreveram que, até o ano de 2000, já havia 821 espécies e/ou populações com número e/ou localização das regiões organizadoras de nucléolos descritas.

Maistro et al., 2000b observaram na espécie *Prochilodus lineatus*, por meio de CMA₃ a presença de apenas um par cromossômico portador de NORs. Souza (2001) evidenciou, através de FISH com sonda de rDNA, que nem todas as regiões destacadas pelos fluorocromos GC específicos, na espécie *A. scabripinnis*, correspondiam a *locus* de rDNA e alguns desses *locus* não foram detectados por fluorocromos. Uma população do córrego Piracuama (Bacia Paraíba do Sul), submetida ao bandeamento C, AgNOR e ao fluorocromo DAPI mostrou dois pares subtelocêntricos positivos para os três tratamentos (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995).

A sonda de DNA satélite As51 também foi empregada na análise de heterocromatina. Tal sonda As51 trata-se do clone de uma “porção” do DNA

satélite de uma população de *A. scabripinnis* obtido por Mestriner et al. (2000). Na sonda, 59% das bases nitrogenadas constituintes da unidade 51pb são compostas por bases AT e estão situadas nos blocos distais dos cromossomos acrocêntricos, nas NORs e no cromossomo supranumerário da população descrita. Em análise comparativa da organização estrutural da heterocromatina constitutiva entre duas populações de *A. scabripinnis* (bacia do rio Paranapanema), Mantovani (2001) utilizou a sonda de DNA satélite As51 e coloração com fluorocromos GC específicos observando, pelo menos, duas classes de heterocromatina. Na primeira, as heterocromatinas proximais não apresentaram homologia com a seqüência da sonda e a resposta foi negativa aos fluorocromos; já na segunda, classe as heterocromatinas distais responderam positivamente frente aos dois tratamentos, sugerindo uma heterogeneidade heterocromática nas populações. A heterocromatina distal das duas populações, apesar de ter apresentado a mesma composição, como evidenciado por FISH-As51, frente ao tratamento DA/DAPI não apresentou brilho.

As técnicas usadas no bandeamento são ferramentas importantes no pareamento de cromossomos homólogos e fornecem, também, subsídios para um melhor entendimento dos processos evolutivos (rearranjos) ocorridos nos cromossomos tanto de peixes como em outros animais e auxiliam no agrupamentos de espécies próximas.

1.4. Cromossomos supranumerários

“Variação cromossômica, ou cariotípica, pode ocorrer entre diferentes células do indivíduo, entre indivíduos diferentes da mesma população ou entre populações diferentes da mesma espécie”. Os dois principais tipos de variações cromossômicas observadas são: as numéricas (haploidias, poliploidias, aneuploidias, disploidias, agmatoploidias e cromossomos B) e as estruturais (deleções, duplicações, inversões, transposições, translocações e isocromossomos) (GUERRA, 1988). As variações mais comuns encontradas na maioria dos casos são devidas à presença de supranumerários, fusões robertsonianas ou fissões (MAYR, 1977).

Além dos cromossomos do complemento diplóide padrão, os chamados cromossomos A, eventuais cromossomos extras, podem aparecer na célula e recebem o nome de cromossomos supranumerários, B ou acessórios. "São elementos genômicos encontrados em diferentes organismos, aparentemente, desprovidos de função gênica específica" (FORESTI, 1998).

A origem do cromossomo B ainda não está esclarecida, mas alguns pesquisadores sugerem variados mecanismos para tentar explicar uma possível origem destes cromossomos. Duas hipóteses são levantadas por Volobujev (1981 apud NÉO, 1999): na primeira ele propõe que "os cromossomos B seriam remanescentes de rearranjos estruturais que ocorreram na evolução do cariótipo ancestral" e na outra, os mesmos poderiam ter surgido de uma não disjunção dos autossomos ou sexuais e, posteriormente, inativação gênica. A origem a partir de fragmentos centroméricos, de cromossomos A, também é proposta (GUERRA, 1988). Outra hipótese sugerida é de que os cromossomos supranumerários possam ser isocromossomos (VICENTE et al., 1996).

Foresti (1998), propõe uma hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos B em peixes com base no conhecimento da estrutura molecular, seqüências nucleotídicas e evidências de fragmentos livres de DNA de origem não cromossômica. A associação, ao acaso, de seqüências de nucleotídeos poderia formar uma estrutura estável se seqüências estabilizadoras teloméricas e seqüências com funções centroméricas constituiriam essa nova estrutura, sendo que no início da sua formação, a mesma seria desprovida de função transcricional e, posteriormente, poderia apresentar segmentos ativos dos cromossomos do complemento A.

Já foi constatada a presença de cromossomos supranumerários em vários organismos. Até o ano de 1982, já tinham sido observados em mais de 1000 espécies de plantas e mais de 250 espécies de insetos. Foram descritos com tamanhos que variam desde microcromossomos, menores do que os cromossomos A até macrocromossomos, maiores que os cromossomos A. Além dessa variação no tamanho, grandes variedades na morfologia, constituição e quantidade de heterocromatina constitutiva, também, podem ser observadas.

Exemplos destas variações podem ser evidenciados em uma população de *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae) onde dois tipos de cromossomos

supranumerários foram relacionados: um indivíduo portava um pequeno supranumerário totalmente heterocromático e o segundo, um grande cromossomo com apenas os telômeros marcados; nenhum exibiu marcações após tratamento com DAPI ou CMA₃ (ROSA et al., 2000).

Muitos estudos indicam que os cromossomos supranumerários não trazem nenhuma vantagem ou não apresentam nenhuma influência aos seus portadores, mas outros relatam sobre as influências destes em determinados grupos. Em fungos da espécie *Nectria raematococca*, o cromossomo B proporciona-lhe resistência à toxinas (MIAO et al., 1991 apud NÉO, 1999); em planta da espécie *Haplopappus gracilis*, modificações nas folhas, caules e aquênios são atribuídas à presença de cromossomos B. Algumas plantas portadoras de cromossomos supranumerários, também, podem apresentar efeitos semelhantes aos de indivíduos trissômicos, onde são claramente observados efeitos no vigor vegetativo, no desenvolvimento do endosperma e na fertilidade. Tais efeitos podem ser observados em *Anthoxanthum aristatum*, *Secale cereale*, *Festuca pratensis* e *Lilium callosum* (JOHN, 1980).

Em alguns indivíduos de roedores do gênero *Akodon*, foram observados cromossomos supranumerários submetacêntricos com evidência de atividade gênica, atividade devida à presença de regiões organizadoras de nucléolos em ambos os telômeros sugerindo, assim, que estes poderiam conter informações gênicas (GUERRA, 1988).

A primeira citação na literatura de cromossomos B em peixes neotropicais, foi em 1981, por Pauls, onde ela descrevia a presença de microcromossomos na maioria dos exemplares de *Prochilodus lineatus* analisados (citado como *Prochilodus scrofa*). Posteriormente, em muitos outros trabalhos foram e tem sido citada ocorrência desses cromossomos em outras famílias de peixes.

Os cromossomos supranumerários foram observados em indivíduos de várias famílias da ordem Characiformes. Algumas delas são: Anostomidae, Crenuchidae, Prochilodontidae (VENERE et al., 1999; ANDRIONI et al., 2000), Parodontidae, Curimatidae (VENERE; GALETTI-JÚNIOR, 1985; MARTINS et al., 1996), Characidae (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; NÉO, 1999; FERRO, 2000; TORRES-MARIANO, 2001) e Pimelodidae (ANDRADE et al., 1998)

Em exemplares de *Rhamdia hilarii* da represa de Monjolinho (São Carlos – SP) foram observados de um a cinco cromossomos extras de tamanho médio (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990). Andrade et al. (1998) analisando uma população de *Rhamdia* sp da represa de Furnas (rio Sapucaí - MG) constataram a presença de 0 a três supranumerários que, submetidos aos bandamento C, mostraram-se heterocromáticos apenas em regiões teloméricas sendo essas CMA₃. Fenocchio et al. (2000), registraram, ainda, a presença de um a quatro cromossomos supranumerários do tipo metacêntrico em espécies do gênero *Rhamdia* de sete localidades no Brasil e Argentina, os quais portavam blocos heterocromáticos conspícuos na região distal de ambos os braços. Em *Leporinus friderici* (rio Candeias – RO e rio Araguaia - MT), *Leporinus* sp, (córrego Dois de Agosto - MT) e *Characidium cf zebra* foram observados pequenos cromossomos extras do tipo acrocêntrico e em *Cyphocharax modesta*, *Prochilodus nigricans*, os pequenos extras observados apresentaram outra morfologia (VENERE et al., 1999).

Dentre as espécies que compõem o gênero *Astyanax*, *A. scabripinnis* é a que apresenta o maior relato de ocorrências de cromossomos B em populações estudadas. Entretanto, estão descritos estes tipos cromossômicos em *A. fasciatus* da calha principal do rio São Francisco (JUSTI, 1993), em *A. eigenmanniorum* proveniente do rio Atibaia (Campinas – SP), nos quais o número 2n foi igual a 51 e o supranumerário com tamanho correspondente ao segundo par do complemento (STRIPECKE et al., 1985). Em três espécimes de *A. eigenmanniorum* do córrego dos Caetano (Uberlândia – MG) o cromossomo B observado foi do tipo metacêntrico grande e totalmente heterocromático, quando submetido ao bandamento C e o número diplóide caracterizado por 49 cromossomos (TORRES-MARIANO, 2001). Moreira-Filho et al. (2001) descrevem a presença de supranumerários em *A. fasciatus* do rio São Francisco e em *A. schubarti* do rio Paraná, ambos metacêntricos com tamanho semelhante ao primeiro par do complemento.

Em *A. scabripinnis*, ocorrem cromossomos B de diferentes tipos quanto à morfologia, quantidade e distribuição de heterocromatina. Salvador e Moreira-Filho (1992) ao analisarem espécimes do córrego das Pedras (Campos do Jordão – SP), observaram a presença de cromossomos B grandes do tipo metacêntrico

com dois padrões de distribuição da heterocromatina: 1) totalmente heterocromático e 2) blocos eucromáticos em cada lado do centrômero e o restante heterocromático para ambos os sexos, com exceção de uma fêmea que apresentou os dois cromossomos B em 100% das metáfases. Maistro et al. (1994) descrevem a presença de cromossomos B grandes e totalmente heterocromáticos em três espécimes fêmeas de *A. scabripinnis* coletadas no córrego Cascatinha (Botucatu – SP).

Souza e Moreira-Filho (1995) compararam, citogeneticamente, duas populações de *A. scabripinnis* localizadas em duas altitudes (1800 e 780m) do córrego Piracuama, pertencente à Bacia Paraíba do sul (SP) e apenas um representante macho da população situada à 1800m portava cromossomo B, com tamanho semelhante ao maior cromossomo do complemento e totalmente heterocromático e com pequenos segmentos fracamente fluorescentes quando submetido ao tratamento com DAPI.

Grande parte dos trabalhos que tratam dos cromossomos B relata maior número de ocorrência deles em exemplares fêmeas. Porto-Foresti et al. (1997), analisando espécimes de *A. scabripinnis paranae* de três diferentes trechos do córrego Cascatinha – SP observaram diferença significativa na frequência de cromossomo B, quando comparados quanto ao sexo dos animais, sendo que este estava presente em 57% das fêmeas e em apenas 8,7% dos machos. No entanto, já foi descrita a presença de microcromossomos restritos à exemplares machos (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO; 1993; ARAUJO; MORELLI, 2000).

Tendo em vista esses dados, são necessários amplos estudos correlacionando a presença do cromossomo supranumerário, com dados genéticos-bioquímicos e ecológicos para esclarecer o motivo da ocorrência destes em *A. scabripinnis*.

2. Capítulo I

Comparação Citogenética de Quatro Populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da Região do Triângulo Mineiro.

2.1. Abstract

There has been done a cytogenetic analysis in *Astyanax scabripinnis* specimen coming from 4 populations from the Triângulo Mineiro region (Uberlândia and Campina Verde). All of them presented 50 chromosomes diploid number but only four male specimen had shown the supernumerary chromosome ($2n=50+1B$). The silver stain has shown multiple NORs systems. The constitutive heterochromatine blocks were localized at the centromeric and pericentromeric regions in some chromosomes, besides an interstitial band in an acrocentric chromosome (Cruz da Retirada Bonita stream population). The cromomicine A_3 (CMA_3) use have indicate the AgNORs sites, which presented themselves CMA_3^+ . The fluorochromomes have proved other rich GC chromosomic regions further those NORs correspondent shown by silver.

2.2. Introdução

Na América do Sul o grupo mais complexo entre os Characiformes, segundo Britski et al. (1988) é a família Characidae, compreendendo cerca de 30 subfamílias e representando um grande conjunto de peixes de água doce. Nesta família é encontrada grande "parte" dos peixes de escamas conhecidos no Brasil, estes que apresentam imensa variedade de formas (BRITSKI, 1972).

