

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTRUTURA E EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA DE
PEIXES CICLÍDEOS SUL AMERICANOS**

HERALDO BRUM RIBEIRO

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTRUTURA E EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA DE
PEIXES CICLÍDEOS SUL AMERICANOS**

HERALDO BRUM RIBEIRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. CESAR MARTINS

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ribeiro, Heraldo Brum.

Estrutura e evolução cariotípica de peixes cichlídeos sul americanos /
Heraldo Brum Ribeiro. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Cesar Martins

Assunto CAPES: 20601000

1. Peixe - Citogenética 2. Peixe – Evolução

CDD 597.15

Palavras-chave: Cichlidae; Citogenética; Peixe

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Cesar Martins pela confiança depositada e oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia da IBB-UNESP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pelo auxílio na realização deste estudo.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela oportunidade concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos recursos financeiros destinados aos projetos do laboratório.

Drs. Cláudio Oliveira, Fausto Foresti, Adriane P. Wasko e dos Técnicos Renato Devidé e Ricardo Teixeira, integrantes do grupo de Genética de Peixes do IBB-UNESP.

Aos Prof. Dr. Paulo César Venere e Prof. Dr. Issakar Lima Souza da UFMT e Prof. Mauro Nircho da Universidad de Oriente, Venezuela.

Aos amigos Prof^a Dr^a Alice Maria Derbócio, Prof Dr. Helder Silva e Luna, Dr. Ricardo Gentil Pereira, Prof. Gelson Feijó Roos, Prof. Arlindo de Figueiredo Beda (UFMS Câmpus de Aquidauana-MS) pelo incentivo e por acreditar que eu também pudesse participar desse mundo tão restrito que é o mundo científico.

Aos colegas do Campus de Aquidauana (CPAQ) pela torcida,

À Irani Ferreira, Luiz Ricardo, Welcy, Daniela, Alex Ferreira, Cristiane e Prof. Celso Benites pelo apoio incondicional à que minha passagem pelo laboratório de Biologia e Genética de Peixes obtivesse sucesso.

Aos demais colegas que, de alguma forma, participaram com ajuda e pelo ambiente saudável e descontraído,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. – Árvore filogenética da família Cichlidae.....	07
Figura 2 – Mapa da América do Sul situando os locais de coletas.....	12
Figura 3 – Espécies coletadas.....	14
Figura 4 – Cariótipos das espécies representativas de ciclídeos analisados.....	26
Figura 5 – Metáfases coradas pelo Nitrato de Prata evidenciando par cromossômico..... portador das RONS.....	28
Fig 6 – Cromossomos metafásicos de espécies de ciclídeos submetidas ao..... bandamento C.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies analisadas e locais de coletas.....	14
Tabela 2 – Caracterização cromossômica das espécies analisadas.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Considerações gerais sobre a citogenética de peixes.....	01
1.2 A ordem Perciformes	02
1.3 Considerações gerais sobre a família Cichlidae.....	03
1.4 Aspectos genéticos e citogenéticos da Família Cichlidae.....	05
2 OBJETIVOS.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4 RESULTADOS.....	19
4.1 Retroculinae.....	19
4.2 Cichlinae.....	19
4.3 Astronotinae.....	19
4.4 Geophaginae.....	20
4.5 Cichlasomatinae.....	21
5. DISCUSSÃO.....	30
5.1 Comparações cariotípicas entre as espécies de ciclídeos.....	30
5.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo em espécies da Família Cichlidae.....	32
5.3 Distribuição da heterocromatina constitutiva em espécies da Família Cichlidae.....	33
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

Os ciclídeos são considerados peixes secundários adaptados à água doce e distribuídos principalmente pela África, América Central e América do sul. Nesse trabalho foram realizados estudos citogenéticos em 24 espécies representantes das principais subfamílias de ciclídeos sul-americanos com o objetivo de fornecer contribuições ao entendimento das tendências que governam a evolução cromossômica no grupo. Para isto foram realizadas análises da macroestrutura cariotípica através de coloração convencionais com Giemsa, localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) através de coloração com Nitrato de Prata e identificação de regiões heterocromáticas através de bandamento C. A análise da macroestrutura cariotípica revelou que, embora eventos de rearranjos cromossômicos ocorreram no grupo, os ciclídeos mantêm ainda as características basais do cariótipo dos Perciformes composto por 48 cromossomos subtelo-acrocêntricos. As RONs estiveram presentes em um único par cromossômico, porém em posições variáveis, caracterizando a ocorrência de rearranjos envolvendo estes cromossomos. Embora blocos de heterocromatina tenham sido identificados principalmente no centrômero de todas as espécies analisadas, algumas espécies apresentaram grandes segmentos heterocromáticos intersticiais caracterizando eventos de ganhos de heterocromatina que levaram a diferenciação de cariótipos específicos. As análises citogenéticas realizadas mostram que, embora aparentemente conservada, a estrutura cariotípica dos ciclídeos tem sofrido inúmeros rearranjos ao longo da sua história evolutiva.

ABSTRACT

Cichlids are considered secondary fish adapted to the freshwater and distributed mainly in Africa, Central America and South America. Cytogenetic studies in 24 representative species of the main subfamilies of South American cichlids were conducted with the objective to supply informations about the chromosome evolution in the group. The karyotype macrostructure was analyzed through Giemsa staining and localization of the nucleolar organizer regions (NORs) through silver staining technique and the identification of heterochromatic regions through C-banding. The analysis of the karyotype macrostructure showed that although events of chromosome rearrangements occurred in the group, the cichlids still maintain the basic karyotype structure of Perciformes with 48 subtelocentric and acrocentric chromosomes. The NORs were observed in only one chromosome pair, however in different positions, characterizing the occurrence of rearrangements involving the NOR-bearing chromosomes. Although heterochromatic blocks have been mainly identified in centromeres of all analyzed species, some species presented large interstitial heterochromatin segments characterizing events of heterochromatin accumulation that had led to the differentiation of specific karyotypes. Although the cytogenetic data obtained showed an apparently conserved chromosome structure, the cichlid karyotypes have suffered rearrangements throughout its evolutionary history.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a citogenética de peixes.

Os peixes apresentam grande diversidade morfológica, ocupam uma ampla diversidade de habitats e apresentam uma história evolutiva bastante peculiar. Essas características fazem com que a compreensão da sua sistemática e história evolutiva seja um tema ainda sujeito a muita discussão tornando-os um excelente material básico nos estudos voltados a questões adaptativas, taxonômicas e evolutivas. Dos peixes-bruxas e lampreias aos tubarões, linguados e peixes pulmonados, os peixes formam um grupo bastante amplo. Os de nadadeiras raiadas são os que dominam em número de espécies e são mais intimamente relacionados aos mamíferos do que em relação aos peixes cartilagosos. (Nelson, 2006).

A citogenética tem se mostrado um ramo dinâmico da ciência que se adapta às necessidades e as novas tecnologias, mantendo-se sempre como uma área em destaque na genética. Assim, especialmente em peixes, onde são vários os problemas já abordados, juntamente com outros que surgem a todo o momento, há muito a ser investigado. Um dos primeiros trabalhos relativo a citogenética de peixes neotropicais a aparecer na literatura data de 1943 e outros surgiram somente nas décadas de 60 e 70 (Thompson, 1979). A partir desse período ocorreu um franco crescimento na citogenética, sendo cada vez maior o número de laboratórios espalhados pelo Brasil e outros países da América do Sul envolvidos com esse tipo de pesquisa.

