



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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE PEIXES DOS GÊNEROS: *Astyanax*,
Moenkhausia E *Bryconops* PROVENIENTES DAS REGIÕES DE
UBERLÂNDIA-MG E MONTE DO CARMO-TO.**

Luana Pereira dos Santos

UBERLÂNDIA-MG

2010



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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE PEIXES DOS GÊNEROS: *Astyanax*,
Moenkhausia E *Bryconops* PROVENIENTES DAS REGIÕES DE
UBERLÂNDIA-MG E MONTE DO CARMO-TO.**

Aluna: Luana Pereira dos Santos

Orientadora: Dra. 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).**

UBERLÂNDIA-MG

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- S237a Santos, Luana Pereira dos, 1984-
Análise citogenética de peixes dos gêneros: *Astyanax*,
Moenkhausia e *Bryconops* provenientes das regiões de
Uberlândia-MG e Monte do Carmo-TO / Luana Pereira dos
Santos. - 2010.
63 f.: il.
Orientador: Sandra Morelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Peixe - Citogenética - Teses. 2. Citogenética animal -
Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 597-115

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



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

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE PEIXES DOS GÊNEROS: *Astyanax*,
Moenkhausia E *Bryconops* PROVENIENTES DAS REGIÕES DE
UBERLÂNDIA-MG E MONTE DO CARMO-TO.**

Aluna: Luana Pereira dos Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Sandra Morelli

Examinadores:

Prof.º Dr.º Paulo César Venere (UFTM)

Prof.º Dr.º Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Data da Defesa: 26/02/2010

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

Confio no Senhor de todo o meu coração e não dependo do meu próprio entendimento. Reconheço o Senhor em todos os meus caminhos e ELE me dirige os passos.

Dedico aos meus pais e
ao meu amado esposo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela bolsa de mestrado, à FAPEMIG e CAPES pelos auxílios concedidos;

Ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade e infraestrutura necessária para a realização dos experimentos, coletas e viagens;

A Professora Dra. Sandra Morelli, pela orientação, amizade, companheirismo e pela confiança a mim dedicada principalmente em me receber de tão longe;

A todos os professores da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelos ensinamentos durante as disciplinas e à Coordenação do Programa na pessoa do Secretário Gerson Fraissat por toda ajuda e orientação fornecida (Paz);

A Universidade Federal do Tocantins, na pessoa da amiga Luciana Oliveira e do professor Gilvan pela ajuda, amizade e por nos cederem gentilmente o laboratório para a realização do processamento dos peixes;

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições neste trabalho;

Ao professor Oscar Shibatta da Universidade Estadual de Londrina pela identificação dos exemplares;

Ao José Clidenor (Pé) técnico do laboratório pela amizade e toda ajuda durante as coletas;

Aos queridos amigos do Laboratório Alessandra, Vanessa, Robson, Dany, Lívia, Naiara, Sabrina e Aurélio pela ajuda nas saídas de campo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos ótimos momentos de alegria;

Ao Sr. Estácio proprietário da Fazenda Taboquinha por nos tê-la cedido para as coletas;

A todos os colegas de outros laboratórios sempre presentes pelos corredores, empréstimo de equipamentos e notificações por e-mails especialmente às amigas Ana Carolina, Kelly e Luciana Calábria;

Ao laboratório de Citogenética da UNESP de Botucatu na pessoa do professor Fausto Foresti, Cláudio Oliveira e especialmente as amigas Patrícia Elda e Débora Diniz por me receberem gentilmente e pela ajuda;

Sou especialmente grata:

A Deus pelo cuidado inefável e por ter colocado em meu caminho todas as pessoas maravilhosas que contribuíram significativamente para a realização desta;

À minha mãe Erlinda que sempre foi a pessoa mais importante em toda minha formação com toda sua ajuda e exemplo de perseverança. Amo muito você! (seria impossível expressar em palavras toda minha gratidão);

Ao meu querido e amado esposo Fernando pela inestimável ajuda nas coletas, companheirismo, compreensão, amor e cuidado! Te amo!

Às minhas irmãs Karina e Vielka.

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização geográfica da Fazenda Taboquinha.....	2
Figura 2 - Mapa mostrando a localização do Córrego dos Caetano.	3
Figura 3 – <i>Astyanax fasciatus</i> do Córrego dos Caetano	31
Figura 4 – <i>Astyanax</i> sp do Córrego Taboquinha	32
Figura 5 – <i>Astyanax bimaculatus</i> do Córrego Taboquinha.....	33
Figura 6 – <i>Bryconops</i> sp do Córrego Taboquinha.....	34
Figura 7 – <i>Moenkhausia oligolepis</i> do Córrego Taboquinha.	47

Índice – Sumário

Apresentação.....	1
Fundamentação Teórica	
1	Considerações Gerais Sobre os Peixes Neotropicais 4
1.1	Aspectos Taxonômicos da Família Characidae 5
1.2	Aspectos Citogenéticos da Família Characidae 6
1.2.1	Bandamentos Cromossômicos.....9
1.3	Cromossomos B em peixes 12
1.4	Referências.....16
2	Estudos citogenéticos em <i>Astyanax fasciatus</i> , de Uberlândia-MG, <i>Astyanax</i> sp, A. <i>bimaculatus</i> e <i>Bryconops</i> sp de Monte do Carmo-TO. 26
2.1	Introdução 28
2.2	Material e Métodos.....30
2.3	Resultados.....30
2.4	Discussão 34
2.5	Referências Bibliográficas 37
3	Estudo citogenético em <i>Moenkhausia oligolepis</i> de Monte do Carmo-TO.....43
3.1	Introdução 44
3.2	Material e Métodos.....45
3.3	Resultados.....46
3.4	Discussão 47
3.5	Referências Bibliográficas 49

Apresentação

A família Characidae é o grupo mais complexo entre os Characiformes e compreende a maioria dos peixes de água doce da América do Sul. Sua distribuição geográfica compreende desde a fronteira do México com os EUA até a Argentina. O gênero *Astyanax* é o mais estudado citogeneticamente dentro dessa família, conhecidos popularmente por lambaris e piabas. Ao lado destes, outros como *Moenkhausia* e *Bryconops* anteriormente considerados membros da subfamília Tetragonopterinae (sensu Gery), estão listados como *Incertae Sedis* devido a suas características de difícil diagnose. Durante cerca de 30 anos estes peixes têm sido alvo de estudos cromossômicos, que os caracterizaram como um grupo com grande diversidade cariotípica. Recentemente, o advento de técnicas de citogenética molecular forneceu novos dados sobre a biologia evolutiva do grupo que possibilitaram a análise de antigos problemas, como sua difícil classificação taxonômica. O gênero *Astyanax* está intimamente relacionado ao gênero *Moenkhausia*, havendo hipóteses deste último ter conservado um possível cariótipo ancestral deste grupo. Vários trabalhos realizados com *Moenkhausia* e *Astyanax* evidenciaram a presença de cromossomos supranumerários, contribuindo com os estudos de origem e evolução destes elementos. Diante do exposto, através da aplicação de técnicas citogenéticas são apresentados dados cariotípicos para *Astyanax* aff. *fasciatus* coletados no Córrego dos Caetano pertencente à bacia do Rio Paranaíba município de Uberlândia-MG, as demais espécies, *Astyanax* aff. *bimaculatus*, *Astyanax* sp., *Bryconops* sp. e *Moenkhausia* cf. *oligolepis* são oriundas do Córrego Taboquinha (Figura 1a), bacia do Rio Tocantins, em Monte do Carmo-TO, já na divisa com Porto Nacional-TO. Nesta região o Rio Tocantins foi afetado pela construção de uma Hidrelétrica localizada em Lajeado-TO e ocasionou a mudança do leito do rio, formando um enorme lago. Apesar de próximo dessa região afetada pela usina, a nascente do Córrego Taboquinha (Figura 1b) está localizada numa serra ainda muito preservada. O ponto de coleta fica a aproximadamente 5 Km abaixo dessa nascente. À jusante desse ponto o córrego Taboquinha deságua no Ribeirão Ponte de Pedra, que deságua no Ribeirão Conceição, em seguida no Ribeirão Areias que, finalmente tem sua fóz no Rio Tocantins (Figura 1b). Na época da estiagem esta nascente seca e o local de coleta passa a ser a cabeceira do

córrego. As análises cromossômicas apresentadas neste trabalho forneceram dados adicionais sobre a ictiofauna desta região nunca antes estudada, evidenciando variações que podem ser ocasionadas por um isolamento geográfico destas populações nas cabeceiras deste tributário.