Na família Characidae encontra-se uma das espécies mais estudadas citogeneticamente - *Astyanax scabripinnis*. O primeiro trabalho citogenético realizado com essa espécie foi em 1978 por Moreira-Filho et al. em uma população proveniente do ribeirão dos Bicudos (Brotas - SP), onde o número diplóide observado foi de 50 cromossomos. Em seguida vários outros estudos foram e estão sendo realizados em populações dessa espécie provenientes de

diferentes bacias hidrográficas, evidenciando três números cromossômicos distintos, sendo $2n=46$ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; VIEIRA et al., 1998; KANAYAMA; GIULIANO-CAETANO, 2002) $2n=48$ (SOUZA et al., 1995; SOUZA et al., 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; MANTOVANI et al., 2000; MAISTRO et al., 2000a; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2002) e $2n=50$ que até o momento, é o número mais comum (MOREIRA-FILHO et al., 1978; VICENTE et al., 1996; MESTRINER et al., 2000 entre outros). Além da variabilidade presente no número diplóide também é observada grande diversificação quanto ao padrão de heterocromatina constitutiva, morfologia cromossômica, tamanhos e quantidade de regiões organizadoras de nucléolos e presença ou ausência de cromossomos supranumerários. O emprego de várias técnicas como, bandamento C, fluorocromos base-específicos, enzimas de restrição, FISH, detecção de NOR tem fornecido resultados importantes sobre a estrutura cromossômica e possibilitando a diferenciação de muitas populações (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; SOUZA et al. 1995; MESTRINER et al. 2000).

As variações observadas na estrutura cromossômica de *A. scabripinnis* podem ser devidas ao fato dessa espécie possuir distribuição geográfica restrita à cabeceiras de riachos, córregos e rios, contribuindo com o isolamento geográfico das populações.

Tendo em vista estes dados o presente, trabalho teve por objetivo comparar quatro populações de *A. scabripinnis* provenientes de duas bacias hidrográficas diferentes para acrescentar dados aos eventos evolutivos ocorridos nestas populações.

2.3. Material e Métodos

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* foram coletados em nascentes de quatro córregos: córrego Jataí, córrego dos Caetano (ambos localizados no município de Uberlândia - MG), córrego Cruz da Retirada Bonita e córrego da Manga (localizados no município de Campina Verde - MG) sendo que os três primeiros pertencentes à bacia do rio Paranaíba e o quarto pertencente à bacia do rio Grande (Anexo 5.1.1).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos pelas técnicas descritas por Bertollo et al. (1978) (Anexo 5.1.2.2.2) e Foresti et al. (1993) (Anexo 5.1.2.2.1), ambas adaptadas para a espécie estudada. A heterocromatina constitutiva foi obtida por meio da técnica descrita por Sumner (1972) modificada (Anexo 5.1.2.3.2). As NORs foram detectadas utilizando-se a técnica descrita por Howell e Black (1980) com modificações (Anexo 5.1.2.3.1). As heterocromatinas “ricas” em bases GC foram observadas pela técnica de coloração com Cromomicina A₃ descrita por Schmid (1980) (Anexo 5.1.2.3.3). A morfologia de cada cromossomo foi estabelecida conforme a nomenclatura proposta por Levan et al. (1964) (Anexo 5.1.2.4).

2.4. Resultados

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* dos córregos, Cruz da Retirada Bonita, da Manga e dos Caetano apresentaram um número diplóide modal de 50 cromossomos em ambos os sexos (Figuras 1a, b e c). Já na população do córrego Jataí, quatro exemplares machos apresentaram um microcromossomo extra diferenciando-se dos demais espécimes dessa mesma população, que apresentaram 50 cromossomos (Figuras 2a e b). Como pode ser observado nos cariótipos, as macroestruturas das quatro populações apresentaram pequenas diferenças entre si (Figuras 1 e 2). Na tabela I pode-se observar o número diplóide, a quantidade de cada tipo cromossômico e o número fundamental das populações analisadas.

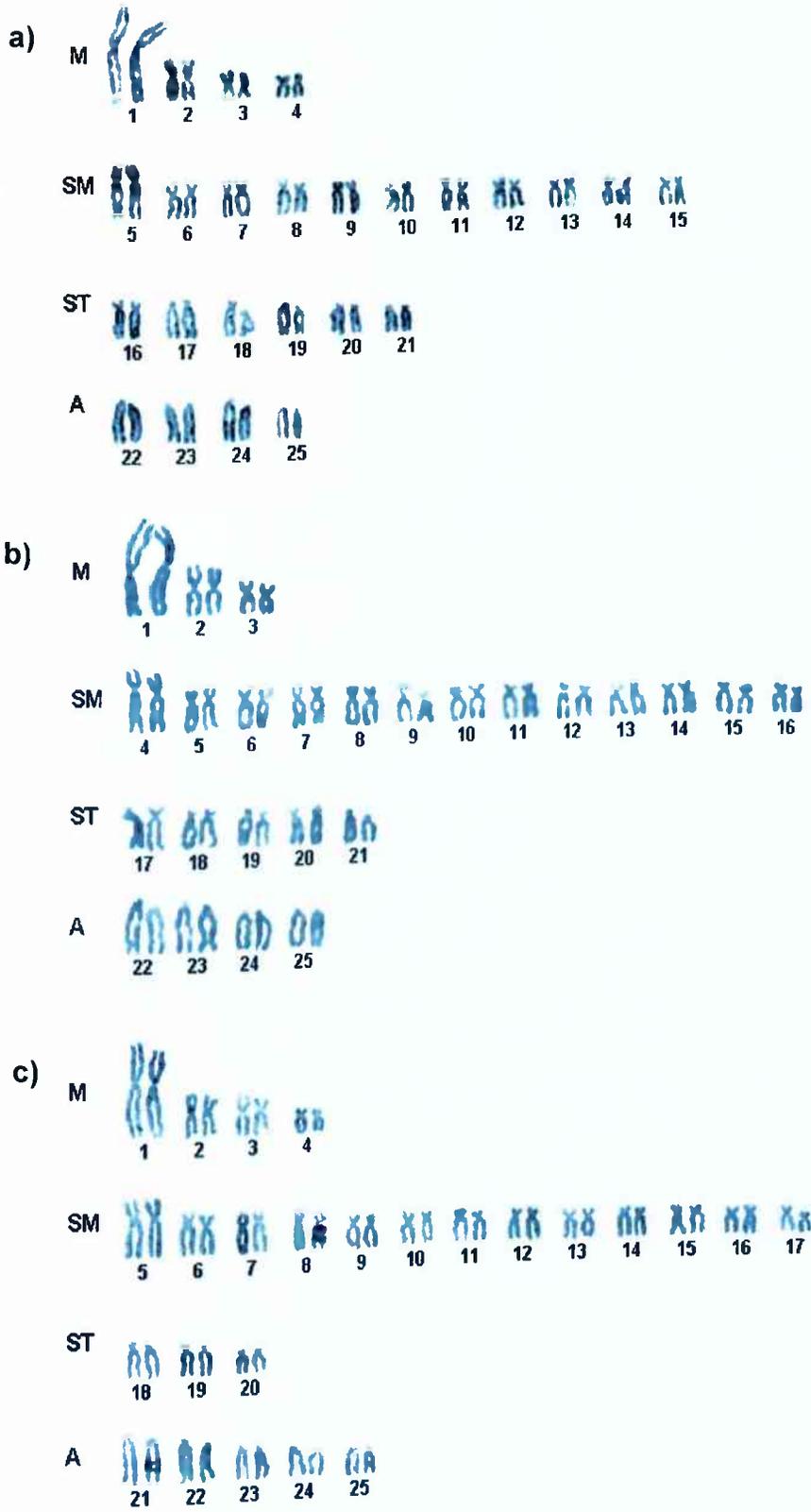


Figura 1. Cariótipos representativos de três populações *Astyanax scabripinnis*: (a) exemplar fêmea do córrego Cruz da Retirada Bonita, (b) exemplar fêmea do córrego da Manga, (c) exemplar macho do córrego dos Caetano.

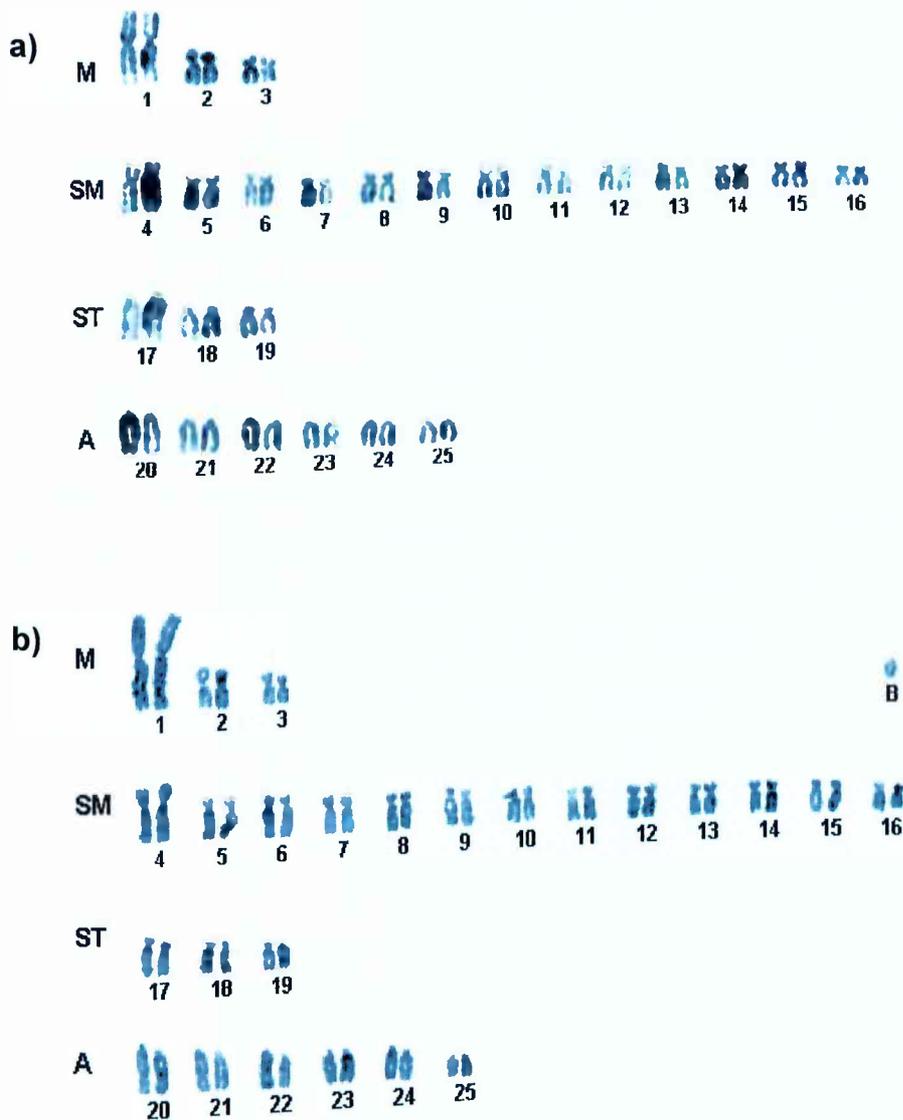


Figura 2. Cariótipos representativos da população de *Astyanax scabripinnis* do córrego Jataí: (a) exemplar fêmea e (b) exemplar macho portador de microcromossomo supranumerário.

Tabela I. Número diplóide, tipos cromossômicos e números fundamentais (NF) encontrados nas 4 populações.

Locais das Coletas	2n	M	SM	ST	A	NF
Córr.Cruz da R. Bonita ¹	50	8	22	12	8	92
Córrego da Manga ²	50	6	26	10	8	92
Córrego dos Caetano ¹	50	8	26	6	10	90
Córrego Jataí ¹	50/51	6	26	6	12	88

Abreviaturas: 2n = número diplóide, M = cromossomo metacêntrico, SM = cromossomo submetacêntrico, ST = cromossomo subteloicêntrico, A = cromossomo acrocêntrico, NF = número fundamental, ¹ bacia do rio Paranaíba, ² bacia do rio Grande.

As análises das regiões organizadoras de nucléolos com AgNO₃ mostraram tanto animais com apenas um cístron ribossômico ativo como mais de um par por célula (Figura 3). Após tratamento com fluorocromo GC específico Cromomicina A₃ (CMA₃), em exemplares dos córregos Cruz da Retirada Bonita, dos Caetano e Jataí, algumas destas regiões correspondentes às NORs mostraram-se intensamente brilhantes além de outras regiões brilhantes não correspondentes às NORs (Figura 4). O cromossomo supranumerário não apresentou brilho fluorescente após tratamento com CMA₃ (Figura 4d).