Apesar de estudos citogenéticos envolvendo os peixes terem gradativamente aumentado ao longo dos últimos anos, o conhecimento nesse campo é muito restrito se comparado a outros grupos, como por exemplo, mamíferos. Porém a evolução das técnicas e a qualidade das preparações cromossômicas permitiram um aumento sensível no número de espécies estudadas e a descrição das suas características cromossômicas, contribuindo de maneira marcante para um melhor entendimento das estruturas genéticas, questões evolutivas e sistemáticas desse grupo (Ojima, 1983; Martins, 2006). Informações cromossômicas sobre os peixes de águas continentais cobrem um total de 78% das espécies conhecidas. Por exemplo, das 1334 espécies de peixes neotropicais de água doce (Lowe-McConnel, 1999), cerca de 1045 delas já possuem dados cariotípicos (Oliveira, em publicação).

Estudos citogenéticos em peixes, também têm contribuído para a seleção de matrizes reprodutoras e para criação em cativeiro de linhagens apropriadas à comercialização de proteína animal (Martins *et al.*, 2002).

Outra ferramenta importante que trouxe e continua trazendo contribuições substanciais são os marcadores citogenéticos. Com essas ferramentas, se torna possível determinar a

caracterização de populações, espécies e grupos supra-específicos de peixes, incluindo não somente número cromossômico e fórmula cariotípica, mas também sistemas de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supranumerários, número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), distribuição da heterocromatina constitutiva, bandeamento G e R e coloração por fluorocromos base-específicos (Almeida-Toledo, 1998).

Até a metade do século passado, a sistemática baseava-se exclusivamente na análise da variação morfológica dos organismos. Com o advento da genética e da biologia molecular, os estudos dos ácidos nucléicos (DNA, RNA), proteínas e cromossomos, além dos caracteres morfológicos, tornaram-se importantes marcadores, contribuindo para a compreensão da diversidade biológica representada em populações ou grupos em estudo (Martins, 1997).

1.2. A Ordem Perciformes

Perciformes é a maior e mais diversificada ordem dos vertebrados, compreendendo 20 subordens, 160 famílias, cerca de 1.540 gêneros e aproximadamente 10.033 espécies. Pelo menos 52 famílias possuem um único gênero dos quais 23 são monotípicos e outros 21 possuem 100 ou mais espécies. Das 20 subordens, três (Percoidei, Labroidei e Gobioidi) compreendem 75% desta ordem. Das 160 famílias, somente oito são representativas (Gobiidae, Cichlidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Pomacentridae, Apogonidae e Sicanidae) e juntas, com 5.479 espécies constituem cerca de 55% de todos os Perciformes. Estão presentes em quase todos os ambientes aquáticos com ocorrência mais freqüente (aproximadamente 80% das 9.283 espécies) nos mares e oceanos. Como é um grupo basal dentro de Teleostei, acredita-se que diversos outros grupos tenham se derivado de Perciformes (Brum e Galetti Jr., 1997; Nelson, 2006).

Este grupo, apesar de ser ecológica e morfológica diversa, alcançou um nível evolutivo significativo quando comparado com outros teleósteos inferiores. Além disso, é tido como um grupo polifilético devido à falta de características especializadas ou combinações destas que o caracterizem como monofilético (Lauder e Liem, 1983; Brum, 1995; Nelson, 2006).

Muitos dos peixes marinhos de grande importância econômica estão presente na ordem Perciformes. Estes apresentam padrões de cores fascinantes tornando as espécies de pequeno porte muito atraente para os aquarofilistas e as de grande porte como fonte de alimentação e pesca esportiva (Axelrod, 1996), podendo se destacar alguns muito conhecidos como: garoupas e badejos (Serranidae), pampos (Carangidae), vermelhos (Lutjanidae),

cocorocas (Haemulidae), curvinas e pescadas (Sciaenidae), robalos (Centropomidae), entre outros (Brum, 1995).

1.3. Considerações gerais sobre a Família Cichlidae

Dentro da ordem Perciformes a sub-ordem Labroidei é composta por seis famílias com 219 gêneros e aproximadamente 2.234 espécies formando um clado monofilético. A monofilia desse grupo é sustentada por caracteres da região da faringe principalmente a mandíbula faringeal, especializada em processar alimentos. Do total de espécies de Labroidei, 1.275 pertencem à família Cichlidae formando um dos maiores grupos de peixes teleósteos, ocupando o quarto lugar entre os peixes em número de espécies (Nelson, 2006).

De acordo com Nelson (2006), a posição taxonômica desta família é a seguinte:

Classe – Osteichthyes

Sub-Classe – Actinopterygii

Infra-Classe – Teleostei

Divisão – Euteleostei

Infra-Divisão – Neoteleostei

Super-Ordem – Acanthopterygii

Série – Percomorpha

Ordem – Perciformes

Sub-Ordem – Labroidei

Família – Cichlidae

A família Cichlidae Bonaparte 1840 é um grupo que possui maior quantidade de espécies entre os peixes teleósteos: espécies espalhadas principalmente na África Tropical e América do Sul; além disso, esta é uma das poucas famílias de peixes tropicais cuja monofilia é praticamente incontestável (Marescalchi, 2005).

Apesar de serem menos expressivos quanto ao número de espécies quando comparados aos ciclídeos africanos, os ciclídeos Neotropicais são extremamente variados em morfologia, comportamento e ecologia (Nelson 2006). Desde 1906 quando Regan (1906) revisou completamente o grupo, o número de espécies e gêneros têm crescido consideravelmente (Thompson, 1979); Kullander e Nijssen (1989) descreveram 239 espécies e 36 gêneros incluindo seis novas espécies e três gêneros descritos por eles mesmos (Marescalchi, 2004). Hoje, há dados informativos de 450 espécies já descritas (Kullander,

2006). Entretanto, dados citogenéticos ainda são baixos (menos de 25%) segundo Oliveira (em publicação).

Os ciclídeos compreendem uma família rica em espécies com uma taxa de especiação extremamente rápida e são formados por peixes altamente especializados de acordo com alguns autores (Kornfield, 1978; Thompson, 1979). Os ciclídeos são reconhecidos como um grupo natural destacando-se pelo grande sucesso evolutivo e alta taxa de especiação e especialização. A mais espetacular radiação observada entre os vertebrados é representada pelos ciclídeos dos lagos do leste da África, onde em pelo menos 10 milhões de anos surgiram quase 2.000 espécies a partir de um único ancestral (Kocher, 2004). São considerados peixes de água doce secundários, identificados como um grupo de espécies que evoluíram a partir de grupos marinhos. Possuem hábitos diurnos, fazem ninhos, cuidam da prole protegendo os ovos e jovens. Podem adaptar-se a ambientes de condições extremas, apesar de preferirem ambientes lênticos (Feldberg *et al.*, 2003).

Os ciclídeos foram os principais peixes tropicais a apresentarem uma distribuição geográfica natural das planícies do continente ancestral Gondwana. Seus fósseis mais antigos datam do Eoceno na América do sul e do Oligoceno da África e são altamente especializados em relação ao número de dentes assemelhando-se muito aos atuais. Assim, acredita-se que tenham surgido ainda no Cretáceo e se diferenciando anteriormente à fragmentação da Gondwana há mais de 100 milhões de anos (Stiassny, 1987; Nelson, 2006; Wikipédia, 2006).

Com a fragmentação da Gondwana (entre 135 a 65 milhões de anos), dois grupos teriam se formado distintamente: os ciclídeos africanos (Velho Mundo) e os ciclídeos sulamericanos. Da América do Sul atingiram a América Central e sul da América do Norte (mais precisamente no México) (Murray, 2001).

A maior parte das espécies está na África, sendo muitas endêmicas dos lagos da região central (Lagos Kivu, Edward, Vitória, Malawi, Tanganyika, entre outros), ocorrendo também em outros lagos menores. Encontram-se, ainda, ciclídeos em rios, riachos e charcos por toda África Ocidental, África do Sul e Madagascar. Na Ásia, provavelmente, há apenas três espécies naturais. Não há registros da ocorrência de ciclídeos na Austrália, Nova Zelândia, Ártico ou Antártico, Canadá, Alasca, Europa e Japão (Kullander, 1998; Axelrod, 1989).