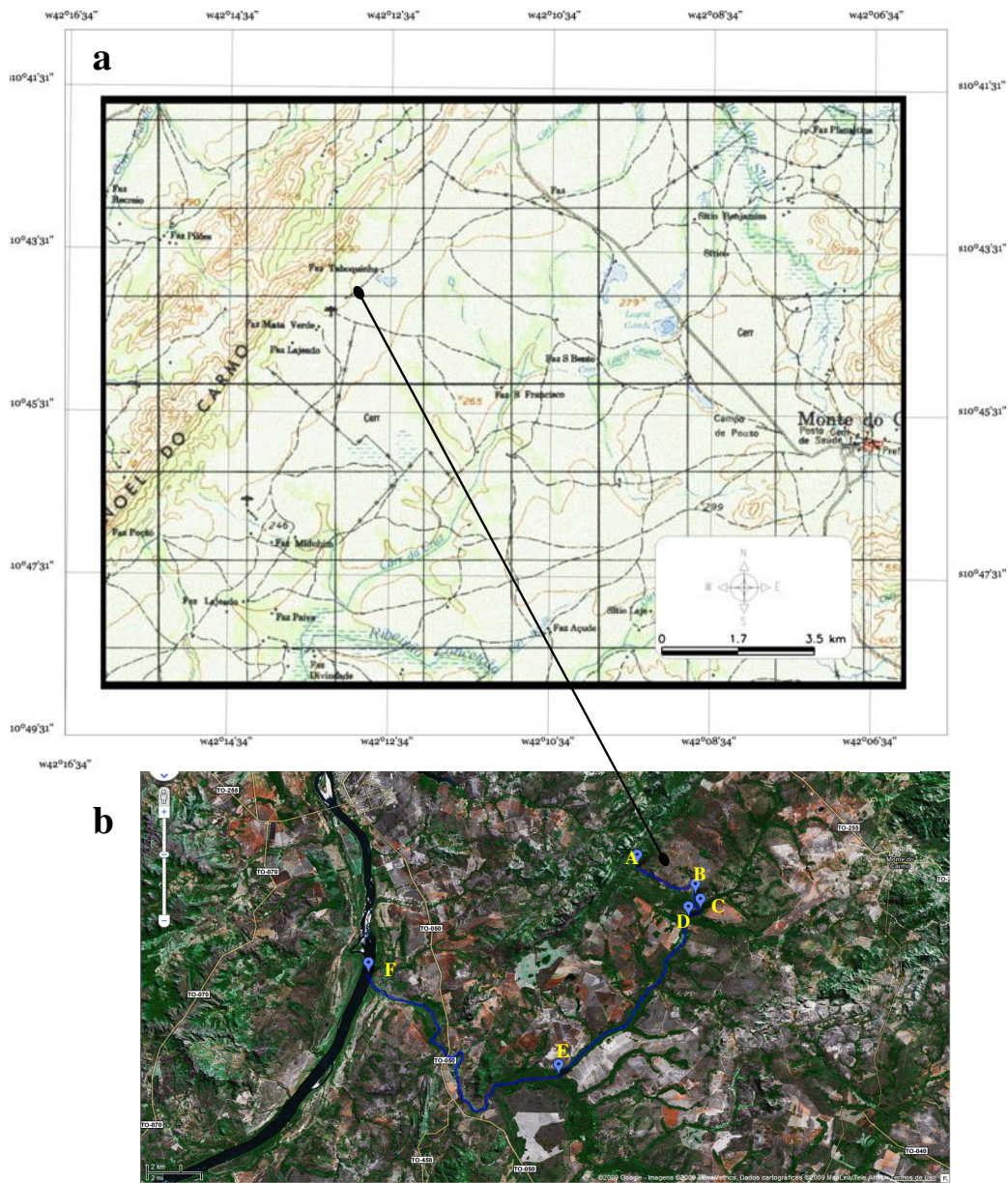


Figura 1 – Localização geográfica da Fazenda Taboquinha. Em a temos um detalhe da carta geográfica mostrando a localização geográfica da Fazenda Taboquinha. Em b observa-se uma foto de satélite retirada do software *on line* Google indicando o ponto de coleta (B), a nascente do Córrego Taboquinha (A), Ribeirão Ponte de Pedra (C), Ribeirão Conceição (D), Ribeirão Areias (E) e o Rio Tocantins (F).

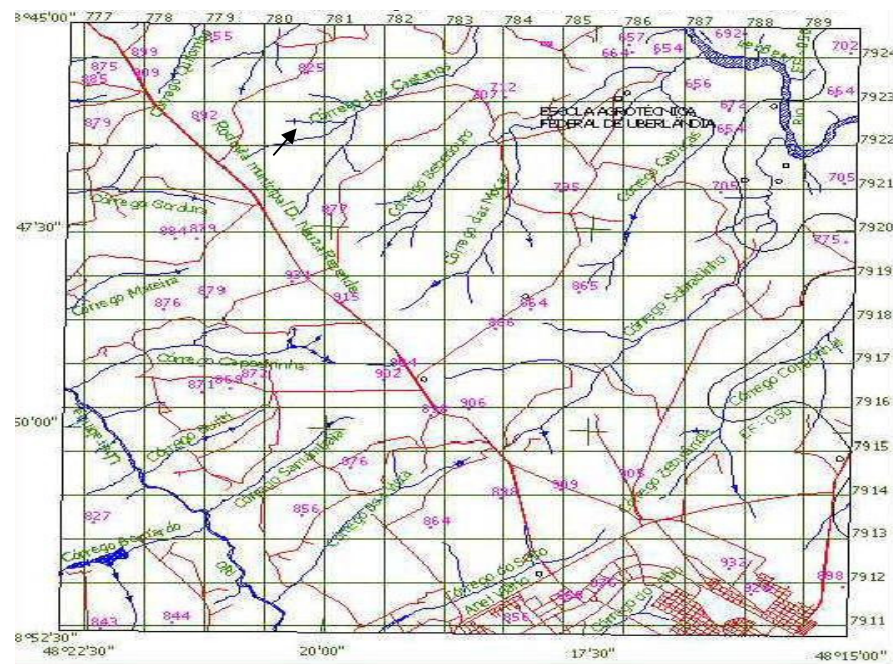


Figura 2 - Mapa mostrando a localização do Córrego dos Caetano.

CAPÍTULO I

Fundamentação Teórica

1 Considerações Gerais Sobre os Peixes Neotropicais

Os peixes são os vertebrados mais antigos e numerosos do planeta, com aproximadamente 25.000 espécies habitando quase todos os ambientes aquáticos (LOWE-McCONNELL, 1999; NELSON, 2006).

Constituem aproximadamente metade do número total de espécies de vertebrados reconhecidos vivos. Há descrição de um número estimado de 27.977 espécies de peixes válidas comparado a 26.734 tetrapodas (NELSON, 2006).

Além do grande número de espécies, outro aspecto relacionado com os peixes é a importância que representam para as populações humanas, pois constituem a dieta principal de muitas comunidades, ocupam um papel importante na economia de muitas nações e representam uma significativa fonte de trabalho nas sociedades que dependem em grande medida da atividade pesqueira. Em relação com a diversidade biológica, os peixes formam também um grupo a parte dos demais vertebrados, pois apresentam formas com os mais diversos hábitos (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

De acordo com Reis *et al.* (2003) a fauna de peixes de água doce Neotropical é muito rica, constituída por 71 famílias e 4.475 espécies descritas. Além disso, uma estimativa sugere que cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce podem existir no Neotrópico, aproximadamente 25% de todas as espécies do mundo (SCHAEFER, 1998). Vari e Malabarba (1998) concordam com este número e mostraram que toda esta diversidade ocorre somente em cerca de 0,003% da água do planeta. Somente na América do Sul, Bohlke *et al.* (1978) já estimavam mais de 2.500 espécies distribuídas em 60 famílias.