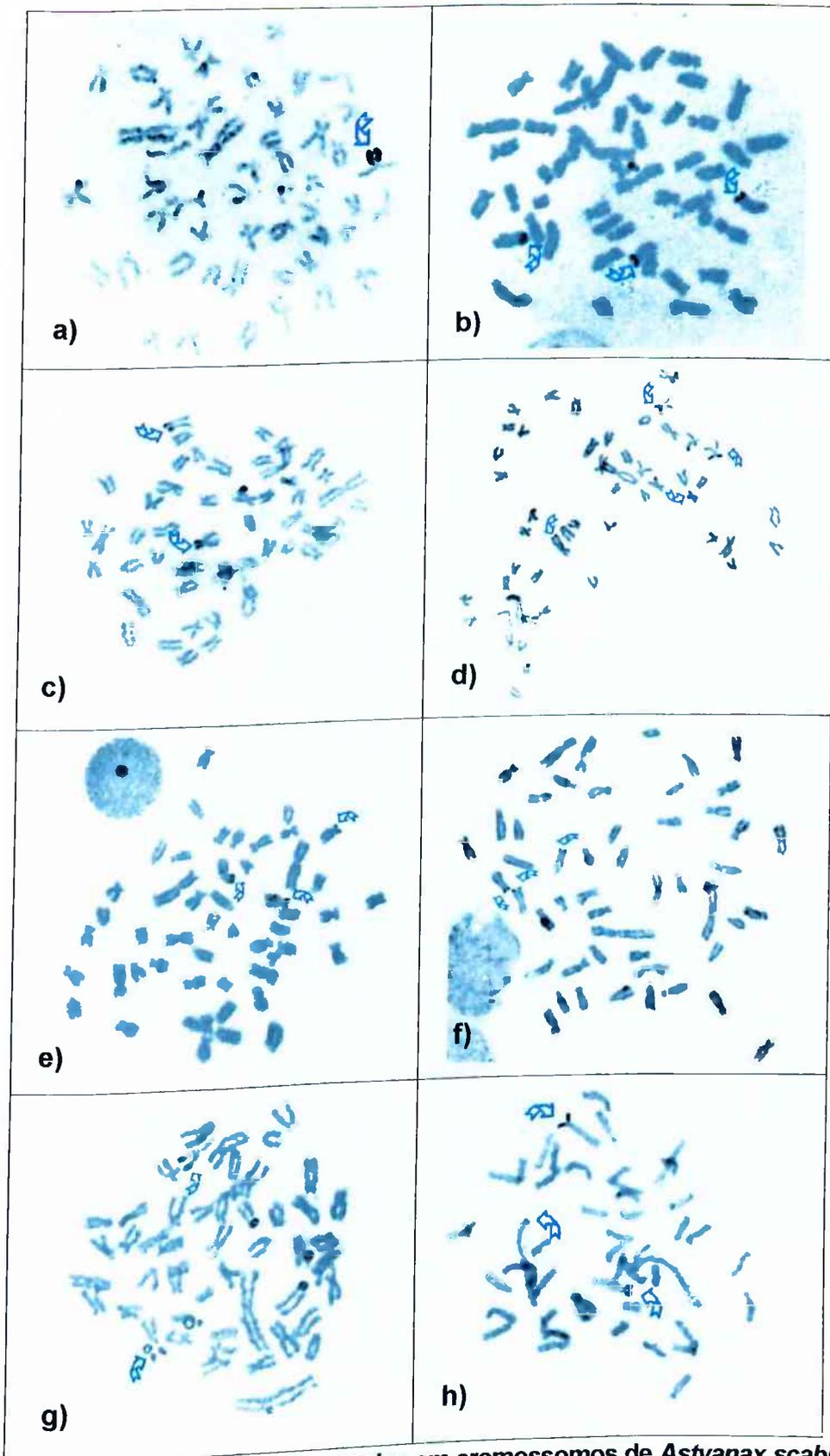


Figura 3. Variação das Ag-NORs observadas em cromossomos de *Astyanax scabripinnis*. As setas indicam os cromossomos portadores de NOR: (a) e (b) metáfases de indivíduos da população do córrego Cruz da Retirada Bonita, (c) e (d) córrego da Manga, (e) e (f) córrego dos Caetano e (g) e (h) córrego Jatái.

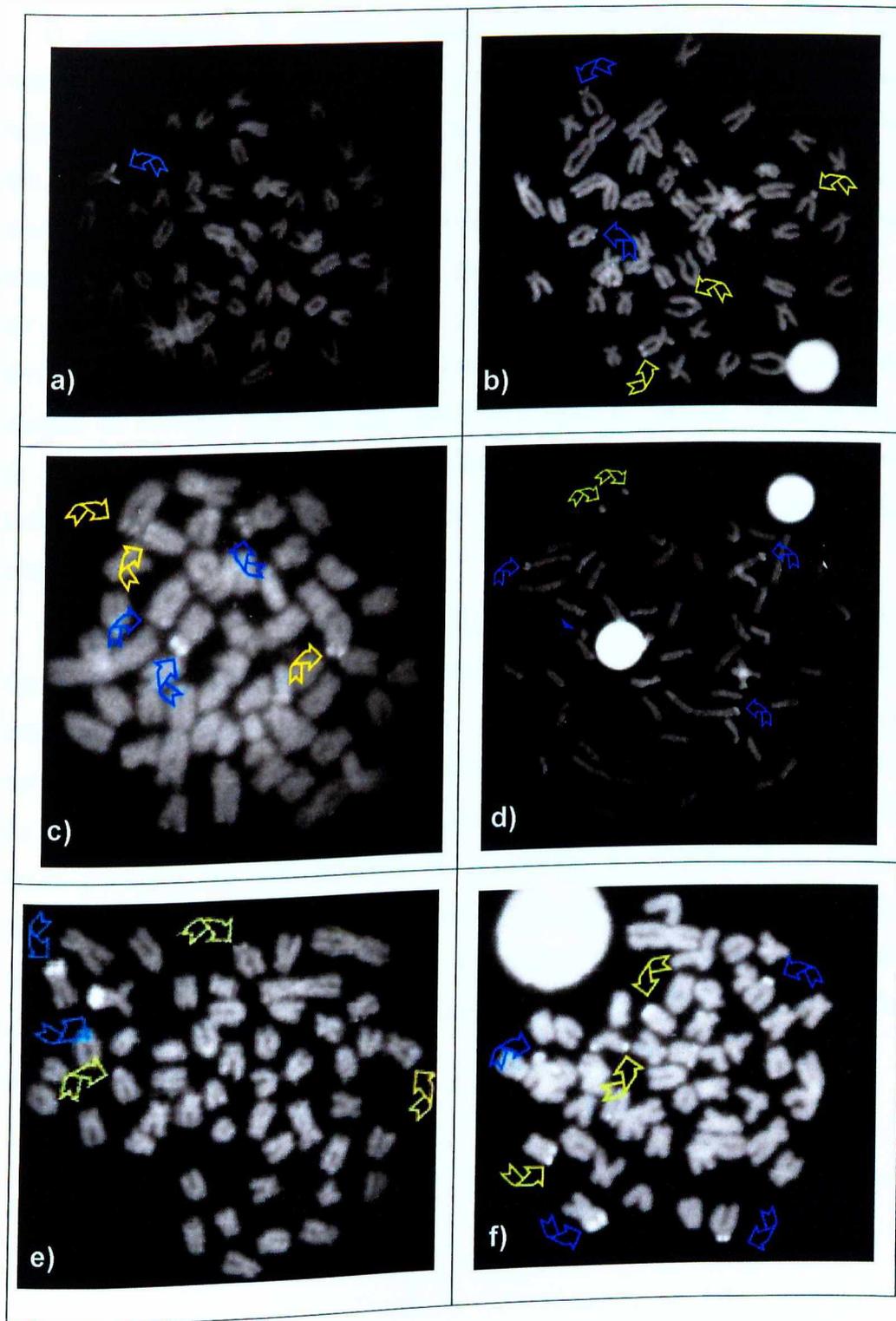


Figura 4. Metáfases de exemplares de *Astyanax scabripinnis* mostrando resposta ao fluorocromo Cromomicina A₃. As setas azuis indicam regiões correspondentes a NORs, as setas amarelas indicam regiões não correspondentes a NORs e a cabeça da seta indica o cromossomo B: (a) e (b) exemplares do córrego Cruz da Retirada Bonita, (c) exemplar do córrego dos Caetano e (d), (e) e (f) exemplares da população do córrego Jataí.

O bandamento C revelou marcas centroméricas em quase todos os cromossomos do complemento das quatro populações. Os exemplares dos córregos Cruz da Retirada Bonita e dos Caetano foram os que mais apresentaram blocos heterocromáticos. Na população do córrego Cruz da Retirada Bonita, os blocos localizam-se predominantemente em posição telomérica do braço maior de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos além de uma marca no braço menor de um submetacêntrico. Essa população apresentou banda intersticial próxima ao centrômero de um cromossomo acrocêntrico (Figura 5a). Na população do córrego dos Caetano, os blocos, na sua maioria, localizaram-se no braço menor de cromossomos submetacêntrico/subtelocêntrico, em um par metacêntrico e na extremidade do braço maior do primeiro par submetacêntrico (Figura 5b).

O emprego do bandamento C permitiu visualizar nas populações dos córregos Jataí e da Manga uma quantidade menor de blocos heterocromáticos se comparadas às outras duas populações acima descritas (Figuras 5c, d e e). Os exemplares do córrego Jataí, submetidos a esse bandamento, apresentaram blocos heterocromáticos presentes no segundo par metacêntrico (Figura 5d). O indivíduo portador de cromossomo B submetido ao bandamento C mostrou marcação na extremidade do braço maior de um par submetacêntrico, em apenas um dos homólogos do segundo par metacêntrico, no braço menor de um cromossomo submetacêntrico/subtelocêntrico e cromossomo B totalmente heterocromático (Figura 5c).

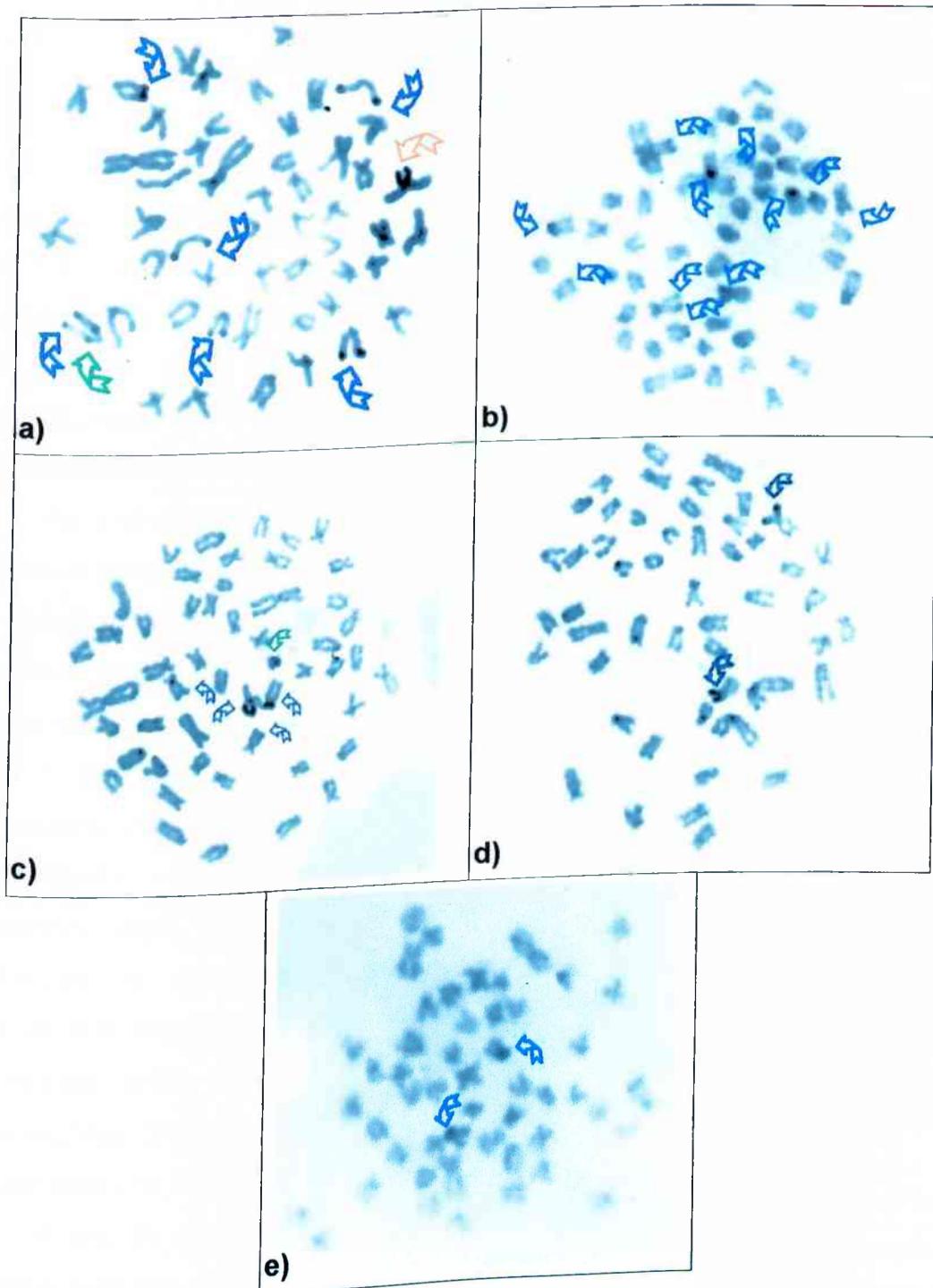


Figura 5. Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. As setas indicam blocos heterocromáticos: (a) córrego Cruz da Retirada Bonita. A seta verde indica heterocromatina intersticial, a seta laranja possível cromossomo doador de heterocromatina, (b) córrego dos Caetano, (c) córrego Jataí. A seta verde mostra cromossomo supranumerário totalmente heterocromático, (d) córrego Jataí e (e) córrego da Manga.

2.5. Discussão

O número $2n$ igual a 50 cromossomos, observado nas quatro populações aqui estudadas vem confirmar a predominância de ocorrência desse número cromossômico para a espécie *A. scabripinnis* (VICENTE et al., 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; MAISTRO et al., 2000a). Com menor frequência, o citótipo $2n=48$ (MAISTRO et al., 2000a; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; SOUZA et al., 1996; SOUZA et al., 1995) também foi descrito em algumas populações e raramente $2n=46$ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; ABEL, 2001). Estes dados sugerem que $2n=50$ seria a forma ancestral e, provavelmente, fusões cromossômicas resultaram na redução do número de cromossomos no complemento de algumas populações dessa espécie.