Os ciclídeos africanos podem ser divididos em três grandes grupos: (1) *Pelmatochromine*, (2) *Haplochromine* e (3) *Tilapiine* (Lowe-McConnell, 1999). Os haplocromíneos da África Central e Leste, especialmente aqueles dos grandes lagos do *Rift Valley*, têm passado por um evento de especiação extraordinário. Acredita-se que

aproximadamente 500 espécies tenham se diferenciado em um tempo extremamente curto (12.400 anos) a partir de uma única espécie ancestral. Mesmo com estimativas baixas do número de espécies e sua idade elevada, os haplocromíneos ainda representam um dos mais intrigantes exemplos de especiação e diversificação em vertebrados (Galis & Metz, 1998).

A tribo Tilapiini, cujas espécies são comumente denominadas de tilápias, inclui os gêneros *Sarotherodon*, *Oreochromis* e *Tilapia*, e um quarto gênero, *Danakilia*, que possui uma única espécie. Em contraste com as espécies de haplocromíneos, altamente especializadas, os tilapiíneos apresentam um plano corporal mais geral e são freqüentemente habitantes de rios, enquanto que a maioria dos haplocromíneos vive em lagos. Pela sua morfologia menos especializada, os tilapiíneos são altamente adaptáveis a habitats ecológicos diversos e presumivelmente menos propensos a extinção (Klett & Meyer, 2002).

Embora aproximadamente 70 espécies recebam a denominação de “tilápia”, somente *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus*, *O. urolepis hornorum* e seus híbridos, têm grande importância na piscicultura mundial. O sabor suave da carne, padrão de coloração do corpo, a reprodução em cativeiro sem necessidade de indução hormonal, o cuidado parental e a tolerância a diferentes condições ambientais tornam as tilápias ideais para a aquicultura (Watanabe *et al.*, 2002).

Em contraste com seus parentes dos lagos africanos, a maioria das espécies sul-americanas é amplamente distribuída. Como esse grupo não possui um período específico para reprodução, com mais de uma geração anual, é possível a fixação de novas recombinações genéticas. Além do mais, o fato de serem territorialistas, favorece o processo evolutivo (Martins-Santos *et al.*, 2005).

No Brasil, os ciclídeos representam apenas 6% da fauna de peixes de água doce. Sua distribuição no território nacional é ampla, ocorrendo desde o norte até o Rio Grande do Sul. Na Amazônia, os ciclídeos são peixes muito comuns, com grande número de espécies e alguns, como o tucunaré (*Cichla* sp) e apaiari (*Astronotus* sp), são de grande importância na alimentação de populações humanas (Feldberg, 1985a).

Apesar de haverem espécies de ciclídeos africanos introduzidas em diversos países do mundo (principalmente a tilápia do Nilo), o número de espécies válidas para a América do Norte, Central e do Sul é de 406 alocadas em 51 gêneros (Kullander, 1998, 2003).

1.4. Aspectos genéticos e citogenéticos da Família Cichlidae

Do ponto de vista genético, o conhecimento do genoma de espécies de ciclídeos é ainda preliminar, e muito aquém do que já se conhece para o “pufferfish” e o “zebrafish”.

Devido a sua importância científica tanto para a biologia fundamental como aplicada, os estudos genéticos relacionados ao mapeamento do genoma de espécies de ciclídeos são oportunos e certamente necessários. Embora nas últimas décadas estudos genéticos tenham sido realizados em um grande número de espécies de ciclídeos, tais análises foram principalmente direcionadas para o conhecimento básico da estrutura cariotípica e poucos trabalhos foram realizados visando o estudo da macro estrutura cariotípica, como mapeamento cromossômico, com a utilização de sondas de DNA ou outros estudos genético-moleculares. Dentre os ciclídeos, a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e *Haplochromis chilotes* são as que mais tem recebido atenção dos pesquisadores em relação à organização e localização de seqüências de DNA, mapeamento genético e físico nos seus cromossomos (Katagiri *et. al.*, 2001; Watanabe *et. al.*, 2003). Dados sobre mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA foram reunidos por Martins e colaboradores (2004) em uma primeira tentativa em construir um mapa cromossômico para esta espécie. Em relação aos ciclídeos sul-americanos a maioria das informações existentes sobre genética está relacionada a dados cariotípicos e análises da filogenia das espécies.

Diversas filogenias com base em caracteres morfológicos e moleculares vêm sendo propostas há quase um século por vários autores (p. ex. Pellegrin, 1904; Regan, 1906, 1920, 1922b; Vandewalle, 1971; Trewavas, 1973, 1983; Greenwood, 1974a, 1978, 1987a, Cichocki, 1976; Stiassny, 1981a, 1987; Kullander, 1983b, 1984; Oliver, 1984) com o intuito de contribuir para a compreensão da história evolutiva dos ciclídeos, inclusive possibilitando a elucidação de algumas lacunas em relação a sua constituição como grupo natural (Stiassny, 1991; Feldberb *et al.*, 2003).

Kullander (1998) propôs uma nova filogenia para a família Cichlidae baseado em 91 caracteres morfológicos de 43 espécies sul-americanas e 7 espécies do velho mundo. Segundo esta hipótese, as subfamílias Etroplinae (Ciclídeos de Málaga na Índia) e Pseudocrenilabrinae (Ciclídeos Africanos) são grupos próximos e formam um grupo irmão de todos os ciclídeos. Nessa proposta, os ciclídeos sul-americanos estão organizados nas seguintes subfamílias: Retroculinae; Cichlinae; Astronotinae; Geophaginae e Cichlasomatinae (Figura 1).

Outra análise filogenética realizada na família Cichlidae, utilizando DNA mitocondrial, demonstrou que os ciclídeos neotropicais formam um grupo monofilético tendo *Retroculus* (Retroculinae) como grupo basal. Além disto, demonstram portar níveis significativos de variação genética do que os africanos, apesar do menor número de espécies (Farias *et al.*, 2000).