Estes dados são impressionantes considerando que o número de espécies de água doce no mundo inteiro é estimado em cerca de 13.000. A diferença entre o número de espécies descritas e o número atual de espécies, dificulta muitos estudos, incluindo os genéticos e citogenéticos, uma vez que muitas espécies ainda não têm nem mesmo seu nome científico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A ordem Characiformes compreende um dos maiores grupos de peixes conhecidos na região Neotropical, como as piranhas, os tetras e os lambaris. São aproximadamente 1.674 espécies distribuídas entre 18 famílias e em aproximadamente 270 gêneros. Destas espécies, por volta de 209 são africanas e o restante é distribuído do Sudoeste da América do Norte, América Central e América do Sul (NELSON, 2006).

Nesta ordem a família Characidae é a maior e mais complexa, compreendendo a maioria dos peixes de água doce no Brasil, com espécies variando consideravelmente em tamanho, peso, forma, alimentação e comportamento, com destaque para representantes dos gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia* e *Bryconops* (BRITSKI *et al.*, 1988; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004).

1.1 Aspectos Taxonômicos da Família Characidae

A sistemática, estudo das relações evolutivas entre os organismos, é a área da biologia na qual convergem todas as demais áreas. Considerando que a história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta, elucidar as relações filogenéticas entre os seres vivos permite o estudo de sua evolução bem como se torna base para estudos biogeográficos e ecológicos (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

A família Characidae é representada por cerca de 776 espécies, as quais eram distribuídas em 30 subfamílias e 250 gêneros com características altamente heterogêneas entre si (BRITSKI *et al.*, 1988). Apenas aquelas subfamílias para as quais existem evidências de monofiletismo foram mantidas como tal, porém, Reis *et al.* (2003) listam uma enorme diversidade de caracídeos como *Incertae Sedis* devido a falta de evidências consistentes de monofiletismo entre seus representantes. Diante disso, a família passou então a ser considerada como composta por apenas 12 subfamílias (LIMA *et al.*, 2003). Sendo assim, dos antigos Tetragonopterinae, 620 espécies distribuídas em 88 gêneros são na atualidade consideradas *Incertae Sedis*, incluindo grupos abundantes em espécies como os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Bryconops* (REIS *et al.*, 2003).

Muitos desses gêneros estiveram até recentemente incluídos na subfamília Tetragonopterinae (WEITZMAN; MALABARBA, 1998; REIS *et al.*, 2003) que nos dias atuais compreendem apenas duas espécies do gênero *Tetragonopterus* (*T. argenteus* e *T. chalceus*) (LIMA *et al.*, 2003).

Lucena (1993) já relatava que as relações de parentesco entre Characidae e outros Characiformes estavam sendo prejudicadas por causa da falta de conhecimento das relações filogenéticas dentro da família.

O gênero *Astyanax* corresponde à maior unidade taxonômica peviamente localizada na subfamília Tetragonopterinae (GERY, 1977 *apud* LIMA *et al.*, 2003). Contém 85 espécies e subespécies nominais descritas e distribuídas amplamente na região Neotropical do Sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (LIMA *et al.*, 2003). *Astyanax* necessita de uma ampla revisão para melhor definição taxonômica de suas formas e muitas espécies devem ainda ser descritas. De acordo com Melo (2000), as espécies de *Astyanax* são, em geral, similares morfologicamente e sua separação tem sido historicamente difícil.

1.2 Aspectos Citogenéticos da Família Characidae

Devido a ampla diversidade e aos escassos estudos realizados até o momento, o conhecimento que se tem da ictiofauna é reduzido. Este problema tem sido agravado nos últimos tempos pelo fato do ser humano estar danificando de forma irreparável o ambiente em muitas áreas, conduzindo a extinção de espécies ainda nem conhecidas no mundo científico. Por estas razões, se torna cada vez mais importante e urgente a necessidade de estudar as espécies presentes em nosso ecossistema, envolvendo a maioria dos aspectos possíveis, de maneira que as futuras gerações disponham de informações que os permita aproveitar esse recurso ao máximo (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

Os estudos citogenéticos provêm informações que contribuem para uma melhor identificação das diferentes espécies, contribuindo para o conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos, assim como para o mapeamento de genes específicos (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006).

As análises do cariótipo possuem importantes aplicações e contribuem para o entendimento da evolução e filogenia cromossômica, possibilitando a realização de estudos citotaxonômicos, principalmente nos casos de espécies crípticas e de complexos de espécies. Estas análises, se estendida a vários exemplares coletados em diferentes localidades, e com o emprego de diferentes técnicas de marcação cromossômica, podem caracterizar espécies de forma mais completa, possibilitando entender a ocorrência de casos de polimorfismos cromossômicos e diferentes citótipos restritos a uma dada localidade (KASAHARA, 2009).

Hoje, as informações citogenéticas estão avaliadas para 475 espécies de Characiformes, 318 de Siluriformes, 48 de Gymnotiformes, 199 de água doce que não pertencem a super Ordem Ostariophysi, e 109 de peixes marinhos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A evolução do cariótipo na família Characidae é caracterizada pela redução no número cromossômico relativamente pouco frequente e inversões que alteram a morfologia estrutural dos cariótipos (OLIVEIRA *et al.*, 1988). Uma diversidade significativa da composição morfológica dos cariótipos em função dos valores diplóides relativamente estáveis confirmaria que a evolução cromossômica em Characidae está ligada às inversões pericêntricas (FALCÃO; BERTOLLO, 1985).

Dentro do gênero *Astyanax*, estudos citogenéticos comprovaram a ocorrência de diferentes números diplóides em condições de alopatria (MORELLI *et al.*, 1983; PAGANELLI; MOREIRA-FILHO, 1986; BERTOLLO *et al.*, 1986; KANTEK *et al.*, 2007).

Neste gênero, a espécie *Astyanax scabripinnis*, a mais estudada, apresenta um alto grau de variação citogenética, mostrando uma grande diversidade cromossômica. Esta espécie apresenta um número diplóide de $2n = 46, 48$ e 50 , onde podem ser encontradas diversas formas de cromossomos supranumerários, casos de triploidia natural, além de variações no número e na morfologia cromossômicas (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1978; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995; VICENTE *et al.*, 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997; MAISTRO *et al.*, 1998; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; MESTRINER *et al.*, 2000; NÉO *et al.*, 2000a; NÉO *et al.*, 2000b; ALVES; MARTINS-

SANTOS, 2002; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2003; FERRO *et al.*, 2003; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004; PAZZA, 2005; KANTEK *et al.*, 2007).

Estes dados, associados a estudos morfológicos utilizando a análise de variáveis canônicas, sugerem que *A. scabripinnis* é um complexo de espécies na maioria das vezes representadas por populações isoladas nas cabeceiras de pequenos tributários de grandes bacias hidrográficas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998; KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2005; ARAÚJO; MORELLI, 2006; VICARI *et al.*, 2008).

No complexo *Astyanax altiparanae-bimaculatus*, estudos citogenéticos têm mostrado grandes variações como diferença em suas fórmulas cariotípicas e no número de cromossomos marcados pela prata (Ag-RONs) que não afetam o número diplóide de $2n = 50$ (MOREIRA-FILHO, 1989; PACHECO *et al.*, 2001; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2007). *A. altiparanae* é uma designação recente, dada às populações do Alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Esta espécie possui a descrição mais antiga e é considerada a mais comum do gênero. A localidade tipo, América Meridional, é incerta, como também sua distribuição geográfica.

Astyanax fasciatus por sua vez, também é considerada como um complexo de espécies diversificado cromossomicamente, apresentando distintos citótipos com variantes específicas (JUSTI, 1993; PAZZA *et al.*, 2008).

Moenkhausia apresenta 65 espécies válidas amplamente distribuídas nas bacias dos rios Cis-Andinos Neotropicais, exceto na Patagônia, com sua maior diversidade ocorrendo na bacia Amazônica e Guianas (LIMA *et al.*, 2003). Recentemente, uma nova espécie de *Moenkhausia* foi encontrada nos tributários do Rio Paraguai no Brasil tendo sido descrita como *M. forestii* (BENINE *et al.*, 2009).

O gênero *Bryconops* contém 16 espécies e é amplamente distribuído das planícies cis-Andinas da América do Sul ao Orinoco para as bacias do Paraná-Paraguai, incluindo muitas bacias costeiras das Guianas e do Brasil (LIMA *et al.*, 2003).

Em outros táxons de peixes sul-americanos, estudos citogenéticos têm contribuído para uma melhor compreensão das relações sistemáticas,

caracterizando grupos de peixes com cariótipos bem conservados (PAULS; BERTOLLO, 1983, 1990; NAVARRETE; JULIO Jr., 1997; BRASSESCO *et al.*, 2004).