As macroestruturas cariotípicas das quatro populações apresentaram pequenas diferenças entre si (Figuras 1 e 2). Pode-se notar que as populações dos córregos Cruz da Retirada Bonita e da Manga, ambas localizadas no município de Campina Verde - MG, apesar de estarem situadas em bacias hidrográficas diferentes, apresentaram o mesmo número fundamental (92), isto se deve à presença de oito cromossomos acrocêntricos, enquanto que as populações dos córregos Jataí e dos Caetano mostraram maior número de cromossomos acrocêntricos, conseqüentemente, com número fundamental menor (88 e 90 acrocêntricos, respectivamente) (Tabela I). Não podem ser descartados os fatos de que diferenças na condensação dos cromossomos, no tamanho dos blocos heterocromáticos, tamanho das regiões organizadoras de nucléolos e os valores da relação entre os braços cromossômicos estarem próximos aos limites determinados para a classificação proposta por Levan et al. (1964) terem influenciado nas diferenças entre as fórmulas cariotípicas aqui descritas.

A análise citogenética comparativa entre as quatro populações mostrou distintos padrões de distribuição e quantidade de heterocromatina constitutiva assim como localização dos cístrons ribossômicos. Este não é um fato restrito a essas populações, pois estes tipos de variações são freqüentemente observadas em populações de *A. scabripinnis*. Moreira-Filho e Bertollo (1991) descreveram a ocorrência de seis padrões distintos de banda C em sete populações de bacias

hidrográficas diferentes e quatro padrões de distribuições foram descritos por Mizoguchi e Martins-Santos (1998) para exemplares das bacias dos rios Ivaí, Paranapanema e Paraná além da descrição de outros autores (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993; SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; SOUZA et al., 1995; MANTOVANI et al., 2000).

Os dados da literatura mostram que os blocos heterocromáticos, observados em *A. scabripinnis*, localizam-se predominantemente em regiões teloméricas de cromossomos subtelo/acrocêntricos (MANTOVANI et al., 2000; SOUZA et al., 2001; MAISTRO et al., 2001) e em contram-se equilocalmente distribuídas, ou seja, a heterocromatina constitutiva localiza-se preferencialmente na posição terminal dos cromossomos, possivelmente, devido a uma prévia configuração dos cromossomos em núcleos pré-meióticos (SCHWEIZER; LOIDL, 1987). Os exemplares do córrego Cruz da Retirada Bonita apresentam maior quantidade de blocos heterocromáticos (situados nos telômeros de cromossomos subtelo/acrocêntrico), quando comparados aos exemplares das outras três populações (Figura 5a) e foi a única população que mostrou banda intersticial, essa, localizada em um dos homólogos de um par acrocêntrico (Figura 5a), o que parece ser uma característica particular desta população, uma vez que não foram observadas nas outras três. A banda C intersticial poderia ser resultado de “transferências de heterocromatina entre locais próximos” no mesmo cromossomo ou entre cromossomos diferentes, como modelo proposto por Schweizer e Loidl (1987). Os mesmos autores sugerem que a heterocromatina telomérica localizada no braço curto de um dado cromossomo poderia ser em parte transferida para um cromossomo não homólogo. No caso desse não homólogo ser um acrocêntrico, o material transferido seria inserido intersticialmente “a uma distância do centrômero igual ao comprimento do braço curto com banda telomérica doadora de material”. Seguindo esse raciocínio a banda intersticial observada na população do córrego Cruz da Retirada Bonita poderia ser explicada como resultado da transferência de segmento heterocromático localizado no braço menor de um cromossomo submetacêntrico (indicado pela seta laranja na figura 5a). Um outro mecanismo que poderia explicar o surgimento dessa banda, seria a inversão pericentromérica, sugerida por Feldberg et al. (1999) para justificar a presença de NOR intersticial em um par cromossômico de *Plagioscion* sp da

bacia Amazônica. Margarido e Galetti-Júnior (2000) propõem que a heterocromatina intersticial observada no braço longo de cromossomos meta/submetacêntricos de *Leporinus desmotes* poderia ter surgido de um amplo processo de amplificação de um pequeno segmento de heterocromatina. Mantovani et al. (2000), atribui a ocorrência de heterocromatina intersticial (no braço maior de um par subtelocêntrico) em *A. scabripinnis* do ribeirão das Marrecas, ao mecanismo de translocação ou fusão em tandem envolvendo os braços longos de um par acrocêntrico pequeno sobre os braços longos de um par subtelocêntrico médio. Alternativamente, esses autores sugerem que a origem desta banda intersticial poderia ser pela dispersão da heterocromatina, seguindo o modelo de polarização de Rabl dos cromossomos descrito por Schweizer e Loidl (1987).

Um outro caso de diferenças entre homólogos foi observado em um indivíduo macho, portador de cromossomo supranumerário do córrego Jataí. Após tratamento com fluorocromo GC específico (Cromomicina A₃) foram observadas marcações biteloméricas com tamanhos semelhantes em um dos homólogos de um par subtelocêntrico (Figura 4d); uma possível hipótese para explicar este evento é o mecanismo de transposição. Nesse tipo de alteração, parte de um segmento, nesse caso, porções de segmentos "ricos" em bases GC, são transferidas de uma região para outra num mesmo cromossomo (GUERRA, 1988) dando origem a segmentos biteloméricos como os observados nesse espécime.

Outro aspecto polimórfico também relacionado por muitos autores é quanto ao comportamento das regiões organizadoras de nucléolos. Várias espécies de peixes submetidas à análise citogenética já tiveram as regiões nucleolares visualizadas pelo menos através do nitrato de Prata, que é a técnica mais empregada (WASKO et al., 1996; FELDBERG et al., 1999; MARGARIDO; GALETTI-JÚNIOR, 2000; MAISTRO et al., 2000b; ARBEX et al., 2002; dentre outros) e pode-se observar que a variabilidade das NORs é uma característica freqüentemente descrita para esses animais. As variações destas regiões geralmente são atribuídas a mecanismos de rearranjos cromossômicos como crossing-over desigual, duplicação "regional", às diferenças no tamanho e na atividade transcricional, dentre outros. O mecanismo de transposição tem sido

indicado como o principal responsável pela variabilidade observada nas NORs em peixes (GALETTI-JÚNIOR et al., 1995 apud MANTOVANI, 2001).

A impregnação com nitrato de Prata evidenciou que as populações aqui analisadas apresentaram um sistema de NOR múltiplas (Figura 3) apesar de terem sido notados exemplares com um ou dois cromossomos marcados (Figuras 3d e g). Este fato não implica que somente um cromossomo seja portador de cístrons ribossômico, pois a ausência de atividades desses cístrons impede a visualização do número real de regiões organizadoras de nucléolos, pois a Prata liga-se preferencialmente às proteínas presentes ao redor dos genes ribossômicos e não propriamente ao DNA ribossômico.

O emprego do fluorocromo GC específico, Cromomicina A₃, permitiu visualizar que as NORs encontram-se em regiões com afinidade aos fluorocromos GC específicos. A fluorescência emitida nestas regiões provavelmente é devida à grande quantidade de bases GC presente nas regiões espaçadoras dos genes ribossômicos (SCHMID; GUTTENBACH, 1988). Em alguns dos animais aqui analisados pôde-se observar um número maior de regiões positivas ao fluorocromo GC específico quando comparadas às regiões detectadas pelo nitrato de Prata (Figura 4). Este fato, talvez possa ser devido à ausência de atividade gênica dos cístrons ribossômicos ou os segmentos marcados serem seqüências heterocromáticas não relacionadas com os sítios AgNORs. Margarido e Galetti-Júnior (1999), confirmaram que somente um dos seis pares cromossômicos de *Leporinus desmotes* (rio Tocantins) marcados pela Mitramicina possuía cístron ribossômico. No entanto, Morelli (1998), ao analisar metáfases de *Hoplias* cf. *lacerdae* (Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Uberlândia), observou que as NORs não apresentavam correspondência com as regiões MM⁺ e parece que a especificidade dos fluorocromos GC específicos para os sítios de rDNA discutida por Schmid (1982) e Phillips e Ihssen (1985) não seja totalmente verdadeira. Souza et al. (2001) ao analisarem espécimes de *A. scabripinnis* córrego Canta Galo com FISH-rDNA, constataram que nem sempre os "clusters" apresentaram-se Cromomicina A₃ ou Mitramicina A positivas. Frente a esses dados, o emprego da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando sonda rDNA, seria uma excelente ferramenta para indicarem o número real destas regiões nas células do indivíduo.

O aumento progressivo de espécies de peixes estudadas citogeneticamente tem revelado, a cada dia, maior número de espécies portadoras de cromossomos supranumerários, que podem variar em tamanho, padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva e numericamente.

Os supranumerários já foram descritos para algumas populações de *A. scabripinnis* e alguns autores têm associado a presença deles à altitude do local do habitat e ao sexo do animal, uma vez que este é mais encontrado em indivíduos situados acima de 800 metros de altitude e em grande porcentagem de indivíduos fêmeas. Das quatro populações aqui analisadas, apenas na do córrego Jataí (891m) foi observada a presença de cromossomo supranumerário, este o menor do complemento e totalmente heterocromático (Figura 5c). A maioria dos cromossomos supranumerários descritos são provenientes de populações situadas à uma altitude superior a 800m. A nascente do córrego Jataí encontra-se nesta faixa de altitude, enquanto que as nascentes dos córregos Cruz da Retirada Bonita, da Manga e dos Caetano estão localizadas à altitude em torno de 650m. No entanto, Mizoguchi e Martins-Santos (1997 apud NÉO, 1999) descreveram caso esporádico, onde cromossomos B foram observados em *A. scabripinnis* situados a uma altitude em torno de 500m no córrego Yacutan e rio Água do Rancho. Esta aparente influência da altitude na freqüência de cromossomos supranumerários parece ser uma característica particular de *A. scabripinnis*, pois Torres-Mariano (2001) descreveu a presença desses cromossomos em alguns indivíduos de *A. eigenmanniorum* coletados, também, no córrego dos Caetano.

As diferenças citogenéticas (número e posicionamento das NORs, quantidade de segmentos heterocromáticos) observadas nas quatro populações de *A. scabripinnis*, provavelmente, podem ser atribuídas ao tipo de hábitat ocupado por esta espécie. Apesar de três populações pertencerem à mesma bacia hidrográfica, o comportamento de habitar preferencialmente cabeceiras de pequenos riachos é um indício que justifica tais diferenças, pois as barreiras físicas e a distância que separam as populações ocasionam o isolamento das mesmas e impedem a ocorrência de fluxo gênico favorecendo a fixação de possíveis alterações.

2.6. Resumo

Foram realizadas análises citogenética em espécimens de *Astyanax scabripinnis* provenientes de quatro populações da região do triângulo mineiro (Uberlândia e Campina Verde). As quatro populações apresentaram número diplóide igual a 50 cromossomos com exceção de quatro exemplares machos que apresentaram um cromossomo supranumerário ($2n=50+1B$). A impregnação pela Prata evidenciou um sistema de NORs múltiplas. Os blocos de heterocromatina constitutiva foram localizados na região centromérica e pericentroméricas de alguns cromossomos, além de uma banda intersticial num cromossomo acrocêntrico (população do córrego Cruz da Retirada Bonita). A utilização da Cromomicina A_3 (CMA_3) em metáfases de indivíduos dos córregos Cruz da Retirada Bonita, dos Caetano e Jataí indicou que os sítios AgNORs, apresentaram-se CMA_3^+ . Os fluorocromos evidenciaram outras regiões cromossômicas "ricas" em bases GC além daquelas correspondentes às NORs evidenciadas pela Prata.

2.7. Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas estão reunidas no item 6. Referências Bibliográficas

3. Capítulo II

Ocorrência de Microcromossomo Supranumerário em Machos de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)

3.1. Abstract

Besides the chromosomes pattern diploid complement, the ones called A chromosomes, eventually extra chromosomes can appear in the cell, and they are named supernumerary chromosomes, extra, accessories or Bs. In the Characidae family, *Astyanax scabripinnis* stands out for being the species that possesses described individuals bearing the B chromosomes, besides many other karyotypical variations. In this present paper it has been done cytogenetic studies in some *A. scabripinnis* specimen from Jatai stream nascent. It has been noticed the presence of a 50 chromosome diploid number but some male specimen bearing $2n=50+1B$. The AgNORs system has been characterized as multiple and these regions are shown to be positive C banding. The specific GC fluorochromes have shown other rich GC chromosomal regions further those AgNORs correspondent.

3.2. Introdução

Além dos cromossomos do complemento diplóide padrão, os chamados cromossomos A, eventuais cromossomos extras, podem aparecer na célula e recebem o nome de cromossomos supranumerários, extras, acessórios ou B.

Vários casos de ocorrência de cromossomos B são relatados em peixes da região neotropical. Um dos primeiros casos descritos neste grupo, foi na espécie *Prochilodus lineatus* (citado como *Prochilodus scrofa*) onde se observou a presença de Bs em quase todos os exemplares analisados (PAULS, 1981). Posteriormente com a ampliação de estudos citogenéticos em peixes, a presença deste tipo cromossômico mostrou-se mais freqüente. Muitas famílias já foram descritas como sendo portadoras de B, sendo algumas delas: Curimatidae (VENERE; GALETTI-JÚNIOR, 1985; MARTINS et al., 1996), Anostomidae,

Crenuchidae (VENERE et al., 1999), Prochilodontidae (VENERE et al., 1999; ANDRIONI et al., 2000), Pimelodidae (ANDRADE et al., 1998), Characidae (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; NÉO, 1999; FERRO, 2000; TORRES-MARIANO, 2001).