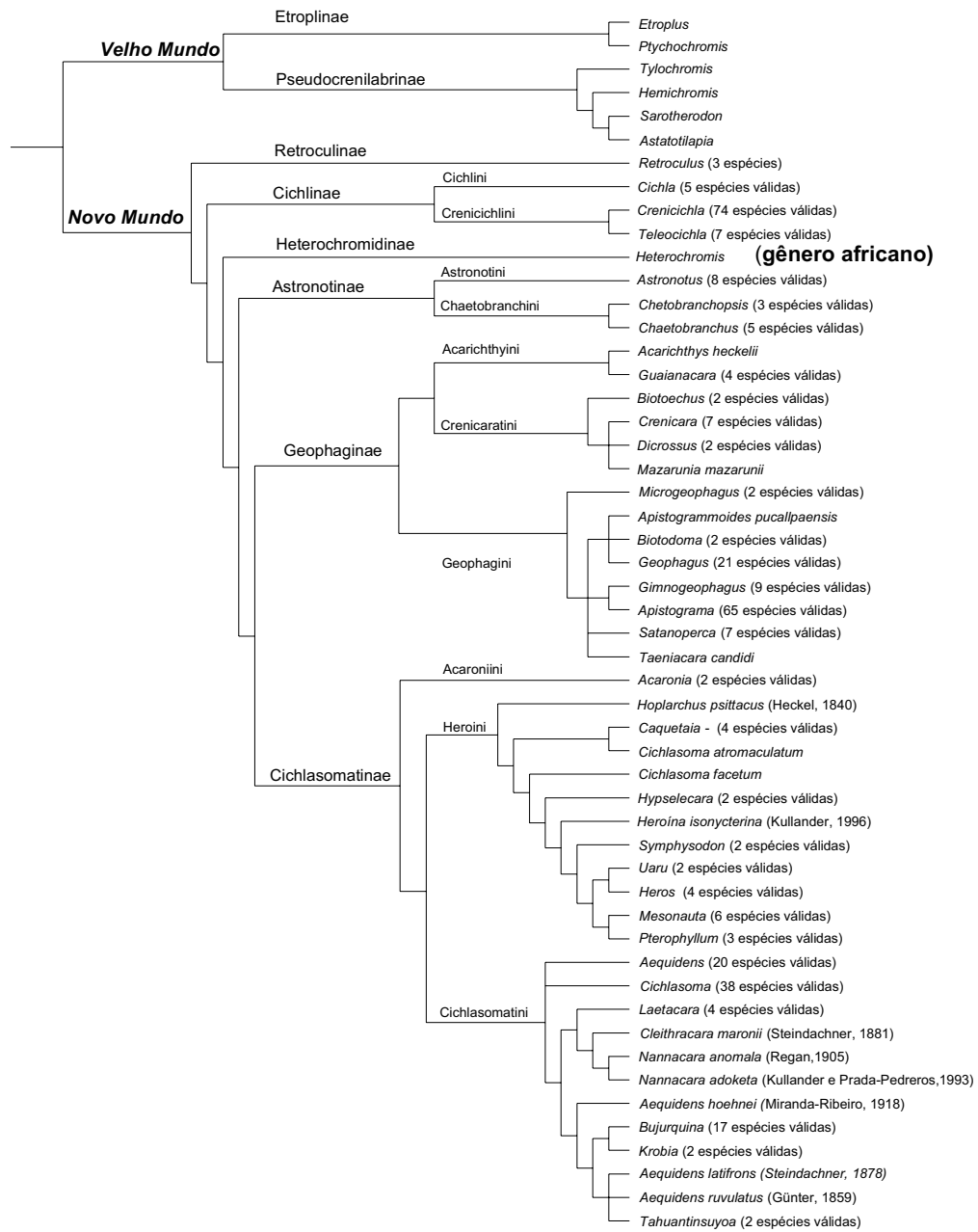


Figura 1 - Árvore filogenética da família Cichlidae.

Fonte: KULLANDER (2006).

Com o desenvolvimento de técnicas básicas para análise citogenética de peixes, inúmeros trabalhos têm sido direcionados à investigação cromossômica destes organismos. Com exceção de diversos estudos envolvendo citogenética molecular realizados em *O. niloticus*, os estudos cromossômicos desenvolvidos em diversas espécies de ciclídeos baseiam-se exclusivamente em análises citogenéticas básicas utilizando Giemsa, coloração Ag-RON e Bandamento C.

Os ciclídeos são os peixes mais estudados citogeneticamente dentro da ordem Perciformes. Dentre as 1045 espécies que contém dados cariotipados, 112 são da família Cichlidae, representando pouco menos do que 25% do total de espécies de ciclídeos (Oliveira *et al.*, em publicação). Os estudos citogenéticos em ciclídeos foram realizados, principalmente, a partir de 1975, podendo destacar os trabalhos de Oyhenart-Perera *et al.* (1975), Michele & Takahashi (1997), Kornfield *et al.* (1978), Thompson (1979), Vervoort (1980) e Feldberg & Bertollo (1985).

Thompson (1979) levantou informações sobre o cariótipo de 41 espécies de ciclídeos Neotropicais com preparações em Giemsa sendo então a única técnica utilizada para fazer a análise, onde somente a morfologia dos cromossomos pôde ser verificada.

Até 1979, eram conhecidos os números haplóide-diploide de poucas espécies de ciclídeos (em torno de 60). O trabalho de Thompson (1979) forneceu o primeiro cenário para o entendimento de padrões de evolução dos cariótipos dessa família. Kornfield (1984) apresentou informações sobre análises cromossômicas de 70 espécies. Feldberg & Bertollo (1985) analisaram os cariótipos de 10 espécies de ciclídeos embora 5 delas já haviam sido submetidas a estudos citogenéticos. Diversos outros trabalhos seguiram acrescentando novas espécies à lista dos ciclídeos citogeneticamente estudados.

De acordo com estes trabalhos o cariótipo ancestral dos ciclídeos é representado por $2n=48$ cromossomos acrocêntricos e assim qualquer diferença desta condição representaria uma derivação evolutiva deste estado. Por exemplo, a variação cromossômica em Etroplinae é de 46 a 48 cromossomos e para o clado Pseudocrenilabrinae é de 32 a 48 cromossomos. Considerando que $2n=48$ acrocêntricos representa o número diplóide ancestral para a família, isto sugere que a evolução cromossômica nos dois clados mais basais ocorreu em duas direções: mantendo o número diplóide de $2n=48$ e decrescendo a partir deste número (provavelmente pela fusão cromossômica devido à presença de cromossomos com dois braços em várias espécies). Comparados aos Neotropicais, os ciclídeos do Velho Mundo apresentam menos variação cariotípica, tanto em relação ao número diplóide quanto em estrutura cromossômica.

Por outro lado, a variação cromossômica dos ciclídeos do Novo Mundo é mais pronunciada, com o número diplóide variando entre 38 a 60 cromossomos, evidenciada em linhagens derivadas de Cichlasomatinae e Geophaginae. Com base nesses dados foram sugeridas três direções evolutivas para esse clado: a primeira direção é caracterizada pela manutenção de $2n=48$ cromossomos acrocêntricos, ou com poucos cromossomos meta-submetacêntricos, devido principalmente a inversões pericêntricas. Esta tendência evolutiva está presente em espécies das subfamílias Cichlinae, Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae. A segunda tendência evolutiva inclui um decréscimo em número diplóide em paralelo a um grande número de cromossomos de dois braços (m-sm), sugerindo fusões cromossômicas e inversões pericêntricas. Essa direção é visível nas subfamílias Geophaginae e Cichlasomatinae. A terceira direção resulta de um aumento no número diplóide ($2n=50$ a 52), embora a maioria dos cromossomos permaneça acrocêntrica sugerindo um caráter derivado devido a inversões pericêntricas e subseqüentes fissões cêntricas, explicando o crescente número diplóide. Essa direção evolutiva está presente somente em espécies da subfamília Cichlasomatinae. Dessa última subfamília, o gênero *Symphysodon* ainda requer uma análise mais detalhada para o entendimento da principal tendência evolutiva. Este gênero possui somente duas espécies descritas e apresenta um cariótipo incomum tanto dentro dos ciclídeos Neotropicais quanto dentro dos Perciformes em geral. O número diplóide maior que 48 foi encontrado somente em 13 espécies. As duas espécies de *Symphysodon* apresentam $2n=60$ cromossomos, principalmente do tipo m-sm (Feldberg *et al.* 2003).

As variações que mantêm o número diplóide têm sido atribuídas a mecanismos de rearranjos estruturais principalmente inversões pericêntricas enquanto que aqueles que modificam o número cromossômico são atribuídos a fissões e fusões cêntricas. O padrão tem sido o mais freqüente entre os ciclídeos e grande responsável por variações intra e inter-específica (Brum e Galetti, 1997; Fedberg *et al.*, 2003). Porém, polimorfismo entre os Perciformes o qual envolve rearranjos Robertsonianos tem sido relatado principalmente em Gobids (Thode *et al.*, 1985; Giles *et al.*, 1985).

Os ciclídeos, de uma forma geral, apesar de constituírem uma unidade filogenética, têm apresentado muitas divergências no interrelacionamento entre seus clados. Mesmo com os avanços já alcançados, restam ainda muitas dúvidas em relação aos mecanismos cromossômicos que tiveram envolvimento na diversificação cariotípica dos ciclídeos. Com o advento de novas linhas de pesquisas baseadas em caracteres cromossômicos, como a citotaxonomia, espera-se compreender melhor a filogenia deste grupo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é fornecer contribuições ao entendimento da história evolutiva dos ciclídeos com base em análises cromossômicas. Diante disso, são objetivos específicos do presente trabalho:

- Realizar análises citogenéticas comparativas em espécies de ciclídeos Sul Americanos.
- Elaborar uma hipótese de evolução cromossômica para os ciclídeos Sul Americanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Local de Coleta

Foram utilizadas nas análises citogenéticas 24 espécies de peixes da família Cichlidae (Tabela 1, Figura 2 e 3), coletados em seis bacias hidrográficas: 1) **Bacia do Paraná**; 2) **Bacia do Ribeira**; 3) **Bacia do Atlântico Sul**; 4) **Bacia do pantanal**; 5) **Bacia do Tocantins**; 6) **Bacia do Orinoco** (Figura 2). Os locais de coletas estão descritos na Tabela 1.