1.2.1 Bandamentos Cromossômicos

Nos últimos anos, a citogenética se expandiu significativamente, sobretudo a partir da aplicação de técnicas de bandamento, as quais fornecem importantes resultados na comparação de espécies intimamente relacionadas.

Alguns caracteres citogenéticos, como o número e a distribuição de regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs), também podem ajudar a entender a evolução cariotípica nos peixes. Na família Cichlidae, Feldberg (1983) observou que em algumas espécies a localização das Ag-RONs é encontrada no primeiro par do complemento, enquanto em outras espécies a RON foi observada em outro cromossomo do complemento, caracterizando a ocorrência de rearranjos envolvendo essa região.

Os peixes neotropicais podem apresentar dois padrões de distribuição de Ag-RONs: em alguns grupos esses sítios estão localizados em um único par de cromossomos (Ag-RONs simples), enquanto outros grupos os apresentam em vários cromossomos do cariótipo (Ag-RONs múltiplas) (MOREIRA-FILHO, 1983).

Existe uma enorme diversidade de comportamento das regiões organizadoras de nucléolos entre os peixes, existindo espécies cujas Ag-RONs se mostram de forma regular e uniforme e espécies que apresentam um heteromorfismo dessas regiões tanto intra como interindividualmente (MORELLI, 1981). Em algumas espécies de peixes, a ocorrência de Ag-RONs, banda C positiva (heterocromática), tem possibilitado um melhor entendimento do seu significado em termos de estrutura cromossômica e participação evolutiva tornando-se necessários para estudos mais detalhados (PAZZA *et al.*, 2008).

Juntamente com as Ag-RONs, a heterocromatina (Banda C) é de grande importância para o estudo da diversificação cariotípica nos peixes Neotropicais, constituindo-se metodologias fundamentais para caracterização citogenética básica de quaisquer organismos, pois permitem a identificação de

cromossomos particulares, revelando informações muito úteis para estudos taxonômicos e evolutivos (AMORES *et al.*, 1993).

Uma das características principais da heterocromatina é a ausência da atividade gênica e a chamada replicação tardia do DNA, isto é, a heterocromatina inicia sua replicação depois da eucromatina no final da fase S do ciclo celular. Ela se encontra constantemente condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo. Geralmente se distribui em blocos nos cromossomos, com seqüências de DNA altamente repetitivas (GUERRA, 1988). A quantidade de heterocromatina constitutiva varia entre as espécies, porém se localiza preferencialmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas, podendo também estar presente nas regiões intersticiais e nos cromossomos sexuais (SUMNER, 1990).

Brown, em 1966, fez uma revisão do que se conhece sobre heterocromatina e concluiu haver pelo menos 2 tipos distintos, que ele chamou de heterocromatina constitutiva e heterocromatina facultativa. A constitutiva se caracteriza por permanecer condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo; aparece em ambos os homólogos, na mesma posição e com o mesmo tamanho; não contém genes estruturais, ou só muito excepcionalmente tem sido localizados genes nesse tipo de heterocromatina; é o local onde se situa, se não todo, ao menos a maior parte do DNA satélite, embora a heterocromatina constitutiva não seja formada exclusivamente de DNA satélite.

No complexo *Astyanax* encontramos vários trabalhos relatando que as marcações de heterocromatina foram utilizadas para estudos de evolução, polimorfismo, diversificação das espécies, dimorfismo sexual e caracterização populacional (PAZZA, 2005; ARTONI *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2007; KANTEK *et al.*, 2007; KAVALCO *et al.*, 2007; VICARI *et al.*, 2008).

Além das técnicas citogenéticas citadas acima, novas técnicas estão sendo usadas para estudo dos peixes Neotropicals. As análises de DNAs satélites, por exemplo, está fornecendo dados importantes no que diz respeito à composição da heterocromatina e a origem dos cromossomos supranumerários e sexuais (MESTRINER *et al.*, 2000; JESUS *et al.*, 2003; VICENTE *et al.*, 2003; PAZZA, 2005).

Até a década de setenta os estudos citogenéticos em peixes eram mais limitados quanto às informações mais precisas do genoma desse grupo. A citogenética clássica era a mais difundida, empregando a coloração convencional com Giemsa, o bandamento C e a localização das Ag-RONs. Na década seguinte, com o advento da citogenética molecular, começaram a surgir informações mais detalhadas, principalmente com o advento da técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH). Assim, a utilização das sondas de rDNA 45S, rDNA 18S e rDNA 5S, bem como de DNAs repetitivos distintos, se tornou uma importante ferramenta para o estudo da composição do material genético e a estrutura dos cromossomos dos peixes. Estas sondas representam importantes marcadores em estudos populacionais, e vêm sendo empregadas com grande frequência (DINIZ, *et al.*, 2009).

A associação da citogenética clássica com a molecular possibilitou um grande desenvolvimento da citogenética de peixes nos últimos 20 anos, principalmente no Brasil, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura e evolução do cariótipo, cromossomos sexuais, cromossomos B, polimorfismos cromossômicos, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004).

A citogenética molecular é baseada principalmente na técnica de FISH, onde uma sonda de DNA marcada é hibridada sobre alvos citológicos (cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina extendidas, etc) (GUERRA, 2004).

O uso de fluorocromos GC-específicos já foi utilizado na identificação de regiões organizadoras de nucléolos (NORs), no entanto, sabe-se atualmente que nem todo sítio GC⁺, assim como nem toda marcação com nitrato de prata nos cromossomos é seguramente um sítio portador de rDNA (ARTONI *et al.*, 2008; dentre outros).

Alguns trabalhos descrevem a combinação de corantes fluorescentes. Tais combinações 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).

Assim, a utilização de tais metodologias na citogenética de peixes é bastante promissora, pois possibilita um conhecimento mais refinado da

estrutura molecular dos cromossomos, podendo ser também aplicadas em estudos citogenéticos evolutivos e no melhor entendimento das relações existentes entre espécies e populações.

1.3 Cromossomos B em peixes

Cromossomos B, acessórios ou cromossomos supranumerários têm sido encontrados em várias espécies de animais e plantas (JONES; REES, 1982; CAMACHO *et al.*, 2000). São caracterizados por ocorrência esporádica; variação numérica; não essencialidade para os organismos que os possuem, estando presentes em alguns indivíduos da população, mas não em todos e não possuem homologia com os cromossomos do cariótipo normal das espécies dos quais provavelmente surgiram acompanhados por um mecanismo evolutivo que os converte num verdadeiro reservatório de variabilidade genética (JONES; REES, 1982; REJÓN *et al.*, 1987; MAISTRO, 1996; CAMACHO *et al.*, 2000).

Segundo Néo *et al.* (2000b) indivíduos da espécie *Astyanax scabripinnis* que habitam regiões onde as condições ambientais são mais favoráveis podem ter maior tolerância com respeito a presença de cromossomos B, favorecendo sua fixação assim como condições polimórficas nas populações.

Morfologicamente, os cromossomos B são, em geral, menores do que os cromossomos do complemento normal A, contudo, cromossomos de diferentes tamanhos e morfologias têm sido descritos, incluindo cromossomos B grandes com tamanho similar ao maior par cromossômico da espécie (JONES, 1991).

Estes cromossomos não mostram segregação mendeliana, o que resulta em instabilidade tanto na mitose quanto na meiose, e em vários modos de transmissão (JONES, 1991). Eles podem constituir uma forma alternativa de organização do material genético e serem considerados verdadeiros parasitas, permanecendo exclusivamente nas populações pelo seu mecanismo distintivo de transmissão (REJÓN *et al.*, 1987).

Sua ocorrência pode ser freqüentemente relacionada a eventos esporádicos e os cromossomos adicionais pode ser um traço individual entre os indivíduos de uma população. Em geral eles são caracteres comuns dentro da população ou espécie, tornando-se fixados naquela população de geração a geração (VENERE, *et al.*, 1999).

No entanto, nem todos os cromossomos B respondem a todas estas características, existindo casos onde há a presença de regiões organizadoras de nucléolos nos B e a correta disjunção na anáfase mitótica. Sendo assim, a definição que atende melhor às suas características é que são cromossomos dispensáveis que não se recombinaem com os cromossomos A e seguem sua própria trajetória evolucionária (BEUKEBOOM, 1994; MAISTRO, 1996; CAMACHO *et al.*, 2000).