Na família Characidae, a espécie *Astyanax scabripinnis* destaca-se por ser a espécie que mais possui indivíduos descritos portadores de Bs, além de várias outras variações cariotípicas. No entanto os supranumerários já foram descritos em *A. fasciatus* da calha principal do rio São Francisco (JUSTI, 1993) em *A. eigenmanniorum* de duas localidades; rio Atibaia (Campinas - SP) (STRIPECKE et al., 1985) e córrego dos Caetano, Uberlândia – MG (TORRES-MARIANO, 2001). Moreira-Filho et al. (2001) descrevem a presença de supranumerários em *A. fasciatus* do rio São Francisco e em *A. schubarti* do rio Paraná, ambos metacêntricos com tamanho semelhante ao do primeiro par do complemento.

Grande parte das populações de *A. scabripinnis* estudadas portadoras destes cromossomos apresentaram um único cromossomo B e, raramente, dois (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; NÉO, 1999). Geralmente, este é metacêntrico com tamanho semelhante ao primeiro par do complemento A. Em alguns estudos o bandamento C permitiu identificar diferentes comportamentos de distribuição da heterocromatina: cromossomo totalmente heterocromático e parcialmente heterocromático.

3.3. Material e Métodos

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* foram coletados na nascente do córrego Jataí (891 metros de altitude), localizada no Parque do Sabiá em Uberlândia-MG.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos através das técnicas descritas por Bertollo et al. (1978) (Anexo 5.1.2.2.2) e Foresti et al. (1993) (Anexo 5.1.2.2.1), ambas adaptadas para a espécie estudada. A heterocromatina constitutiva foi obtida por meio da técnica descrita por Sumner (1972) modificada (Anexo 5.1.2.3.2). As NORs foram observadas utilizando-se a técnica descrita por Howell e Black (1980) com modificações (Anexo 5.1.2.3.1). As heterocromatinas “ricas” em bases GC foram visualizadas pela técnica de coloração com

Cromomicina A₃ descrita por Schmid (1980) (Anexo 5.1.2.3.3). A morfologia dos cromossomos foi estabelecida conforme a nomenclatura proposta por Levan et al. (1964) (Anexo 5.1.2.4).

3.4. Resultados

Foram observadas metáfases em condições de análise em 12 exemplares (3 fêmeas e 9 machos). Constatou-se um número diplóide $2n=50$ cromossomos para ambos os sexos, com exceção de 4 exemplares machos que apresentaram $2n=50+1B$ cromossomos (Gráficos 7 e 8 em Anexo 5.2). O cromossomo supranumerário observado é o menor do complemento e aparentemente do tipo acrocêntrico. De acordo com a classificação de Levan et al. (1964), os cromossomos foram distribuídos nos kariótipos da seguinte forma: 3 pares de cromossomos metacêntricos (M), 13 pares de submetacêntricos (SM), 3 pares de subtelocêntricos (ST) e 6 pares de acrocêntricos (A) (Figura 1), caracterizados por um número fundamental (NF) igual a 88.

A análise das regiões organizadoras de nucléolos pela de impregnação com AgNO₃ evidenciou, predominantemente, marcação telomérica no segundo par metacêntrico (Figura 2a) e esporadicamente no braço menor de um par subtelocêntrico. Já os exemplares portadores de supranumerário apresentaram cístrons ribossômicos no braço menor de um par subtelocêntrico e em um dos homólogos do primeiro par (Figura 2b).

Não foi possível observar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, mas pode-se observar blocos heterocromáticos teloméricos coincidentes com as regiões AgNORs (Figuras 2c e d). Os blocos heterocromáticos observados nos espécimens portadores de B estavam presentes em um dos homólogos do segundo par metacêntrico, no braço menor de um cromossomo submeta/subtelocêntrico, na extremidade do braço maior do par submetacêntrico e o cromossomo supranumerário mostrou-se totalmente heterocromático (Figura 2d).

O emprego do fluorocromo CMA₃ evidenciou marcas teloméricas em alguns cromossomos, como podem ser observadas na figura 3. Algumas destas regiões foram correspondentes com os cístrons ribossômicos. Apenas dois

exemplares portadores de B foram submetidos ao tratamento com CMA₃ e um destes apresentou marcação na região terminal de um cromossomo do primeiro par, coincidente com a marcação AgNO₃ e um cromossomo subtelocêntrico com marcação bitelomérica (Figura 3). Já o outro exemplar revelou marcação telomérica no segundo par metacêntrico e na extremidade do braço maior de um cromossomo submetacêntrico (não foi possível fotografar). O cromossomo supranumerário não apresentou resposta frente à Cromomicina A₃ (Figura 3c).

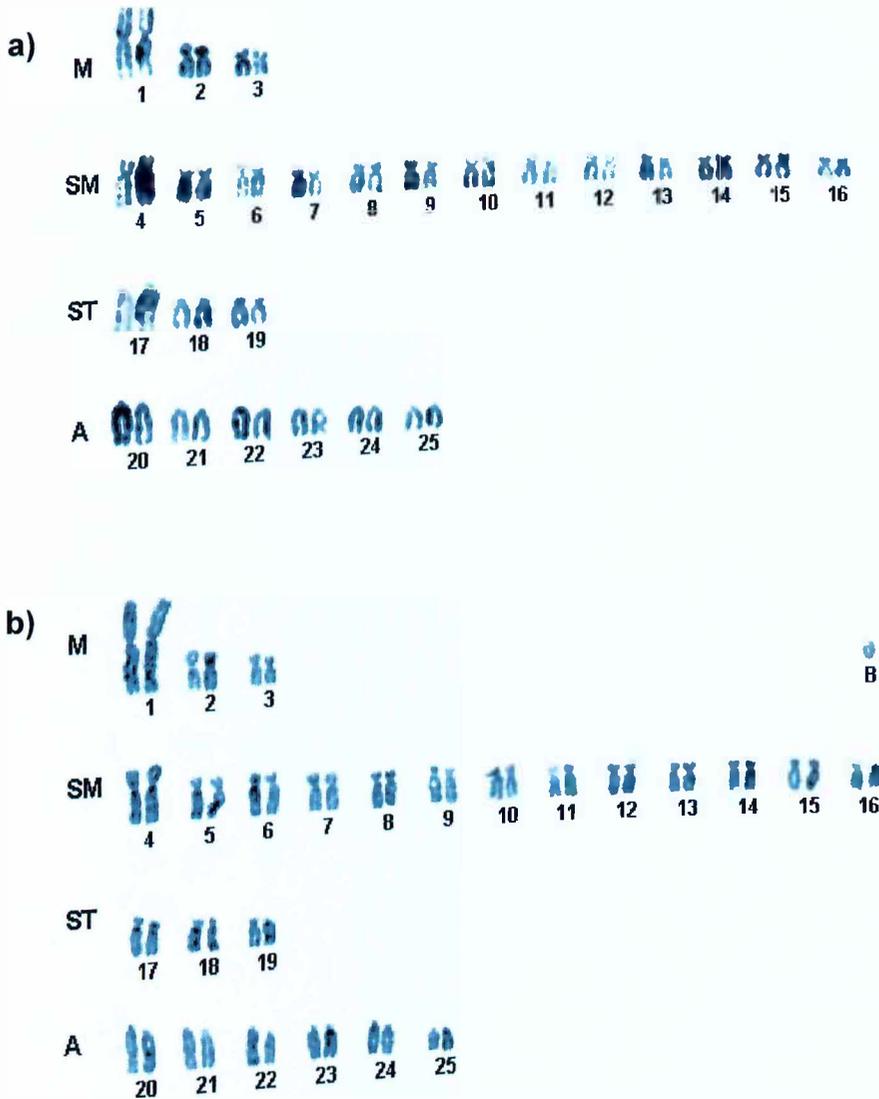


Figura 1. Cariótipos de *Astyanax scabripinnis*, coletados no córrego Jataí, corados com Giemsa, contendo: (a) 50 cromossomos, (b) 51 cromossomos.

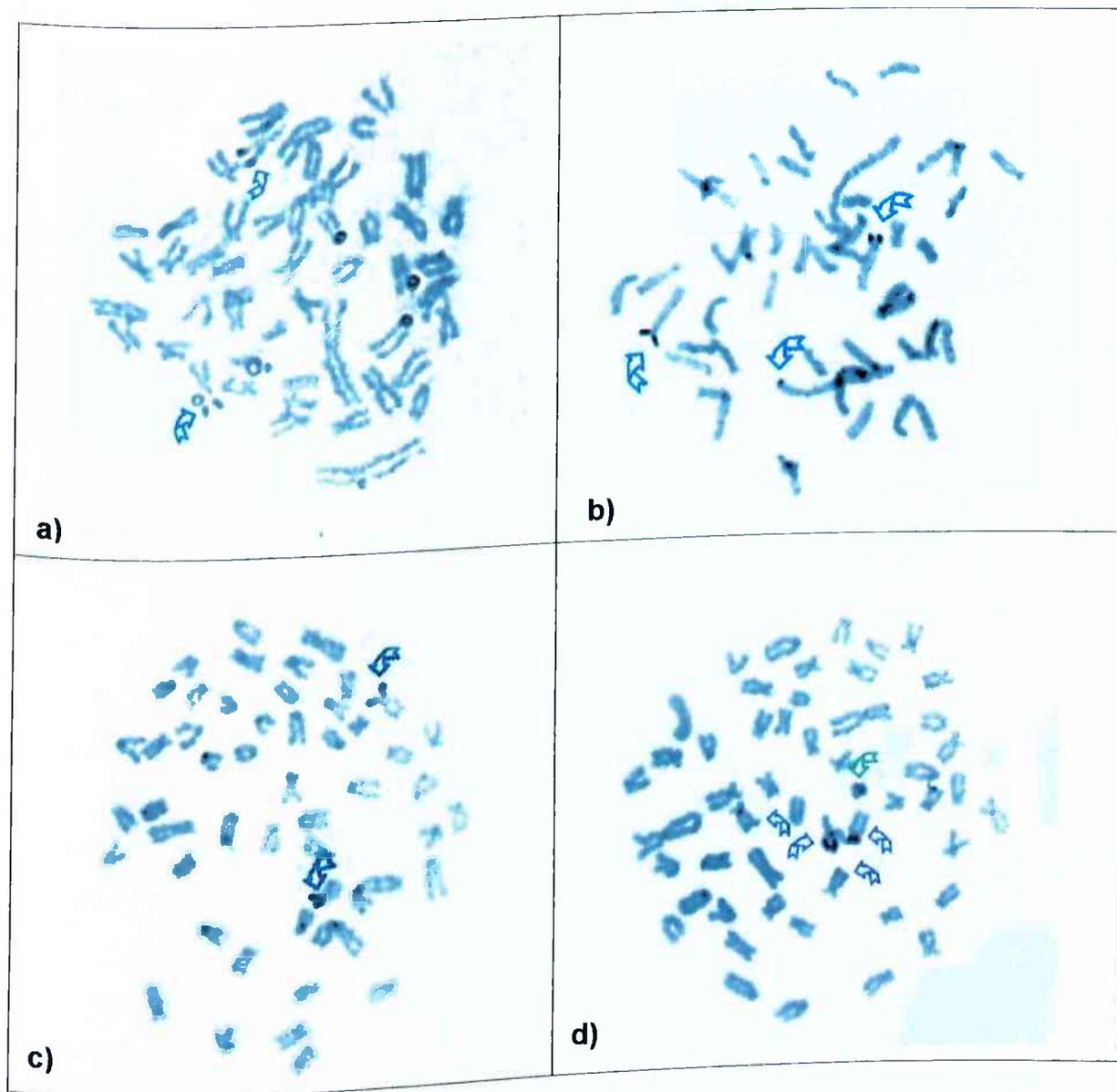


Figura 2. Metáfases de *Astyanax scabripinnis* mostrando as respostas à solução de nitrato de Prata e ao bandamento C: (a) e (b) as setas indicam os cromossomos AgNORs⁺, (c) e (d) as setas azuis indicam bandas C⁺ coincidentes com as NORs e a seta verde mostra o cromossomo supranumerário totalmente heterocromático.