Figura 2 – Mapa da América do Sul situando os locais de coletas (os números se referem aos locais de coletas).

Tabela 1 – Espécies analisadas e locais de coletas (Os números ao lado da Bacia se referem ao local de coleta no mapa da figura 1).

Espécie	Origem	Bacia hidrográfica
<i>Acaronia nasa</i>	São Felix do Araguaia	Bacia do Tocantins (5)
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS Rio Paraguai – Cáceres, MT.	Bacia do Pantanal (4)
<i>Apistogramma borellii</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS	Bacia do Pantanal (4)
<i>Astronotus ocellatus</i>	Lagoa Cano Furada, Maringá, PR Rio Tietê, Barra Bonita, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Cichla</i> sp.	Reservatório de Tucuruí, Rio Tocantins, Tucuruí, TO	Bacia do Tocantins (5)
<i>Cichla ocellaris</i>	Rio Tietê, Bariri/SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Cichla orinocensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela	Bacia do Orinoco (6)
<i>Cichlasoma facetum</i>	Córrego Campo Novo, Bauru/SP	Bacia do Paraná (4)
<i>Cichlasoma paranaensis</i>	Córrego Campo Novo, Bauru, SP Córrego Carrapato, Penápolis, SP Córrego Olaria, Poloni, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Cichlasoma paranaense</i>	Córrego Batata, Miracatú, SP Córrego Faú, Miracatú, SP	Bacia do Ribeira (2)
<i>Crenicichla vitatta</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS Córrego Campo Novo, Bauru, SP	Bacia do Ribeira (2)
<i>Crenicichla lacustris</i>	Corrego Faú, Córrego da Batata – Miracatu SP	Bacia do Ribeira (2)
<i>Crenicichla</i> sp1.	Córrego Carrapato, Penápolis, SP Lagoa Canoa Furada, Maringá, PR	Bacia do Paraná (1)
<i>Crenicichla</i> sp2.	Córrego Olaria, Poloni, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Crenicichla</i> sp3	Rio das Mortes, São Felix do Araguaia MT	Bacia do Tocantins (5)
<i>Crenicichla</i> sp4	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT	Bacia do Tocantins (5)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Cach. Vêu da Noiva, Botucatu, SP Córrego Capivarinha, Botucatu, SP Córrego Carrapato, Penápolis, SP Córrego Jacutinga, Bofete, SP Córrego Tamanduá, Itatinga, SP Córrego Araquá, Botucatu, SP Lago Ness, Botucatu, SP Rio Bonito, Barra Bonita, SP Rio Paraetinga, Salesópolis, SP Tq pis “desafio jovem”, Botucatu, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Córrego Cavallo, Jaraguá do Sul, SC	Bacia do Atlantico Sul (3)
<i>Geophagus surinamensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela	Bacia do Orinoco (6)
<i>Geophagus surinamensis</i>	Rio Santa Bárbara, Buritama, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Pterophyllum leopoldi</i>	Petshop, Botucatu/SP.	
<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Tietê, Barra Bonita, SP	Bacia do Paraná (1)
<i>Symphysodon</i>	Petshop, Botucatu/SP	
<i>aequifaciatu</i>		
<i>Retroculus lapidifer</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, Mt	Bacia do Tocantins (5)



Figura 3 – Espécies analisadas: a) *Retroculus lapidifer*; b) *Cichla ocellaris*; c) *C. orinocensis*; d) *C. temensis*; e) *Crenicichla vitatta*; f) *C. sp1*; g) *Astronotus ocellatus*; h) *Apistogramma borelli*; i) *Biotodoma cupido*; j) *Geophagus brasiliensis*; k) *G. surinamensis*; l) *Satanoperca jurupari*; m) *Acaronia nasa*; n) *Cichlasoma facetum*; o) *Symphysodon aequifaciatus*; p) *Pterophyllum leopoldi*; q) *Mesonauta festivus*; r) *Heros efaciatus*; s) *Aequidens plagiozonatus*; t) *Cichlasoma paranaense*.

3.1.2. Métodos

Uma vez que para obtenção de cromossomos necessita-se de células em divisão, o primeiro passo em um estudo citogenético é observar locais (tecidos e órgãos) no organismo onde atividades de divisão celular estejam ocorrendo, quer de forma natural, quer sobre determinados estímulos. A cultura de linfócitos e a utilização de medula óssea são metodologias que melhores resultados oferecem em estudos citogenéticos da maioria dos vertebrados. Em peixes, o tecido hematopoiético é encontrado nos rins e este órgão mostrou-se como excelente fonte para obtenção de células mitóticas.

Das técnicas desenvolvidas, foi padronizada rotineiramente no laboratório uma metodologia que tem trazido bons resultados. Se o animal chegar da coleta com hematomas ou descamação devido ao manejo durante a coleta, somado ao próprio estresse, este poderá ser processado após 24 horas com possibilidade de sucesso na obtenção de cromossomos metafásicos. Entretanto, via de regra, é seguida uma rotina laboratorial com os seguintes protocolos:

3.1.3. Indução do aumento da taxa de divisão celular

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada a técnica descrita por Oliveira *et al.* (1988), que consiste inicialmente em preparar uma solução de fermento biológico (0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada) e incubá-la por cerca de 20min a 37° C. Após este tempo, a solução foi injetada na proporção de 1ml /100g do peso do animal, na região dorso-lateral do corpo. Os animais foram mantidos em aquário aerado por 48 horas a uma temperatura mínima de 25 °C e posteriormente sacrificados.

3.1.4. Técnica Direta de Preparação de Cromossomos Mitóticos

A análise citogenética foi realizada em células extraídas do rim, seguindo a metodologia descrita por Foresti *et al.* (1993), que consiste em:

1. Injetar colchicina (0,025%) na proporção de 0,5ml para cada 100g de peso do animal e deixá-lo em aquário por 50min;
2. Sacrificar o animal retirando a porção do rim que se situa na região anterior e posterior do animal;
3. Colocar o tecido retirado em uma placa de Petri contendo 7ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M).
4. Dissociar o material com pinças de pontas finas e depois homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur ou seringa hipodérmica de vidro;

5. Colocar a suspensão um tubo de centrífuga, deixando-o no interior de estufa a 37°C por 21min;
6. Adicionar 5 gotas de fixador recém preparado e deixá-lo em descanso por 5 min;
7. O material é então fixado com a adição de 7ml de Carnoy (metanol gelado/ácido acético - 3:1) e homogeneizado com pipeta Pasteur e levado à centrífuga (900 a 1000rpm) por 10min.
8. O sobrenadante é retirado com auxílio de pipeta Pasteur e o material celular é ressuspenso com 7 ml de fixador Carnoy e levado à centrífuga por 7 min. (repetir mais duas vezes);
9. Retirar o sobrenadante e adicionar 1 a 2ml de fixador Carnoy, dependendo da quantidade de sedimento e ressuspende bem o material;
10. Pingar 1 a 2 gotas da suspensão, com pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa e seca, colocada sobre a bancada do laboratório;
11. Deixar em repouso secando naturalmente ao ar;
12. Corar com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato, pH 6,8, por 7 minutos e lavar com água destilada ou água corrente se esta estiver no pH 7,0. Deixar em repouso secando naturalmente ao ar.