Existe a idéia de que a origem de alguns cromossomos B tenha se dado através de isocromossomos (MESTRINER *et al.* 2000; ARTONI *et al.* 2006), onde análise do complexo sinaptonêmico permitiu observar um emparelhamento sináptico entre o braço maior e o menor e a formação de um anel na meiose (DUPLESSÉS; SPIES, 1993; DIAS, 1995).

Outra hipótese a respeito dos mecanismos de origem dos cromossomos B sugere que um novo cromossomo tenha se originado devido a não disjunção ou outro tipo de rearranjo. Este fato foi seguido por alteração gradual deste cromossomo através de sucessivas mutações e modificações estruturais até uma completa perda de homologia e capacidade de parear com o cromossomo A original (CARVALHO *et al.*, 2008).

Segundo Oliveira *et al.* (2009) em recente revisão, cromossomos supranumerários foram descritos para 38 espécies de peixes Neotropicais. E quase todas as informações relativas aos cromossomos supranumerários, vieram de peixes coletados em áreas afetadas pela poluição ou construção de represas, ou ainda sujeito a uma grande mudança na temperatura e volume da água, que podem provocar um tipo diferente de estresse ao peixe. Os autores sugerem que os cromossomos B são co-ou bi-produtos de um estresse ao qual o peixe está sujeito sendo originado por mutações de cromossomos normais e que foram mantidos nas populações como um polimorfismo cromossômico.

Carvalho *et al.* (2008) encontraram na literatura científica publicada, e não publicadas, como teses, dissertações, monografias e resumos de congressos a ocorrência de cromossomos B em 61 espécies, distribuídas em 16 famílias de sete diferentes ordens e distintas bacias hidrográficas, sendo que a maior abundância deles encontra-se na ordem Characiformes onde foram encontrados em 31 espécies de seis famílias diferentes: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Parodontidae e Prochilodontidae.

Os cromossomos B podem ser encontrados em organismos haplóides ou diplóides, estudos com técnica de bandamento C revelaram que estes cromossomos podem se apresentar quase todo heterocromático, mas para muitas espécies, a exemplo de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI *et al.* 1989), foram encontrados cromossomos B eucromáticos e heterocromáticos.

Em *M. sanctaefilomenae*, análises de FISH confirmaram a presença de regiões organizadoras de nucléolos nos cromossomos B desta espécie (SOBRINHO *et al.*, 2006). Nas espécies deste gênero, são encontradas variações no padrão de Ag-RONs, onde há casos de Ag-RONs múltiplas (FORESTI *et al.*, 1989) bem como simples (PORTELA-CASTRO; JULIO Jr., 2002).

Uma alta frequência de cromossomos supranumerários é encontrada em espécies do gênero *Moenkhausia*, variando em número, morfologia e distribuição. Em *M. sanctaefilomenae* Foresti *et al.* (1989) encontraram uma variação de 1 a 8 microcromossomos em ambos os sexos, ao passo que nesta mesma espécie Portela-Castro *et al.* (2001) encontraram de 0 a 2 cromossomos B, presentes apenas nos machos.

Nenhum efeito fenotípico tem sido encontrado até agora relacionado a presença de cromossomos supranumerários. Em diferentes populações de *A. scabripinnis* foi observado macrocromossomos B restritos às fêmeas (MAISTRO *et al.*, 1992; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997), microcromossomos B somente nos machos (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993) bem como em fêmeas (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997). Foi encontrado também de 1 a 2 macrocromossomos B em uma população de *A. eigenmanniorum* (TORRES-MARIANO; MORELLI, 2008) e 1 microcromossomo B em uma população natural de *A. altiparanae* (HASHIMOTO *et al.*, 2008).

A classificação taxonômica animal baseada na filogenia não é apenas uma classificação informativa e útil, mas que também espelha as relações evolutivas entre os organismos. Para que se obtenha sistematicamente um táxon natural é necessário que o grupo em questão seja monofilético, ou seja, o grupo deve possuir um ancestral comum recente a todos os seus

descendentes, isso implica em características exclusivas compartilhadas pelo grupo (FUTUYMA, 1997).

Algumas bacias hidrográficas estão isoladas das demais, tornando-se assim, barreiras geográficas para alguns grupos de peixes e se constituindo em vários isolados que favorecem a especiação (FUTUYMA, 1997). Gery (1968, *apud* MOREIRA-FILHO, 1983) considera que entre as bacias hidrográficas, as do Leste do Brasil evidenciam um isolamento mais acentuado, existindo casos em que algumas conexões podem ser permanentes entre os sistemas de drenagem, submergindo imensas áreas nas cheias e constituindo rotas de migração para formas generalizadas de peixes.

Lowe McConnell (1969) ressalta que o tamanho absoluto de certos sistemas de rios é fator importante, pois pode permitir que muitas espécies evoluam dentro do próprio sistema, desenvolvendo-se em isolamento geográfico nas cabeceiras dos tributários. As barreiras entre as populações podem ser físicas, como a velocidade do fluxo da água ou tipo do leito do rio; químicas, como o tipo de água (águas pretas e brancas do sistema Amazônico, por exemplo) ou mesmo bióticas e sua existência acaba por dificultar a passagem de uma espécie de uma bacia para a outra, criando algumas das situações necessárias ao isolamento reprodutivo e conseqüente especiação.

Estes aspectos zoogeográficos em conjunto aumentam em importância o estudo da citogenética de peixes, sobretudo quando a investigação se faz em nível populacional. Ao se estudar a citogenética de alguns peixes, se pode fazer um levantamento do padrão cromossômico das espécies, dos tipos de cromossomos existentes e com isso estudar os possíveis modos da evolução cariotípica (PAZZA; KAVALCO, 2007).

1.4 Referências

- Alves AL and Martins-Santos IC (2002) Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n=48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* 67:117-122.
- Amores A, Martinez G, Reina J and Alvarez MC (1993) Karyotype, C-banding, and Ag-NOR analysis in *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes). Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome* 36:672-675.
- Araújo ACS and Morelli S (2006) Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro. *Biosci J* 22:145-150.
- Artori RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC, Vicari MR and Bertollo LAC (2006) *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotrop Ichthyol* 4:197-202.
- Artori RF, Gross MC, Schneider CH, Vicari MR, Almeida MC and Matoso DA (2008) Epifluorescence and light microscopy evidencing structural and functional polymorphism of ribosomal DNA in fish (Teleostei: *Astyanax fasciatus*). *Micron* 39:1156-1159.
- Benine RC, Mariguela TC and Oliveira C (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotrop Ichthyol* 7:161-168.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O and Galetti Jr PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of fish biology* 28:153-159.
- Beukeboom LW (1994) Bewildering B: An impression of the 1 st B-chromosome conference. *Heredity* 73:328-336.

Bohlke JE, Weitzman SH and Menezes NA (1978) Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica* 8:657-677.

Brassesso MS, Pastori MC, Roncati HA and Fenocchio AS (2004) Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics and Molecular Research* 3:293-301.

Britski HA, Sato Y and Rosa ABS (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco) 3ª ed Minas Gerais: Ministério da Irrigação, CODEVASF, 115p.

Brown SW (1966) Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.

Camacho JP, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond* 355:163-178.

Carvalho RA, Martins-Santos IC and Dias AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 72:1907-1932.

Dias AL (1995) Estudo do complex sinaptonêmico em peixes, *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) e *Astyanax scabripinnis* (Characidae): análise da sinapse dos cromossomos supranumerários. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.

Diniz D, Laudicina A and Bertollo LAC (2009) Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 32:37-41.

Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC and Artoni RF (2007) Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* 5:37-44.

Duplesses H and Spies JJ (1993) B-chromosome behavior in the genus *Tribolium* (Poaceae, Danthonieae). 1st B-Chromosome Conference. Madrid, Spain p. 31.

Falcão JN and Bertollo LAC (1985) Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). Journal of Fish Biology 27:603-610.

Feldberg E (1983) Estudos citogenéticos em 10 espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes). Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos – SP.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2003) Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basins PR Brazil. Cytologia 68:289-293.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosome of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. Genetica 124:301-306.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2004) Cytogenetics study in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). Hereditas 141:328-332.

Ferro DAM, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. Genetica 119:147-153.

Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica 79:107-180.

Futuyma D (1997) Biologia evolutiva. 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.