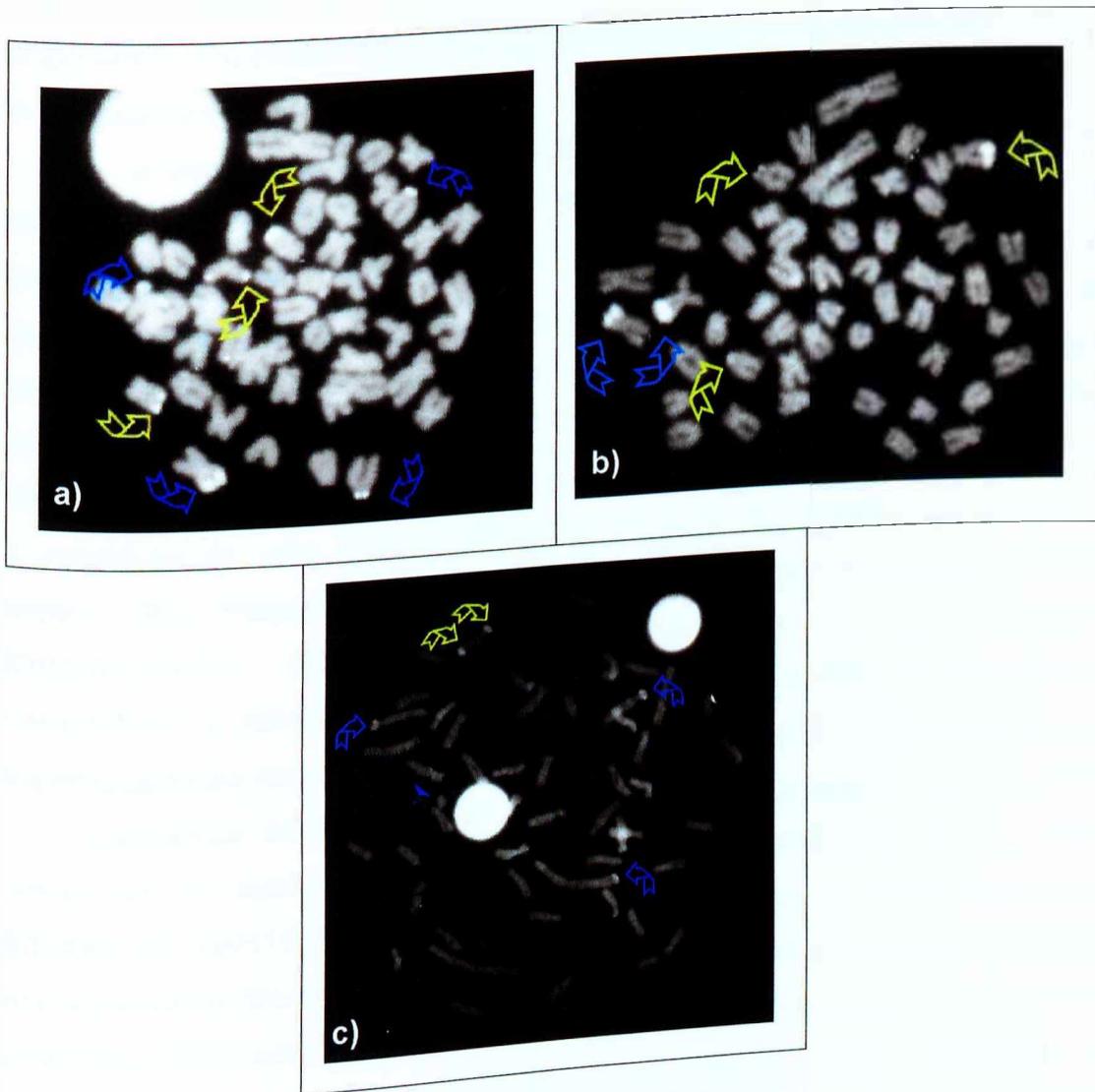


Figura 3. Metáfases de *Astyanax scabripinnis* tratadas com Cromomicina A₃ (CMA₃). (a),(b) e (c) mostram as variações interindividuais. As setas azuis mostram regiões CMA₃⁺ correspondentes às NORs, as setas amarelas indicam regiões CMA₃⁺ não correspondentes às NORs e a cabeça da seta indica o cromossomo supranumerário CMA₃.

3.5. Discussão

Astyanax scabripinnis é, uma espécie intensamente estudada por vários pesquisadores desde 1978, quando foi realizada sua primeira análise citogenética. A grande variabilidade cromossômica observada nessa espécie a tornou um “curioso” e interessante material de estudo citogenético, para compreensão dos processos evolutivos que conduzem a tais variabilidades inter e intrapopulacionais.

A análise cromossômica realizada em exemplares do córrego Jataí, evidenciou número diplóide $2n=50$, semelhante à maioria dos números já descritos para essa espécie. Contudo a presença de indivíduos portando microcromossomos supranumerários difere um pouco de outras populações, uma vez que a presença deles, do tipo metacêntrico grande, é a forma que ocorre com maior frequência (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; MAISTRO et al., 1994; 2001; FAUAZ et al., 1994). Sua presença já foi descrita para um grande número de indivíduos de uma mesma população (córrego das Pedras - Campos do Jordão - SP), chegando a 87,5% dos exemplares coletados (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992). No entanto outros tipos de supranumerários (metacêntrico e submetacêntrico grande, metacêntrico médio e metacêntrico pequeno) já foram descritos para *A. scabripinnis* (NÉO, 1999; FERRO, 2000).

A presença de supranumerários em exemplares fêmeas é um fato muito comum em *A. scabripinnis* (FAUAZ et al., 1994; MAISTRO et al., 1994; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998). Porto-Foresti et al. (1997), descrevem uma significativa diferença na frequência entre machos (8,7%) e fêmeas (57,1%) do córrego Cascatinha (Botucatu - SP) e sugerem que a maior presença destes em fêmeas possa estar relacionada com algum efeito direcional no desenvolvimento gonadal. Néo (1999) também observou que a maioria dos exemplares portadores de cromossomos B de duas localidades do ribeirão Grande eram fêmeas, com proporção de 66,7% para o primeiro ponto de coleta e 77% para o segundo. Essa restrição de cromossomo B a um determinado sexo também já foi descrita para outra espécie. Martins et al. (1996) descreveram a presença de pequenos supranumerários metacêntricos restritos a fêmeas de *Cyphocharax modesta* do ribeirão Três Bocas (Londrina - PR). Na população do

córrego Jataí, o resultado obtido nesse estudo, é diferente do descrito na literatura, pois, apenas exemplares machos apresentaram supranumerários sendo este um microcromossomo do tipo acrocêntrico. No rio Jucú (Vitor Hugo - ES) ocorre uma população semelhante, quanto ao tamanho e ao sexo dos portadores de B, mas os animais apresentavam de 1 a 4 cromossomos supranumerários por célula (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Outros dados descritos de ocorrência de supranumerário em machos de *A. scabripinnis* citam apenas cromossomos com tamanho semelhante ao do primeiro par do complemento A (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; NÉO et al, 2000).

A presença de cromossomo B em populações de *A. scabripinnis* parece estar correlacionada com a altitude do habitat destes peixes. À medida que aumenta a altitude, maior é a ocorrência de indivíduos portadores de B. Néo (1999) analisou três populações de *A. scabripinnis* de diferentes locais do ribeirão Grande (Campos do Jordão - SP) e observou que a 1920 metros de altitude, 52% dos indivíduos analisados portavam cromossomos B, na população de 1800 metros de altitude, estava presente em 21% dos exemplares e não foi observado na população a 700 metros de altitude. Souza e Moreira-Filho (1995) após estudar espécimes de *A. scabripinnis* coletados em diferentes altitudes (1800 e 780m) do córrego Piracuama (bacia Paraíba do Sul - SP) observaram a ocorrência de supranumerários apenas em indivíduos localizados a 1800m. Porto-Foresti et al. (1997) ao analisarem *A. scabripinnis* de três localidades com distintas altitudes (1º- 880m, 2º- 860m e 3º- 820m), ao longo do córrego Cascatinha (bacia do rio Tietê) notaram decréscimo na quantidade de indivíduos portadores de B (23, 2 e 1 indivíduos respectivamente) à medida que a altitude diminuía. Os resultados obtidos na população do córrego Jataí colaboram com estes dados, pois este córrego encontra-se localizado a 891 metros de altitude. Porto-Foresti et al. (1997) sugerem que a presença de cromossomos B em altitudes mais elevadas confere papel adaptativo à espécie. No entanto, Mizoguchi e Martins-Santos (1997 apud NÉO, 1999) descrevem um caso esporádico, onde estes foram observados em *A. scabripinnis* situados a uma altitude em torno de 500 metros, no córrego Yacutam e no rio Água do Rancho.

A distribuição de heterocromatina nos cromossomos B não segue um único padrão, podendo ser encontrados indivíduos portando cromossomo parcialmente

heterocromático (MESTRINER et al. 2000) totalmente heterocromático (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; TORRES-MARIANO, 2001; FAZOLI et al., 2002; CARVALHO; DIAS, 2002) e parcial e/ou totalmente heterocromático por célula (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; VICENTE et al., 1996). Na população do córrego Jataí não foi possível observar um padrão geral de distribuição da heterocromatina constitutiva, no entanto, foi possível detectar que as NORs e o cromossomo supranumerário são bandas C positivos. A Cromomicina A₃ e Mitramicina A sugeriram “riqueza” de bases GC nas NORs, mas não se observou nenhum brilho fluorescente nos cromossomos supranumerários. De acordo com Rejon et al. (1987 apud SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992) o processo de heterocromatinização do cromossomo B seria atribuído à “desativação” de genes prejudiciais ao animal. No entanto, Dantas et al. (2002) presenciaram um caso não muito usual, no qual após o emprego de FISH com sonda rDNA em metáfases de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Characidae), detectaram a presença de cístrons ribossômicos nos cromossomos supranumerários.

Outro polimorfismo também freqüentemente destacado em peixes é quanto ao padrão das AgNORs. O sistema de AgNORs no gênero *Astyanax* tem, sido caracterizado geralmente, como múltiplo (PFISTER; MOREIRA-FILHO, 1997; PASTORI et al., 1998; PORTO; MARTINS-SANTOS, 2002; KANTEK et al., 2002), com número máximo descrito de 15 cromossomos portadores de cístrons ribossômicos (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Nos exemplares do córrego Jataí, o par cromossômico metacêntrico número dois mostrou-se preferencialmente, marcado pela Prata. Esporadicamente foi observada marcação no braço menor de um par subtelo-cêntrico. Dentre os exemplares analisados, apenas um macho portador de cromossomo B apresentou NOR em um dos homólogos do primeiro par (Figura 2b) além de bandas fluorescentes (GC⁺) biteloméricas em um cromossomo subtelo-cêntrico (Figura 3c), mostrando assim um caso variante nesta população.

Algumas hipóteses têm sido discutidas para explicar a origem dos cromossomos extras. Salvador e Moreira-Filho (1992) sugerem que tais cromossomos observados na população do córrego das Pedras, provavelmente, seriam resultado de não-disjunção de um dos cromossomos do primeiro par seguido de heterocromatinização. Martins et al. (1996) propõe “mecanismo”

semelhante para explicar a presença de microcromossomo supranumerários em indivíduos de *Cyphocharax modesta* do ribeirão Três Bocas (Londrina - PR). Além do processo de não-disjunção, poderia ter ocorrido também, perda de cromatina, resultando em um microcromossomo. Já Vicente et al. (1996), baseados no padrão de banda C, sugerem que o cromossomo supranumerário observado em indivíduos da população de *A. scabripinnis* de três localidades na região de Campos do Jordão - SP tratava-se de um isocromossomo originado do cromossomo 24. Este fato foi comprovado por Mestriner et al. (2000) ao associarem citogenética e genética molecular.

É necessária uma maior amostragem de indivíduos da população do córrego Jataí para nos certificarmos que os cromossomos supranumerários restringem-se apenas ao sexo masculino. O fato de estes animais terem sido capturados apenas nas últimas coletas, nos sugere que esteja ocorrendo mudanças recentes no cariótipo desta população e não fica descartada a idéia de que, possivelmente, algum espécime fêmea, presente neste grupo, seja portadora ou virá a portar cromossomo supranumerário.

A ocorrência de cromossomo extra em muitos exemplares de *A. scabripinnis* poderia ser característica biológica desta espécie determinada por interações de fatores, como mudanças estruturais ou numéricas no cariótipo e características ambientais, conduzindo estes animais à uma seleção diferencial.

3.6. Resumo

Além dos cromossomos do complemento diplóide padrão, os chamados cromossomos A, eventuais cromossomos extras podem aparecer na célula, recebem o nome de cromossomos supranumerários, extras, acessórios ou B. Na família Characidae, *Astyanax scabripinnis* destaca-se por ser a espécie que mais possui indivíduos descritos portadores de B, além de várias outras variações cariotípicas. No presente trabalho foi realizado estudo citogenético em alguns exemplares de *A. scabripinnis* da nascente do córrego Jataí. Foi constatada a presença de número diplóide de 50 cromossomos com exceção de alguns exemplares machos portando $2n=50+1B$. O sistema AgNORs foi caracterizado como múltiplo e estas regiões mostraram-se banda C positivas. Os fluorocromos

GC específicos evidenciaram outras regiões cromossômicas "ricas" em base GC além daquelas correspondentes às AgNORs.

3.7. Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas encontram-se citadas no item 6. Referências Bibliográficas.

4. Conclusão Geral

Apartir dos resultados obtidos com as análises citogenéticas envolvendo coloração convencional com Giemsa, impregnação pela Prata, bandamento C e fluorocromo GC específico Cromomicina A₃, pode-se concluir que:

1. As quatro populações de *Astyanax scabripinnis* estudadas mostraram macroestruturas cariotípicas próprias;
2. Os sistemas de NORs observados foram caracterizados como múltiplos;
3. As regiões AgNORs mostraram-se positivas à Cromomicina A₃;
4. As populações dos córregos Cruz da Retirada Bonita e dos Caetano mostraram maior quantidade de blocos heterocromáticos quando comparadas com as populações dos córregos Jataí e da Manga;
5. A população do córrego Jataí apresenta sistema de cromossomo B, sendo este um microcromossomo e até o momento restrito aos machos;
6. As diferenças cariotípicas observadas nas quatro populações, provavelmente, são decorridas de pequenas alterações cromossômicas fixadas pelo isolamento geográfico.

5. Anexos

5.1. Material e Métodos

5.1.1. Material e Locais de Coletas

Foram estudados exemplares do pequeno peixe *Astyanax scabripinnis*, popularmente conhecido por lambarí.