3.1.5. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

1. A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos foi feita conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980), como segue:
2. Colocar sobre a lâmina duas gotas de solução de gelatina e quatro gotas da solução aquosa de Nitrato de Prata a 50% e cobrir com lamínula.
3. Levar a lâmina ao banho-maria a 60 °C onde será apoiada em suporte para que não misture com a água do banho-maria.
4. Deixar o tempo necessário para que a lâmina adquira uma coloração marrom-dourada (aproximadamente 2 min.);
5. Retirar do banho-maria e remover a lamínula, levando a lâmina em água corrente para que a lamínula deslize naturalmente;
6. Adicionar corante Giemsa a 1% por alguns segundos.

3.1.6. Detecção da Heterocromatina Constitutiva

Para observação da distribuição da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica originalmente descrita por Sumner (1972), com modificações;

1. Tratar a lâmina com HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 30 minutos e deixar secar;

2. Incubar em solução filtrada recém preparada de Hidróxido de Bário [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] 5% a 60 °C de 5 a 10 segundos.
3. Enxaguar em HCl 1,0N a 60 °C, passar em água corrente e deixar secar;
4. Incubar em uma solução de 2xSSC, à 60 °C por 30 minutos.
5. Lavar em água corrente e secar ao ar;
6. Corar com Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) a 2% por 15 minutos;
7. Lavar em água corrente e secar ao ar.

3.1.7. Estudos cariotípicos

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscopia de luz, e as melhores metáfases foram selecionadas para registro fotográfico utilizando o microscópio óptico (aumento de 1000x). As melhores metáfases, isto é, aquelas que apresentaram boa dispersão e morfologia nítida dos cromossomos, foram fotografadas em filme Kodak/Agfa preto e branco e ASA 25.

Inicialmente as fotos foram ampliadas com papel fotográfico de dimensões 9x6cm e ajustadas tendo como correspondência 1cm = 10 μ ou 12x9cm e ajustadas para 1,5cm = 10 μ . Depois, estas foram escaneadas com Scanner Genius e resolução de 600pixels para as ampliações de 9x6 e 400pixels para as de tamanho 12x9. De posse dessas imagens, utilizou-se o micro-computador para recortar e montar os cariótipos.

As últimas análises foram processadas com Foto-microscópio marca “Olympus” mod. BX61 e *Software* “Image-Pro MC 6.0” e as imagens foram capturadas em resolução máxima de 4080x3072 (pixel shift 9).

Com auxílio do software comercial “Adobe Photoshop 7.0.1”, os cariótipos foram montados obedecendo à ordem decrescente de tamanho dos cromossomos, assim como a morfologia em relação à posição do centrômero.

Com a mesma ferramenta, foram medidos os braços curto e longo, obedecendo a relação de braços (RB).

$$\text{RB} = \text{L}/\text{C} , \text{ onde: L} = \text{braço longo e C} = \text{braço curto}$$

A identificação cromossômica foi feita seguindo a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964) e revisado por Guerra (1986), assim sendo, os tipos cromossômicos são:

Metacêntrico (m)	RB = 1,00 – 1,70
Sub-metacêntrico (sm)	RB = 1,71 – 3,00
Sub-telocêntrico (st)	RB = 3,01 – 7,00
Acrocêntrico (a)	RB = > 7,01

Para a obtenção do número fundamental (NF) contou-se o número de braços dos tipos cromossômicos, sendo considerado com portadores de 2 braços do tipo 'm', 'sm' e 'st' embora os padrões cromossômicos tenham sido separados em 'm-sm' e 'st-a' também em ordem decrescente.

4. RESULTADOS

As análises citogenéticas realizadas em diferentes espécies da família Cichlidae são apresentados abaixo de acordo com a divisão das espécies em subfamílias. Os dados obtidos encontram-se resumidos na tabela 2.

4.1. Retroculinae

Análises cariotípicas foram realizadas na espécie *Retroculus lapidifer*, único representante desta família, que foi coletado no Rio Araguaia, bacia do Tocantins. Esta espécie apresentou número diplóide de 48 cromossomos sendo 6sm+42st-a. Considerando os pares 1 a 12 com dois braços e os demais pares (13 a 24) com um único braço, o número fundamental (NF) encontrado foi igual a 72 (Figura 4a).

4.2. Cichlinae

Dois gêneros foram analisados para este grupo: *Cichla* e *Crenicichla* pertencentes às tribos Cichlini e Crenicichlini, respectivamente. Em *Cichla ocellaris*, *C. orinocensis* e *C. temensis*, o cariótipo encontrado foi de $2n=48$ cromossomos. A formação cariotípica consiste basicamente de 48 cromossomos st-a em escala decrescente de tamanho (Figuras 4b), com NF=48. A RON localiza-se na região telomérica de um dos maiores pares para todas as espécies analisadas (Figura 5a). Em relação ao bandamento C, a localização da heterocromatina mostra-se fracamente corada e presente principalmente na região pericentromérica (Figura 6a).

No gênero *Crenicichla* foi encontrado $2n=48$ cromossomos com os cariótipos constituídos por 6m-sm+42st-a. Nas espécies *C. vitatta*, *C. lacustris*, *C. sp1* e *C. sp3*, o primeiro par cromossômico apresentou, no seu braço curto, constrição secundária intersticial (Figura 4c) que se mostra Ag-RON⁺ quando tratada com nitrato de Prata (Figura 5). Na espécie *Crenicichla* sp2 proveniente do rio Araguaia (Bacia do Tocantins-Araguaia) e *C. sp4* coletada no córrego Olaria (Bacia do Tietê) não se observa a constrição secundária no primeiro par m-sm a qual é observada no braço longo do primeiro par st-a (Figura 4d). Estas mesmas regiões mostraram blocos heterocromáticos bastante evidentes quando preparadas para análise de banda C (Figura 6).

4.3. Astronotinae

Foram realizadas análises em uma única espécie, *Astronotus ocellatus*, representante de Astronotinae, que apresentou número diplóide de 48 cromossomos sendo dois pares m-sm

e os outros 22 pares st-a (4m-sm+44st-a). No primeiro par, é evidenciada constrição secundária em região intersticial do braço curto em coincidência com a RON (Figura 4g e 5d) e a heterocromatina constitutiva está presente na região centromérica da maioria dos cromossomos e também em coincidência à RON (Figura 6d).

4.4. Geophaginae

Foram analisados os cariótipos de cinco espécies representantes da família Geophaginae pertencentes à Tribo Geophagini: *Apistograma borellii*, *Biotodoma cupido*, *Geophagus brasiliensis*, *G. surinamensis* e *Satanoperca jurupari*. Com exceção de *Apistograma borellii* que apresentou $2n=46$, todas as demais espécies apresentam $2n=48$ cromossomos e NF variável.

Foram analisados 6 indivíduos (2 machos e 4 fêmeas) para *Apistograma borellii*. O número diplóide encontrado foi de 46 cromossomos em ambos os sexos com a fórmula cariotípica de 16m-sm+30st-a que vão diminuindo proporcionalmente. O número fundamental encontrado foi 84 (Figura 4h). As regiões heterocromáticas foram evidenciadas nos centrômeros (Figura 6e).

As análises de *Biotodoma cupido* (3 machos e 3 fêmeas) mostraram cariótipo com $2n=48$ cromossomos, sendo 4m-sm+44st-a. O par m-sm de maior tamanho (par nº 1 do cariótipo) possui constrição secundária intersticial evidente (Figura 4i), coincidente com um bloco heterocromático (Figura 6f).

As análises de *Geophagus brasiliensis* (15 machos e 5 fêmeas) caracterizaram o cariótipo como 2m-sm+46st-a sendo a maioria composta por dois braços. O número fundamental encontrado foi NF=62 (considerando dois braços para os pares 1, 2, 4, 13, 18, 22 e 24) (Figura 4j). A RON pôde ser verificada no par cromossômico st-a nº 4 em coincidência com a região da constrição secundária, sendo evidenciado heteromorfismo dessa região entre os homólogos. Associação entre os cromossomos portadores da RON foi observada com frequência (Figura 5e). A heterocromatina constitutiva mostrou-se distribuída, principalmente, nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos (Figura 6g).