Galetti Jr PM and Martins C (2004) Contribuição da Híbridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. pp61-88. In: Guerra M (2004) FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 176p.

Garutti V and Britski HA (2000) Descrição de espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comn. Mus. Ciênc. Tecnol. 13:65-88.

Guerra MS (1988) Introdução à Citogenética Geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.

Guerra MS (2004) FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F and Porto-Foresti F (2008) First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). Genet Mol Biol 31:275-278.

Jesus CM, Garutti Jr PM, Valentini SR and Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genetica 118:25-32.

Jones RN (1991) B-chromosome drive. Am Nat 137:430-432.

Jones RN and Rees H (1982) B Chromosome. Academic Press, London

Justi AJ (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces-Characidae, em três bacias hidrográficas. MSc Thesis, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

Kantek DLZ, Noleto RB, Fenocchio AS and Cestari MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu River Basin. Brazilian Archives of Biology and Technology 50:67-74.

Kasahara S (2009) Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Editora SBG, Ribeirão Preto, SP.

Kavalco KF and Moreira-Filho O (2003) Cytogenetic analyses of four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from the Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia* 56:453-461.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2007) Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 30: 329-335.

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, da Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C and Lucinda PHF (2003) Genera Incertae sedis in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Reis RE, Kullander SO and Ferraris CJ (eds) PP729 EDIPUCRS, Porto Alegre – RS.

Lowe-McConnell RH (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol J Linnean Soc* 1: 51-75.

Lowe-McConnell RH (1999) Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. Edusp – São Paulo. P.20-21.

Lucena CAS (1993) Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osthariphysi, Characiformes). São Paulo – SP. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo 158p

Maistro EL (1996) Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu – SP 151p

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, and Almeida-Toledo LF (1992) Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87:101-106

Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (1998) Comparative cytogenetic and morphological analyses of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Genet Mol Biol 21:201-206

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

Melo FAG (2000) A serra dos órgãos como barreira biogeográfica para peixes dos gêneros *Astyanax* Baird e Girard (1854) e *Deuterodon* Eigenmann (1907) (Teleostei: Characiformes: Characidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) 139p.

Mestriner CA, Galetti Jr PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O and Camacho RPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity 85:1-9.

Mizoguchi SMHN and Martins-Santos IC (1997) Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Hereditas 127:249-253.

Mizoguchi SMHN and Martins-Santos IC (1998) Cytogenetics and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. Genet Mol Biol 21:55-61.

Moreira-Filho O (1983) Estudos na família Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco, SP: Aspectos citogenéticos e considerações correlatas. Tese de mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos – SP.

Moreira-Filho O (1989) Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax altiparanae* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae,

Tetragonopterinae). Tese Doutorado, Programa de Pós Graduação Ecologia e Recursos Naturais, UFSCAR, São Carlos, SP, 135p.

Moreira-Filho O and Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Braz J Genet 14:331-357.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (2004) B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. Cytogenet Genome Res 106:230-234.

Moreira-Filho O, Galetti Jr PM, and Bertollo LAC (1978) Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces: Characidae). Ciências e Cultura Sup 30:548-549.

Morelli S (1981) Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces – Characidae). Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos – SP 219p.

Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O and Toledo-Filho AS (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic variability. Caryologia 36:235-244.

Navarrete MC and Julio Jr HF (1997) Cytogenetic analysis of four Curimatids from the Paraguay basin (Pisces: Characiformes: Curimatidae). Cytologia 62:241-247.

Nelson JS (2006) Fishes of the World. John Wiley and Sons, New Jersey.

Néo DM, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE). Genetica 108:211-215 a.

Néo DM, Moreira-Filho O and Camacho JPM (2000) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. Heredity 85:136-141 b.

Nirchio M and Oliveira C (2006) Citogenética de Peces. Universidad de Oriente, Venezuela 212p.

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA and Toledo Filho SA (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. Rev Bras Genet 11:577-624.

Oliveira C, Foresti F and Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. Fish Physiol Biochem 35:81-100.

Pacheco RB, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2001) Cytotypes and multiple NOR in na *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetraodonidae). Chromosome Sci 5:109-114.

Paganelli HH and Moreira-Filho O (1986) Considerações cariotípicas de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) de três bacias hidrográficas. In: Proc. XIII Congresso Brasileiro de Zoologia 120p.

Pauls E and Bertollo LAC (1983) Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Caryologia 36:307-314.

Pauls E and Bertollo LAC (1990) Distribution of a supernumerary chromosomes system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae) Caryologia 36:307-314.

Pazza R (2005) Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos – SP 124p.

Pazza R and Kavalco KF (2007) Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). The Nucleus 50:519-543.

Pazza R, Kavalco SAF, Penteados PR, Kavalco KF and Almeida-Toledo LF (2008) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. J Fish Biol 72:2002-2010.

Portela-Castro ALB and Júlio Jr HF (2002) Karyotype Relationships among Species of Subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomy and Evolution Aspects. *Cytologia* 67:329-336.

Portela-Castro ALB, Júlio Jr HF and Nishiyama PB (2001) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110:277-283.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (2003) Check list of the freshwater fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre – RS 742p.

Rejón MR, Rejón CR and Oliver JL (1987) Evolucion de los cromosomas B. *Investigacion y Ciencia* 133:92-101.

Rocon-Stange EA and Almeida-Toledo LF (1993) Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Rev Bras Genet* 16:601-615.

Salvador LB and Moreira-Filho O (1992) B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69:50-56.

Schaefer SA (1998) Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP (eds) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre.

Sobrinho PE, Paiva LRS, Oliveira C and Foresti F (2006) Variabilidade cariotípica em populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae). XI Simpósio Brasileiro de Citogenética e Genética de Peixes e I Congresso Internacional de Genética de Peixes. São Carlos, SP GA 109.

Souza IL and Moreira-Filho O (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* 60:1-11.

Souza IL, Moreira-Filho O and Galetti-Júnior PM (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. Brazilian Journal of Genetics 19:405-410.

Sumner AT (1990) Chromosome Banding. Unwin Hyman, Londres.

Torres-Mariano AR and Morelli S (2008) B chromosome in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). Genetics and Molecular Biology 31 (suppl):246-249.

Vari RP and Malabarba LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP *et al* (eds) Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre.

Venere PC, Miyazawa, CS and Galetti-Junior PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. Genetics and Molecular Biology 22:345-349.

Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. Genetics and Molecular Biology 31:173-179.

Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR and Moreira-Filho O (2003) Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. Genetica 119:115-120.

Vicente VE, Moreira-Filho O and Camacho JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *A. Scabripinnis* (Teleostei, Characidae). Cytogenet Cell Genet 74:70-75.

Weitzman SH and Malabarba LR (1998) Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS and Lucena CA. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre – RS 603p.

CAPÍTULO 2

2 Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus*, de Uberlândia-MG, *Astyanax* sp, *A. bimaculatus* e *Bryconops* sp de Monte do Carmo-TO.

Santos LP¹; Morelli, S¹

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

Resumo:

A família Characidae é a maior e mais complexa dentre os Characiformes, compreendendo a maioria dos peixes de água doce do Brasil, com espécies variando consideravelmente em tamanho, peso, forma, alimentação e comportamento. Recentemente, várias espécies deste grupo foram listadas como *Incertae Sedis* devido a falta de evidências consistentes de monofiletismo. Atualmente essa família é composta por 12 subfamílias, além daqueles grupos citados acima. Com o objetivo de levantar informações que possam ser úteis para auxiliar na compreensão dessa complexa ictiofauna, foram realizadas análises citogenéticas em espécies de *Astyanax* aff. *fasciatus*, provenientes da região de Uberlândia-MG, *Astyanax* sp, *Astyanax* aff. *bimaculatus* e *Bryconops* sp da região de Monte do Carmo-TO. *A. fasciatus* apresentou número diplóide igual a 46 cromossomos e um sistema de Ag-RONs múltiplas, as quais se mostraram positivamente coradas pela Cromomicina A₃ (CMA₃). *Astyanax* sp e *Astyanax bimaculatus* apresentaram 50 cromossomos, sendo que no primeiro se verificou a presença de 0 a 6 cromossomos B e um sistema de Ag-RONs simples. Estes sítios se mostraram também heterocromáticos. Além disso, conspícuas marcações heterocromáticas centroméricas e pericentroméricas também foram observadas, *Astyanax bimaculatus* apresentou sistema de Ag-RONs múltiplas com até três pares marcados, alguns dos quais também CMA₃⁺. O bandamento C revelou marcas pericentroméricas em quase todos os cromossomos. *Bryconops* sp apresentou 2n = 48 cromossomos, Ag-RONs simples coincidindo com as marcações de CMA₃ e blocos heterocromáticos centroméricos. Esses resultados vão de encontro à idéia de que o grupo anteriormente tratado como Tetragonopterinae engloba uma diversidade de grupos bastante acentuada o que é um reflexo de sua natureza polifilética.