Os espécimes foram coletados em quatro localidades do triângulo mineiro: córrego Jataí, córrego dos Caetano (ambos localizados no município de Uberlândia - MG), córrego Cruz da Retirada Bonita e córrego da Manga (localizados no município de Campina Verde - MG) sendo os três primeiros pertencentes à bacia do rio Paranaíba e a quarto pertencente à bacia do rio Grande (Mapa).

A nascente do córrego Jataí está situada à uma altitude de 891 metros e as demais encontram-se situadas em torno de 650 metros de altitude.

Os exemplares analisados foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70%, no laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

A identificação dos espécimes foi realizada pelo Prof. Dr. Francisco Langeani Neto do Departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista – UNESP.



Mapa. Mapa hidrográfico (POLASTRI, 1996) modificado, mostrando os municípios onde foram coletados os exemplares de *Astyanax scabripinnis*: ● município de Uberlândia e ● município de Campina Verde.

5.1.2. Métodos

5.1.2.1. Indução de Mitoses

Para obtenção de um número maior de mitoses, foi utilizada a técnica de injeção de cloreto de Cobalto:

A fim de induzir o aumento de células metafásicas, Cucchi e Baruffaldi (1990), propuseram a aplicação de Cloreto de cobalto (CoCl_2) em peixes para intensificar a frequência de mitoses nas células. O Cloreto de cobalto age bioquimicamente inibindo piruvato desidrogenase em acetil coenzima A e de α -cetoglutarato desidrogenase, duas enzimas que são de vital importância na respiração celular. Assim o O_2 não pode ser consumido e o tecido "entende" como hipoxia o que estimula a formação de heritropoetina, conduzindo ao aumento na proliferação celular do tecido hematopoiético (WEBB, 1962 apud CUCCHI; BARUFFALDI, 1990).

A técnica utilizada foi descrita por Cucchi e Baruffaldi (1990).

1. Injetar, intraperitonealmente, solução aquosa de CoCl_2 (4mg/ml na proporção de 0,5ml por 100g de peso do animal) durante 24 horas, após o qual processa-se o material para preparação de cromossomos mitóticos.

Neste trabalho o cloreto de Cobalto foi injetado no peixe que ficou em aquário aerado entre 18 e 20 horas.

5.1.2.2. Obtenção de Cromossomos Mitóticos

5.1.2.2.1. Tratamento "in vitro"

Para obtenção de cromossomos mitóticos "in vitro" foi utilizada a 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 em temperatura ambiente;
2. Dissociar bem o material;

3. Retirar o sobrenadante com um pipeta Pauster, colocando o material em tubo de centrífuga;
4. Pingar uma gota de colchicina 0,016%;
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 sobrenadante e completar para 6 ml de cloreto de potássio (KCl);
9. Suspende novamente pipetando por mais 100 vezes;
10. Levar novamente à estufa a 36°C por mais 30 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 sobrenadante 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 60°C;
20. Corar por 10 minutos com Giemsa 1/20 em tampão fosfato pH 6,8.

5.1.2.2. Preparações Diretas

A técnica de preparações direta foi adaptada para peixes, por Bertollo et al. (1978), para estudos cromossômicos em peixes, com pequenas mudanças :

Citogenética de quatro populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)

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 8 a 10 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. Suspende 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 900 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
9. Adicionar, vagarosamente 5-7 ml de fixador recém preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo;
10. Suspende 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 sobrenadante, 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, que deve estar sobre uma placa aquecida, a 38-39°C;
13. Deixar secar ao ar;
14. Corar com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 8 minutos;
15. Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar.

5.1.2.3. Bandamentos Cromossômicos

5.1.2.3.1. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)

A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos foi feita conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980), como descrita a seguir:

1. Pingar sobre a lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 1 gota (25 µl) 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 (25 µl) anterior, 2 gotas (50 µl) de solução aquosa de nitrato de prata a 50% e 1 gota de água deionizada (25 µl). Misturar bem e cobrir com lamínula;
3. Incubar em estufa a 60°C, por um período de aproximadamente 5 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da lâmina e dos cromossomos, ao microscópio;
4. 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.

5.1.2.3.2. Detecção da Heterocromatina Constitutiva – Banda C

Para o estudo da heterocromatina constitutiva foi utilizada a 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, a 37°C;
4. Lavar e secar ao ar;
5. Submergir as lâminas em um cuba com hidróxido de Bário a 5% por 40 a 60 segundos, a 42°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 2 2xSSC, aquecida por 30 minutos a 60°C;
8. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
9. Corar com Giemsa à 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 20 a 30 minutos;
10. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

5.1.2.3.3. Coloração pelo Fluorocromo Cromomicina A₃

A técnica apresentada foi descrita por Schmid (1980), com modificações:

1. Colocar cerca de 150 µl da solução de Distamicina A (0,3 mg/ml sobre a lâmina), cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos; escorrer a lamínula e lavar em tampão McIlvaine; deixar secar por alguns minutos;
2. Colocar 150 µl da solução de Cromomicina A₃, sobre a lâmina, cobrir novamente com lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro;
3. Escorrer a lamínula e lavar com jato de água corrente, por aproximadamente 1 minuto; mergulhar a lâmina em tampão McIlvaine e deixar por 5 minutos;
4. Deixar secar ao ar e montar com lamínula utilizando como meio uma solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso;
5. Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro no mínimo 15 dias antes de analisar, para aumentar a estabilidade do fluorocromo;

6. Analisar em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul). Fotografar com filme T-max 100 ASA, revelado em D-76.

5.1.2.4. Montagem dos cariótipos

A classificação cromossômica adotada foi proposta por Levan et al. (1964), onde o critério adotado é a relação de braços (RB) dos cromossomos; braço maior/braço menor.

RB=1,00 a 1,70 (cromossomo metacêntrico);

RB=1,71 a 3,00 (cromossomo submetacêntrico);

RB=3,01 a 7,00 (cromossomo subtelocêntrico);

RB maior que 7,01 (cromossomo acrocêntrico).

Na confecção dos cariótipos os cromossomos foram pareados em ordem decrescente de tamanho e distribuídos nos quatro grupos cromossômicos: cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A).

Para obtenção do número fundamental (NF), isto é, somatória dos braços cromossômicos, os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços e os cromossomos acrocêntricos com apenas um braço.

5.2. Gráficos das freqüências cromossômicas das quatro populações estudadas.

Gráfico 1. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares fêmeas do córrego da Manga. A legenda identifica os animais.

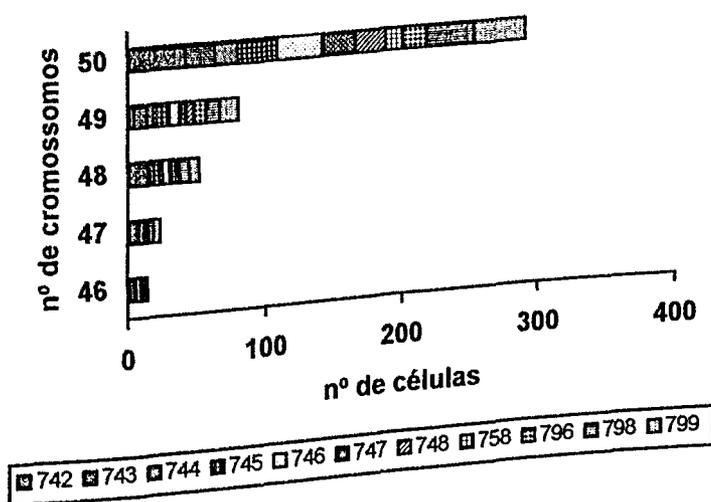


Gráfico 2. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares machos do córrego da Manga. A legenda identifica os animais.

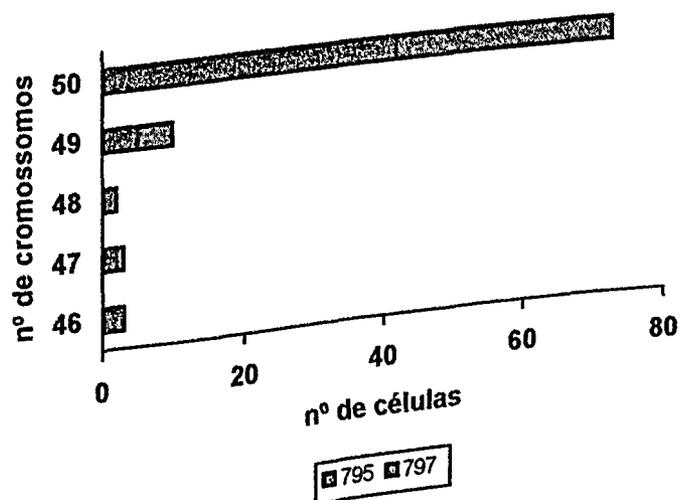


Gráfico 3. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares fêmeas do córrego dos Caetano. A legenda identifica os animais.

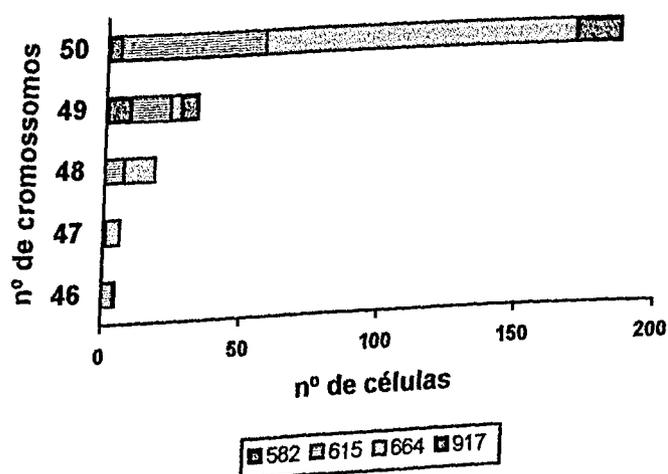


Gráfico 4. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares machos do córrego dos Caetano. A legenda identifica os animais.

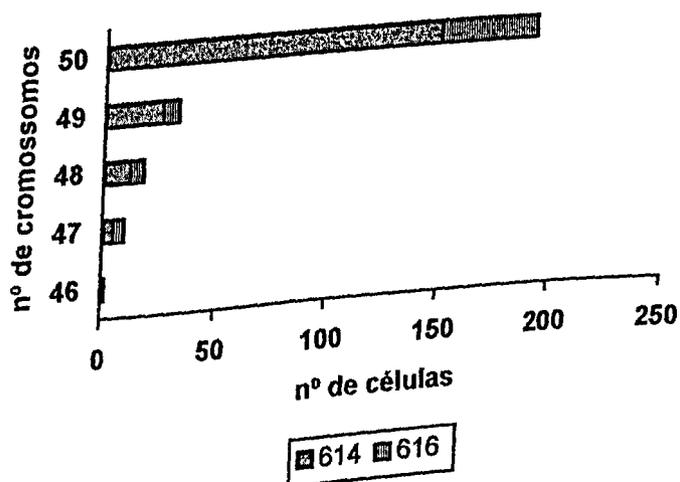


Gráfico 5. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares fêmeas do córrego Cruz da Retirada Bonita. A legenda identifica os animais.

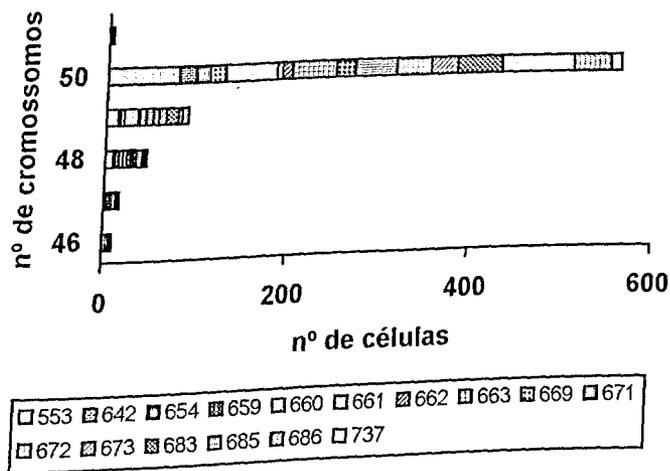


Gráfico 6. Gráfico de freqüências do número diplóide para exemplares machos do córrego Cruz da Retirada Bonita. A legenda identifica os animais.

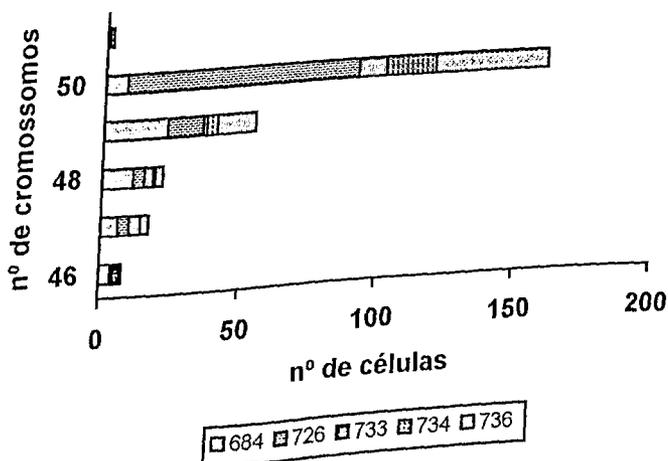


Gráfico 7: Frequência para os números diplóides de *Astyanax scabripinnis* fêmeas, coletadas no córrego Jataí. A legenda identifica os animais.