Para *Geophagus surinamensis* (2 machos e 3 fêmeas) o número diplóide encontrado foi 48 cromossomos sendo 4m-sm+44st-a com NF=56. O primeiro par foi nitidamente caracterizado ser metacêntrico enquanto que o segundo par foi caracterizado por possuir constrição secundária no braço curto (figura 4l). A região organizadora de nucléolo foi localizada junto à essas constrições (Figura 5). Todos os demais pares foram caracterizados como st-a que vão decrescendo com alternância entre sub-telocêntricos e acrocêntricos. A

heterocromatina constitutiva mostrou-se distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos e também foram evidenciadas no braço longo do primeiro par st-a próximo ao centrômero (Figura 6h).

A espécie *Satanoperca jurupari* (10 machos e 11 fêmeas) apresentou número diplóide com 48 cromossomos, sendo 4m-sm+44st-a. O número fundamental encontrado (considerando os pares 1 e 2 com dois braços) foi 52 (Figura 4i). A RON foi observada no braço curto do primeiro par m-sm (Figura 5f). Heterocromatinas foram observadas na região próxima ao centrômero do braço longo do primeiro par st-a e em posição centromérica nos demais cromossomos (Figura 6i).

Satanoperca pappaterra (1 macho) apresentou número diplóide de 48 cromossomos, sendo 4m-sm+44st-a e número fundamental de 52.

4.5. Cichlasomatinae

4.5.1. Tribo Acaroni

Espécimes de *Acaronia nasa* apresentaram número diplóide igual a 48 cromossomos distribuídos em 6m-sm+42st-a. O primeiro par do grupo m-sm possui constrição secundária bem evidente em região intersticial do braço curto. Considerando os pares 1, 2, 3, 4, 14, 15 e 18 como sendo de dois braços, o número fundamental encontrado foi de 62 (Figura 4m). A heterocromatina constitutiva foi observada junto à constrição secundária do primeiro par meta-submetacêntrico e junto ao centrômero dos demais cromossomos (Figura 6j).

4.5.2. Tribo Heroini

Todos os indivíduos analisados para *Australoheros facetum* (2 machos e 3 fêmeas) apresentaram número diplóide igual a 48 cromossomos, sendo 6m-sm+42st-a. Considerando os pares cromossômicos nº 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 13, 15 e 20 com dois braços, o número fundamental encontrado foi 68 (Figura 4n).

Foram analisados três indivíduos da espécie *Symphysodon aequifaciatus* que apresentaram $2n=60$ cromossomos que, com exceção do par nº 23 st-a e de sete pares de micro-cromossomos, todos se mostraram m-sm. O número fundamental encontrado foi de 106 (considerando o par 23 mais os sete pares de micro-cromossomos como sendo possuidores de um braço (Figura 4l)). Heterocromatinas mostraram-se evidentes na região centromérica da maioria dos cromossomos, exceto nos microcromossomos (Figura 6k).

Análises cariotípicas realizadas na espécie *Heros efasciatus* (5 machos e 2 fêmeas) apresentaram número modal igual a 48 cromossomos, sendo 12m-sm+36st-a e número

fundamental 78, considerados de dois braços os pares 1 a 15 e os demais com braço único. Em metáfases cujos cromossomos apresentavam-se mais descondensados foi possível observar constrição secundária no primeiro par m-sm coincidentes com a RON (Figuras 4p e 5h). Heterocromatinas mostraram-se evidentes na região centromérica da maioria dos cromossomos (Figura 6l).

Os indivíduos analisados para *Mesonauta festivus* apresentaram número diplóide de 48 cromossomos compostos por 12m-sm+36st-a. O número fundamental encontrado foi 62 e foram considerados cromossomos de dois braços os pares 1 a 7 e os demais com um único braço (Figura 4q). No braço longo do primeiro par st-a (representado pelo par nº 7), próximo ao centrômero, foram identificados blocos heterocromáticos (Figura 6m).

Para a espécie *Pterophyllum leopoldi* foram analisados quatro indivíduos fêmeas que apresentaram $2n=48$ cromossomos com composição cariotípica 20m-sm+28st-a e número fundamental igual a 96 (Figura 4p). Heteromorfismo de constrição secundária foi evidenciado no braço menor do par cromossômico nº 1. Foram identificados blocos de heterocromatina na região pericentromérica da maioria dos cromossomos do complemento (Figura 6n).

Foram analisados 13 indivíduos de *Aequidens plagiozonatus* (3 machos e 10 fêmeas) que apresentaram cariótipos com 48 cromossomos e fórmula cariotípica 10m,sm+38st,a e $NF=68$ (Figura 4p). Em relação à RON, esta foi evidenciada na região dos telômeros do primeiro par m-sm (Figura 5i). Blocos heterocromáticos foram evidenciados na região pericentromérica de todos os cromossomos (Figura 6o).

Análise cariotípica realizada na espécie *Aequidens tetramerus* revelou a presença de 48 cromossomos, fórmula cariotípica 8m-sm+40st-a e número fundamental 62. Bandas heterocromáticas ficaram visíveis na região centromérica da maioria dos cromossomos (Figura 6p).

Para *Cichlasoma paranaense*, foram analisados 16 indivíduos (3 machos e 13 fêmeas) e o número diplóide encontrado foi de 48 cromossomos, distribuídos da seguinte forma: 6m-sm+42st-a. O número fundamental encontrado (considerando os pares 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 19 e 20 como sendo de dois braços) foi de 74. Constrições secundárias foram observadas em um par cromossômico st-a de maior tamanho (representado pelo par 4) (Figura 4q). Através de impregnação pela prata, o par cromossômico 4 apresentou regiões Ag-RON positivas coincidentes às constrições secundárias (Figura 5j). A aplicação do bandamento C evidenciou a presença de heterocromatina na região pericentromérica da maioria dos cromossomos do complemento e evidenciado no primeiro par st-a, na região subtlocêntrica (Fig. 6q).

Tabela 2: Caracterização cromossômica das espécies analisadas.

Espécies	Origem	Subfamília	Número de espécimes analisados	Fórmula cariotípica	Número fundamental	Número cromossômico
<i>Retroculus lapidifer</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil	Retroculinae	01	6sm+42st,a	72	48
<i>Cichla ocellaris</i>	Rio Tietê, Bariri/SP, Brasil.	Cichlinae	05	48st,a	48	48
<i>Cichla orinocensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela.	Cichlinae	01	48st,a	48	48
<i>Cichla temensis</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil	Cichlinae		48st,a	48	48
<i>Crenicichla lacustris</i>	Corrego Faú, Miracatu/SP, Brasil	Cichlinae		6m,sm+42st,a	58	48
<i>Crenicichla vitatta</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana/MS, Brasil.	Cichlinae	06	6m,sm+42st,a	54	48
	Córrego Campo Novo, Bauru/SP, Brasil.					
<i>Crenicichla</i> sp1.	Córrego Carrapato, Penápolis/SP, Brasil.	Cichlinae	17	6m,sm+42st,a	54	48
<i>Crenicichla</i> sp2.	Córrego Olaria, Poloni/SP, Brasil.	Cichlinae	12	6m,sm+42st,a	54	48
<i>Crenicichla</i> sp3	Rio das Mortes, Sao Felix do Araguaia/MT, Brasil	Cichlinae	02	6m,sm+42st,a	54	48
<i>Crenicichla</i> sp4.	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil	Cichlinae				
<i>Astronotus ocellatus</i>	Lagoa Cano Furada, Maringá/PR, Brasil.	Astronotinae	06	14m,sm+34st,a	86	48
	Rio Tietê, Barra Bonita/SP, Brasil.					
<i>Apistogramma borellii</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana/MS, Brasil.	Geophaginae	05	16m,sm+30st,a	84	46
<i>Biotodoma cupido</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil.	Geophaginae	05	4m,sm+44st,a	54	48
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Cachoeira Vêu da Noiva, Botucatu/SP, Brasil. Córrego Capivarinha, Botucatu/SP, Brasil. Córrego Carrapato, Penápolis/SP, Brasil. Córrego Cavallo, Jaraguá do Sul/SC, Brasil. Córrego Jacutinga, Bofete/SP, Brasil. Córrego Tamanduá, Itatinga/SP, Brasil. Córrego Araquá, Botucatu/SP, Brasil. Lago Ness, Botucatu/SP, Brasil. Rio Bonito, Barra Bonita/SP, Brasil. Rio Paraetinga, Salesópolis/SP, Brasil. Tanque de piscicultura “desafio jovem”, Botucatu/SP, Brasil.	Geophaginae	71	2m,sm+46st,a	62	48