Palavras-chaves: Characidae, cariótipo, bandamento, cromomicina.

Abstract:

The family Characidae is the largest and most complex among the Characiformes, including the majority of freshwater fish in Brazil, with species varying considerably in size, weight, shape, diet and behavior. Recently, this group was listed as *Incertae Sedis* due to lack of consistent evidence of monophyly going to have only 12 subfamilies beyond those cited groups above. With the objective of raising information that can be useful to assist in the understanding of this complex ictiofauna, cytogenetic analysis were performed on species of *Astyanax* aff. *fasciatus* from the region of Uberlândia-MG, *Astyanax* sp, *Astyanax* aff. *bimaculatus* and *Bryconops* sp the region of Monte do Carmo-TO. *A. fasciatus* showed diploide number of 46 chromosomes and a system of multiple Ag-NORs, which proved to positively stained Chromomycin A₃ (CMA₃). *Astyanax* sp and *Astyanax bimaculatus* showed 50 chromosomes, being that in the first one if it verified the presence from 0 to 6 chromosomes B and a system Ag-NORs simple. These small farms if had also shown heterochromatic. Moreover, conspicuous centromeric and pericentromeric heterochromatics markings had been also observed, *Astyanax bimaculatus* presented system Ag-NORs multiple with up to three pairs marked, some of which also CMA₃⁺. C-banding revealed centromeric marks in almost all chromosomes. *Bryconops* sp presented 2n = 48 chromosomes, Ag-NORs simple coinciding with the markings CMA₃ and centromeric heterochromatic blocks. These results go of meeting to the idea that the group previously treated as Tetragonopterinae encompasses a diversity to groups sufficiently accented what it is a consequence of its polifiletic nature.

Key-words: Characidae, karyotype, banding, chromomycin.

2.1 Introdução

Os Characiformes constituem um grupo composto por cerca de 12 famílias, apresentando uma grande amplitude de variações morfológicas. Representantes desse grupo ocorrem em praticamente todos os ambientes de água doce, sendo coletados com relativa facilidade na maioria dos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes (BRITSKY *et al.*, 1988).

A família Characidae é uma das maiores e mais complexas entre os peixes Neotropicais (NELSON, 2006). Além disso, existem diversos gêneros ainda não bem caracterizados quanto às suas relações filogenéticas. Lima *et al.* (2003) consideram vários gêneros “*Incertae Sedis*” em Characidae, dentre os quais se encontram os gêneros *Astyanax* e *Bryconops*.

O gênero *Astyanax* corresponde à maior unidade taxonômica dos antigos Tetragonopterinae, contendo 85 espécies e subespécies nominais descritas e distribuídas amplamente na região Neotropical (LIMA *et al.*, 2003). Entretanto, esse número está subestimado, uma vez que várias novas espécies tem sido descritas (BERTACO; LUCINDA, 2005; HALUCH; ABILHOA, 2005; BERTACO; LUCENA, 2006; MELO; BUCKUP, 2006; VARI; CASTRO, 2007; GARUTTI; VENERE, 2009), seja por constituírem táxons ainda desconhecidos ou por fazerem parte de grupos maiores, mas com diferenciação morfológica e que tem passado por revisões taxonômicas. *A. altiparanae*, por exemplo, é uma designação recente, dada às populações do Alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Dentro do gênero *Astyanax*, os lambaris que compõem o grupo *A. altiparanae-bimaculatus*, conhecidos popularmente por “lambaris do rabo amarelo” ou “lambari relógio”, são caracterizados por apresentarem uma mancha ovalada e escura na região umeral e outra na base da nadadeira caudal. É composto por peixes com grande capacidade de se ajustar a condições ambientais diferenciadas e com amplo espectro de interação, devido a sua estrutura e densidade populacional (ORSI *et al.*, 2004). O reflexo disso é uma ampla distribuição geográfica do grupo, que se estende por praticamente toda a região Neotropical (EIGENMANN, 1921 *apud* KAVALCO *et al.*, 2009).

Segundo Garutti (1995) o gênero *Astyanax* tem uma distribuição estruturada, sugerindo um grande nível de endemismo. Mesmo dentro de uma mesma bacia hidrográfica há múltiplas formas com distribuição geográfica relativamente restrita. Em vista disso, supõe-se que os lambaris não formem um grupo uniforme, havendo variações de população para população, provavelmente por esse grupo habitar uma grande variedade de microambientes (GARUTTI; BRITSKI, 2000), embora seja mais bem sucedido em habitats melhor preservados (ORSI *et al.*, 2004). Portanto, espera-se que populações destes lambaris apresentem estruturação genética ao longo de um rio (LEUZZI *et al.*, 2004), embora estudos anteriormente tenham indicado baixa variabilidade entre populações dos rios Paraná e Iguaçu, devendo serem mantidas no mesmo grupo, sob uma mesma denominação específica (PRIOLI *et al.*, 2002).

Os dados citogenéticos são potencialmente informativos sobre os padrões evolutivos dos diferentes táxons de peixes de água doce Neotropicais. Embora a variação cromossômica seja comum entre as espécies, os mecanismos de fixação de rearranjos cromossômicos são ainda motivo de muita discussão. Além disso, alguns caracteres interessantes tem sido descritos no gênero *Astyanax*, como polimorfismos cromossômicos (PAZZA *et al.*, 2006) e cromossomos B (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004). Adicionalmente, os dados sobre diferentes espécies podem contribuir com o conhecimento sobre a evolução cariotípica do gênero e da família que de maneira geral ainda é obscura.

Embora estudos prévios tenham caracterizado citogeneticamente várias populações de *Astyanax*, ainda são escassas as análises de exemplares provenientes das bacias dos rios da Região Norte do país, assim como *Bryconops* que quase não possui estudos.

Com o intuito de fornecer dados citogenéticos recentes e complementares aos já descritos, que possibilitem estudos posteriores comparativos, foram realizadas análises cariotípicas em exemplares de *A. fasciatus*, *Astyanax* sp., *A. bimaculatus* e *Bryconops* sp., os quais foram analisados utilizando-se metodologias de coloração convencional, bandamento cromossômico e fluorocromos.

2.2 Material e Métodos

Foram analisados 23 exemplares (15 machos e 8 fêmeas) de *Astyanax fasciatus*, coletados no Córrego dos Caetano (18°44'56" S 048° 18'39"W) (bacia do Rio Paranaíba) na região de Uberlândia Minas Gerais, Brasil; 10 exemplares (6 machos e 4 fêmeas) de *Astyanax* sp, 32 exemplares (12 machos, 8 fêmeas e 12 com sexo indeterminado) de *A. bimaculatus* e 17 exemplares (9 machos e 8 fêmeas) de *Bryconops* sp, coletados no Córrego Taboquinha (10°47'11.12"S 48°13'16.57"W) (bacia do Rio Tocantins) na região de Monte do Carmo Tocantins, Brasil.

Os peixes foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta da Universidade Estadual de Londrina, onde foram depositados.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior descrita por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993).

A heterocromatina constitutiva foi obtida por meio da técnica descrita por Sumner (1972). As Ag-RONs foram detectadas utilizando-se a técnica descrita por Howell e Black (1980). As heterocromatinas ricas em bases GC foram obtidas pela técnica de coloração com Cromomicina A₃ descrita por Schmid (1980). A morfologia de cada cromossomo foi estabelecida conforme a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964).

2.3 Resultados

Astyanax fasciatus (Figura 3b), apresentou $2n = 46$ cromossomos para machos e fêmeas e fórmula cariotípica composta de 6 pares m, 11sm, 4st, 2a e NF = 88 (Figura 3a). A detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RONs), demonstrou um sistema múltiplo desses sítios, com variabilidade no número de cromossomos marcados, observando-se até 10 marcações Ag-RONs⁺ (Figura 3c). A análise dos padrões de heterocromatina constitutiva pelo bandamento C mostrou blocos marcados na região telomérica e as Ag-RONs se apresentaram banda C positivas (Figura 3d).