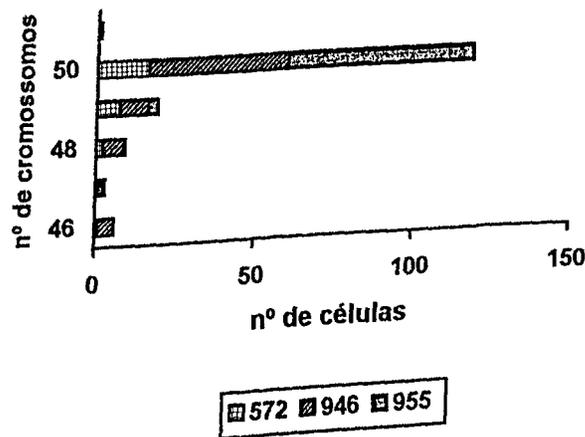
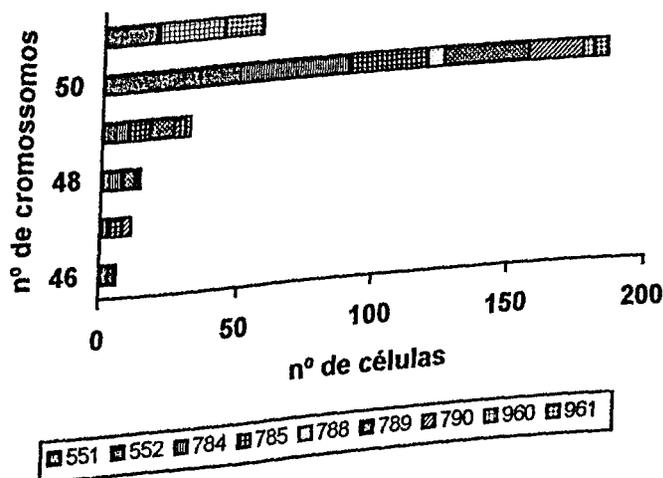


Gráfico 8. Frequência para os números diplóides de *Astyanax scabripinnis* machos, coletados no córrego Jataí. A legenda identifica os animais.



6. Referências Bibliográficas

- ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O. Citogenética de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio São Francisco. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 7., 1998. Resumos... Londrina: UEL, 1998. A.22.
- ABEL, L.D.S. A variabilidade do complexo de espécies *scabripinnis* (Pisces, Characidae) como estratégia adaptativa. Estudo da diversidade cariotípica do grupo com ênfase em populações da bacia do rio São Francisco. 2001. 103f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.; FORESTI, F. As regiões organizadoras de nucléolo em peixes. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.37, n.3, p.448-452, 1985.
- ANDRADE, S.F.; MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Caracterização cariotípica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces, Pimelodidae) proveniente do rio Sapucaí, represa de Furnas, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44., 1998. Resumos..., 1998. p.66
- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, Tokyo, v.57, p.369-372, 1992.
- ANDRIONI, P.F.; GROSS, M.C.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F. Análise cariotípica em peixes da lagoa Dourada: região do alto rio Tibagi, Parque Estadual de Vila Velha, PR. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n.3, p.49-50, 2000. (Suplemento).
- ARAUJO, A.C.S.; MORELLI, S. Estudo cariotípico da população de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da nascente do córrego Jataí, Uberlândia – MG. *Genetics Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.60, 2000. (Suplemento).

- ARBEX, Y.R.; FERREIRA, A.T.; ALVES, A.L.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Variação cariotípica entre populações de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae, Tetragonopterinae) de três bacias hidrográficas. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. p.7.
- BERTOLLO, L.A.C.; CAVALLARO, Z.I. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.60, p.60-63, 1992.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.1, p.103-120, 1978.
- BICUDO, H.E.M.C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos em eucariotos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.37, n.3, p.440-447, 1985.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3.ed. Brasília: Ministério da Irrigação, Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF), 1988. 115p.
- BRITSKI, H.A. Peixes de água doce de estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e piscicultura**, São Paulo, p. 79-108, 1972.
- BRUM, M.J.I. **Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p.5-42. (Série monografias, 2).
- CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Padrões de bandamento cromossômico em *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodiade), com especial ênfase à ocorrência de cromossomos supranumerários. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. P.64.

- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, Firenze, v.54, n.3, p.253-260, 2001.
- CUCCHI, C.; BARUFFALDI, A. A new method for karyological studies in teleost fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v.37, p.71-75, 1990.
- DANIEL-SILVA, M. F.Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. 176f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DANTAS, E.S.O.; SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Contribuição citogenética em *Moenkhausia* (Pisces, Characidae). Ocorrência de microcromossomos B, detecção de Ag-NORs e distribuição de heterocromatina constitutiva. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. p.26.
- FAUAZ, G.; VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.17, n.2, p.157-163, 1994.
- FAZOLI, L.C.; CASTRO, A.L.B.P.; JÚNIOR, H.F.J. Ocorrência de cromossomos supranumerários em *Astyanax* sp B (Characidae, Tetragonopterinae) da bacia do rio Iguaçu (PR). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002, p.5.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; SANTOS, E.B.P.; VALENTIM, F.C.S. Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the central amazon. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.351-356, 1999.
- FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; CAMACHO, J.P.M. B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biologica (Warszawa)**, Warszawa, v.48, n.3-4, p.105-109, 2000.

- FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica**, Dordrecht, v.81, p.193-198, 1990.
- FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Caracterização citogenética em duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) da bacia do rio Ivaí, PR, Brasil. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. p.5.
- FERRO, D.A.M. **Análises cariotípicas e dos cromossomos B em populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)**. 2000. 98f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysean fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v.72, n.4, p.297-353, 1981.
- FORESTI, F. Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supernumerários em peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 7., 1998. **Resumos...**Londrina: UEL, 1998.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, Basel, v.49, p.810-813, 1993.
- GARDNER, E. J. **Genética**. Tradução de Antônio Thadeu Mattos da Luz et al. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977. 503p.
- GARUTTI, V. Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes, Characidae) procedente da bacia do rio Araguaia, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.59, n.4, p.585-591, 1999.
- GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae)**. 1998. 78f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- GODOY, M.P. **Peixes do Brasil, sub-ordem Characidae**: bacia do rio Mogi-Guassú. 1. Piracicaba: Franciscana, 1975. 216p.
- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Pernambuco: Guanabara, 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**, Basel, v.36. p.1014-1015, 1980.
- JOHN, B. **Citogenética de populações**. Tradução de Almiro Blumenschein. São Paulo: Pedagógica e Universitária; Universidade de São Paulo, 1980. 84p.
- JUSTI, A.J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. 1993. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- KANAYAMA, F.S.; GIULIANO-CAETANO, L. Análise citogenética de *Astyanax cf scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae) da bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. p.9.
- KANTEK, D.L.Z.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Polimorfismo de heterocromatina e triploidia natural em *Astyanax* sp. D (Characidae, Tetragonopterinae) da região do alto rio Iguaçu (PR). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. **Resumos...**Maringá: UEM, 2002. p.19.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Lund, v.52, p.201-220, 1964.
- MAISTRO, E.L., OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica**, Dordrecht, v.110, p.177-183, 2001.

MAISTRO, E.L., OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.365-369, 2000a.

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

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *A. scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n.2, p. 153-156, 1994.

MANTOVANI, M. **Citogenética comparativa entre populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Paranapanema**. 2001. 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

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. **Genetica**, Dordrecht, v.109, p.161-168, 2000.

MARGARIDO, V.P.; GALETTI, P.M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.569-573, 2000.

MARGARIDO, V.P.; GALETTI, P.M. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.357-361, 1999.

MARGARIDO, V.P. **Uma contribuição à citogenética dos Bryconinae (Characiformes, Characidae)**. 1995. 115f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- MARTINS, C.; GALETTI-JÚNIOR, P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, Ottawa, v.44, p.903-910, 2001.
- MARTINS, C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). **Cytobios**, Cambridge, v.85, p.247-253, 1996.
- MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. Tradução de Hans Reichardt. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 1977. 485p.
- McALESTER, A.L. **História geológica da vida**. Edgard Blücher, 1971.
- MENEZES, N.A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. **Poluição e Piscicultura**, São Paulo, p.73-78, 1972.
- MESTRINER, C.A.; GALETTI, P.M.; VALENTINI, S.R.; RUIZ, I.R.G.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, Essex, v.85, p.1-9, 2000.
- MIZOGUCHI, S.M.H.M.; MARTINS-SANTOS, C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.55-61, 1998.
- MOLINA, W.F. **Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae)**. 1995. 165f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; BERTOLLO, L.A.C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, Tokyo, v.66, p.59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI-JÚNIOR, P.M.; BERTOLLO, L.A.C. Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, p.548-549, 1978. (Suplemento).

MORELLI, S. **Citogenética evolutiva em espécies do gênero *Hoplias*, grupo *lacerdae*. Macroestrutura cariotípica, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo.** 1998. 76f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução), Universidade de São Carlos.

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

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

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 8., 2000. **Resumos...**Manaus: INPA, 2000. p.24.

OLIVEIRA, C. Citotaxonomia de peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 5., 1994. **Resumos...**Botucatu: UNESP, p.2, 1994.

PASTORI, M.; FENOCCHIO, A.; RONCATI, H.; MOREIRA-FILHO, O. Estudios citogeneticos em *Astyanax schubarti* (Characiformes). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 7., 1998. **Resumos...**Londrina: UEL, 1998.

PAULS, E. Evidências de um sistema de cromossomos supranumerários em *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. (Pisces – Prochilodontidae). 1981. 190f. Dissertação (Mestrado em Genética Ecológica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PFISTER, S.C.; MOREIRA-FILHO, O. Caracterização citogenética de uma população de *Astyanax eigenmanniorum*. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.101, 1997.(Suplemento).

PHILLIPS, R.B.; IHSEN, P.E., Chromosome banding in salmonid fishes: nucleolar organizer in *Salmo* and *Salvelinus*. *Canadian Journal Genetics and Cytologia*, v.27, p.433-440, 1985.

PIECZARKA, J.C.; MATTEVI, M.S. Heterocromatina constitutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p.185-225. (Série monografias, 7).

POLASTRI, M.H.T. Minas Gerais: Texto e Contexto. 5ª série. São Paulo: FTD, 1996. 104p.

PORTO, F.E.; MARTINS-SANTOS, I.C. Diversidade cariotípica em populações de *Astyanax altiparane* (Pisces, Characidae) das bacias do rio Paraná e Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 9., 2002. Resumos...Maringá: UEM, 2002. p.3.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* *Paranae* in a small stream. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.377-380, 1997.

ROCON-STANGE, E.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restricts to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.16, n.3, p.601-615, 1993.

ROSA, C.; GIARETTA, A.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Ocorrência de dois tipos de cromossomos B em *Megaelasia massarti* (Anura, Leptodactylidae). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.47, 2000. (Suplemento).

- SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, Essex, v.69, p.50-56, 1992.
- SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, Berlin, v.97, p.101-114, 1988.
- SCHMID, M. Chromosome banding in amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, Berlin, v.87, p.327-344, 1982.
- SCHMID, M. Chromosome banding in amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, Berlin, v.77, p.83-103, 1980.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C- band patterns. **Chromosomes Today**, v.9, p.61-74, 1987.
- SOUZA, I.L. rDNAs nucleares e bandamentos cromossômicos nos caracídeos Salmininae e *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). 2001. 111f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SOUZA, I.L.; GALIÁN, J.; RÚA, P.D.L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, Tokyo, v.66, p.85-91, 2001.
- SOUZA, I.L. MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI-JÚNIOR, P.M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.405-410, 1996.
- SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces-Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, Tokyo, v.60, p.1-11, 1995.
- SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia**, Tokyo, v.60, p.273-281, 1995.

- SPERLING, K.; KALSCHUEER, V.; NEITZEL, H. Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae). **Experimental Cell Research**, New York, v.173, p.463-472, 1987.
- STRIPECKE, R.; NOGUEIRA-PINTO, M.T.; HACKEL, C.; SAZIMA, I. O cariótipo de *A. eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 12., 1985. **Resumos...**Campinas: 1985. p.173.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, New York, v.75, p.304-306, 1972.
- THERMAN, E.; SUSMAN, M. **Cromosomas humanos: estrutura, comportamento y efectos**. 3.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. 383p.
- TOLEDO-FILHO, S.A.; FORESTI, F.; RIBEIRO, A.F. Ictiogenética: Aspectos básicos e aplicados. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, n.3, 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. 61f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- VARLEY, J.M.; MACGREGOR, H.C.; NARDI, I.; ANDREWS, C.; ERBA, H. Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex*. **Chromosoma**, Berlin, v.80, p. 289-307, 1980.
- VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.S.; GALLETTI-JÚNIOR, P.M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.345-349, 1999.
- VENERE, P.C.; GALLETTI-JÚNIOR, P.M. Natural triploid and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.4, p. 681-687, 1985.

- 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). **Cytogenetics Cell Genetics**, Basel, v.74, p.70-75, 1996.
- VIEIRA, M.R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Padrões de bandamento G em cromossomos de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região de Botucatu, SP. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 7., 1998. **Resumos...**Londrina: UEL, 1998.
- VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; CAMPOLMI, M.; CALDERAZZO, F.; MAZZOLA, A. Conventional karyotype, nuclear organizer regions and genome size in five Mediterranean species of Syngnathidae (Pisces, Syngnathiformes). **Journal of Fish Biology**, London, v.52, p.677-687, 1998.
- WASCO, A.P.; GALETTI-JÚNIOR, P.M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.135-138, 2000.
- WASCO, A.P.; VENERE, P.C.; GALETTI-JÚNIOR, P.M. Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.2, p.225-230, 1996.