O emprego do fluorocromo CMA₃ evidenciou marcas teloméricas em alguns cromossomos, sendo que alguns foram correspondentes aos cístrons ribossômicos (Figura 3e).

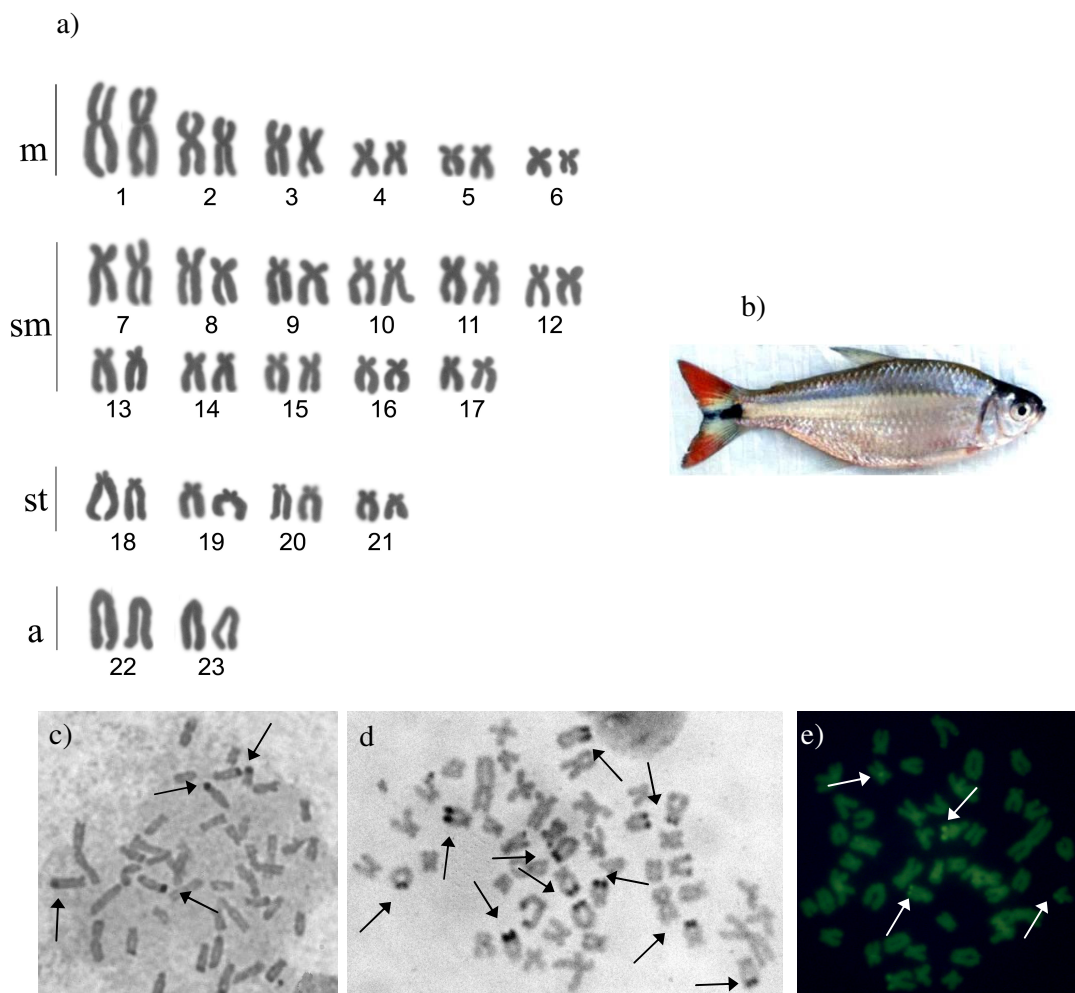


Figura 3 – *Astyanax fasciatus* do Córrego dos Caetano. Cariótipo (a), exemplar (b), metáfases indicando os sítios de Ag-NOR (c), bandamento C (d) e Cromomicina A₃ (e).

Astyanax sp (Figura 4b), apresentou $2n = 50$ cromossomos, e cariótipo composto por 8 pares m, 15sm, 2st e NF = 100 (Figura 4 a). Foi observada a ocorrência de microcromossomos B em alguns indivíduos machos variando de 0 a 6 em 30% das metáfases analisadas, sendo que a maior frequência encontrada foi de 2 microcromossomos (Figura 4e). As análises das Ag-RONs mostraram apenas um par cromossômico ativo (Figura 4c). O padrão de banda C foi caracterizado por marcas centroméricas, pericentroméricas e uma marcação telomérica coincidindo com a região AgRONs⁺ (Figura 4d).

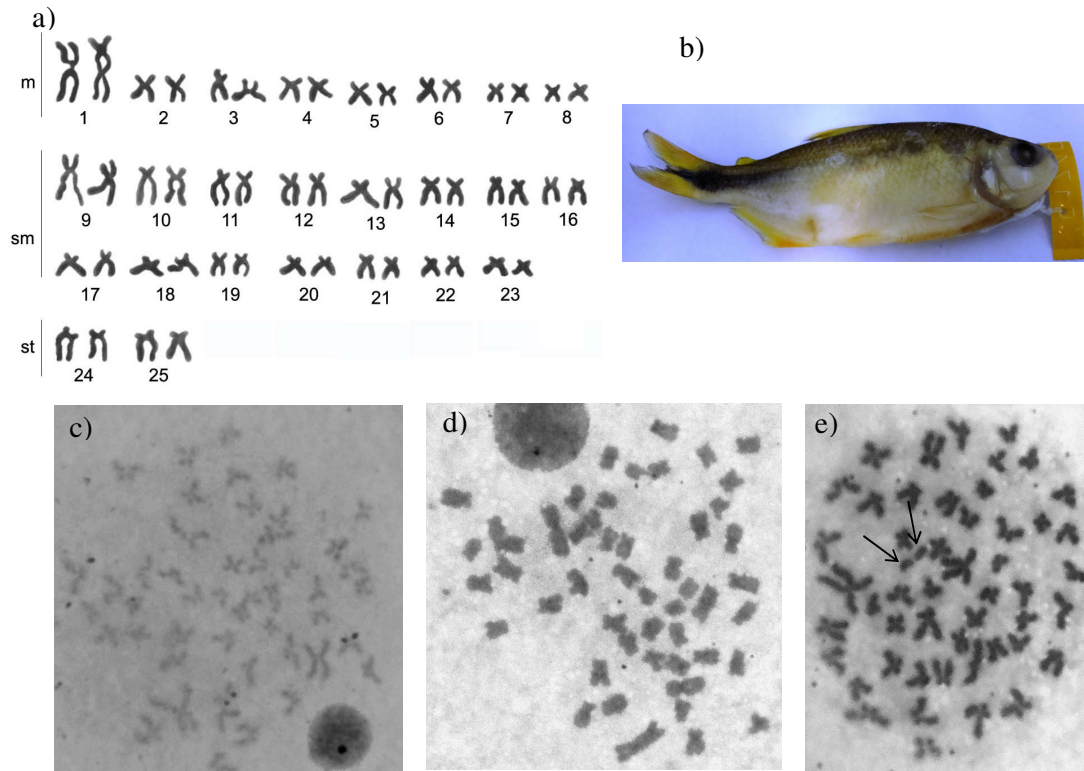


Figura 4 – *Astyanax* sp do Córrego Taboquinha. Cariótipo (a), exemplar (b). Metáfases indicando os sítios de Ag-NOR (c), bandamento C (d) e os cromossomos B (e).

Os exemplares de *A. bimaculatus* (Figura 5b) apresentaram um número diplóide modal de 50 cromossomos em ambos os sexos, constituído por 4 pares m, 13sm, 5st, 3a e NF = 94 (Figura 5a).

As análises das Ag-RONs mostrou mais de um cístron ribossômico ativo com até três pares por célula (Figura 5c). O bandamento C revelou marcas centroméricas em quase todos os cromossomos do complemento. Os blocos localizam-se predominantemente em posição pericentromérica (Figura 5d). Após tratamento com fluorocromo GC específico Cromomicina A₃, algumas destas regiões correspondentes às Ag-RONs mostraram-se intensamente brilhantes além de outras regiões brilhantes não correspondentes a esses sítios, como por exemplo, na região centromérica do primeiro par cromossômico (Figura 5e).