<i>Geophagus surinamensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela Rio Santa Bárbara, Nova Avandava/SP, Brasil.	Geophaginae	05	4m, sm+44st, a	52	48
<i>Satanoperca pappaterra</i>	Rio Tietê, Barra Bonita/SP, Brasil.	Geophaginae	01	4m, sm+44st, a	52	48
<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio das Mortes, Sao Felix do Araguaia/MT, Brasil	Geophaginae	21	4m, sm+44st, a	52	48
<i>Acaronia nasa</i>	Rio das Mortes, Sao Felix do Araguaia/MT, Brasil	Cichlasomatinae	02	6m, sm+42st, a	62	48
<i>Australoheros facetum</i>	Córrego Campo Limpo, Bauru/SP, Brasil.	Cichlasomatinae	05	6m, sm+42st, a	68	48
<i>Syphsodon aequifasciatus</i>	Petshop, Botucatu/SP, Brasil.	Cichlasomatinae	03	42m, sm+4st, a+14micr	106	60
<i>Heros efasciatus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil. Rio das Mortes, São Félix do Araguaia/MT, Brasil	Cichlasomatinae	05 02	12m, sm+36st, a	78	48
<i>Mesonauta festivus</i>	Rio das Mortes, Sao Felix do Araguaia/MT, Brasil	Cichlasomatinae	06	12m, sm+36st, a	62	48
<i>Pterophyllum leopoldi</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil. Petshop, Botucatu/SP, Brasil.	Cichlasomatinae	03	18m, sm+30st, a	96	48
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana/MS, Brasil Lagoa Branca, Cáceres/MT, Brasil.	Cichlasomatinae	52	10m, sm+38st, a	72	
<i>Aequidens tetramerus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças/MT, Brasil Rio das Mortes, São Félix do Araguaia/MT, Brasil	Cichlasomatinae	29	8m, sm+40st, a	70	48
<i>Cichlasoma paranaense</i>	Córrego Campo Novo, Bauru/SP, Brasil. Córrego Carrapato, Penápolis/SP, Brasil. Córrego Batata, Miracatu/SP, Brasil. Córrego Faú, Miracatu/SP, Brasil. Córrego Olaria, Ponomi/SP, Brasil.	Cichlasomatinae	16	6m, sm+42st, a	74	48

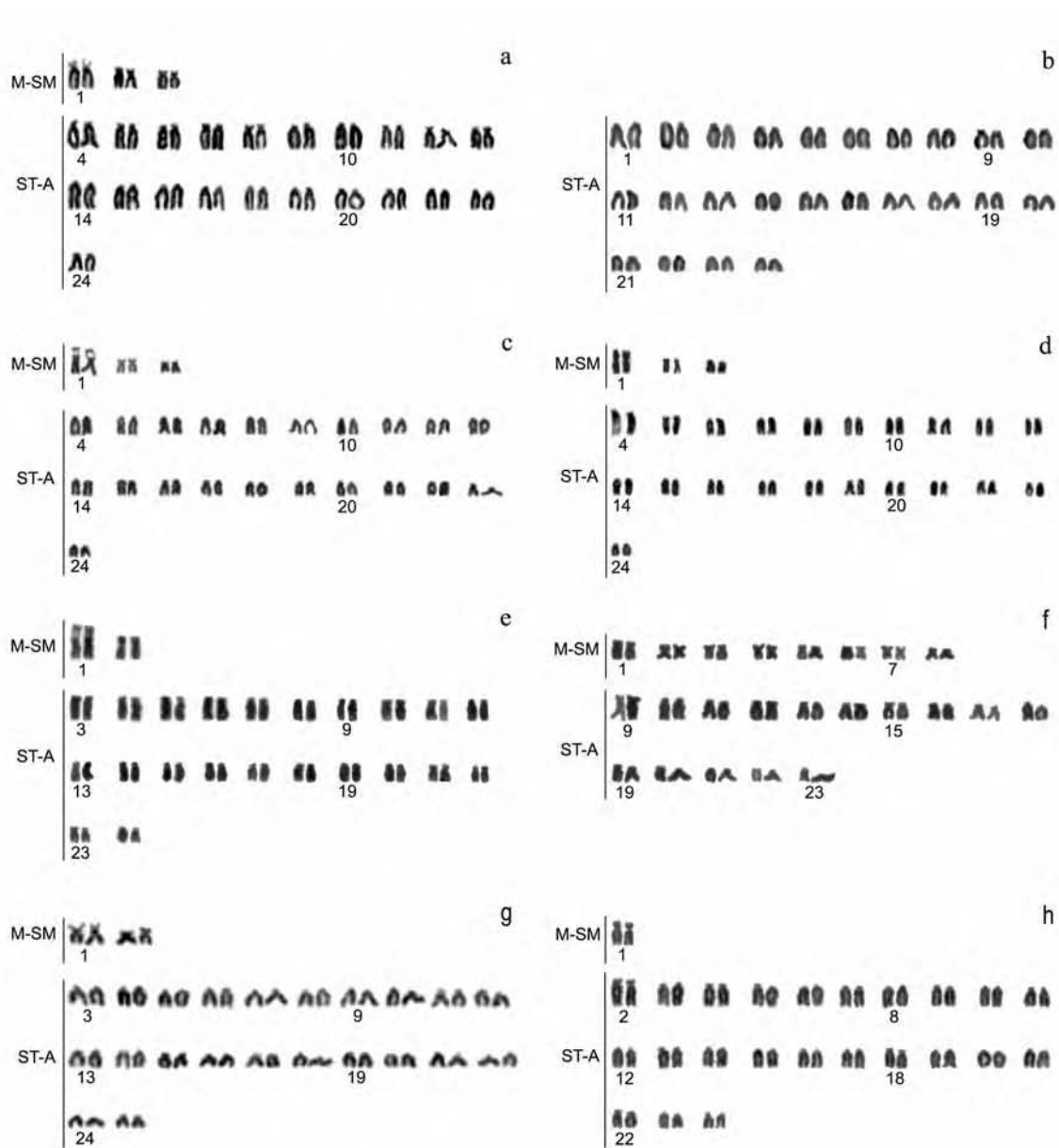


Figura 4 - Cariótipos das espécies de ciclídeos analisados: a) *Retroculus lapidifer*; b) *Cichla temensis*; c) *Crenicichla lacustri*; d) *C. sp2*; e) *Astronotus ocellatus*; f) *Apistograma borelli*; g) *Biotodoma cupido*; h) *Geophagus brasiliensis*; i) *G. surinamensis*; j) *Satanoperca jurupari*; k) *Acaronia nasa*; l) *Australoheros facetum*; m) *Symphysodon aequifaciatus*; n) *Heros efasciatus*; o) *Mesonauta festivus*; p) *Pterophyllum leopoldi*; q) *Aequidens plagiozonatus*; r) *Cichlasoma paranaense*.

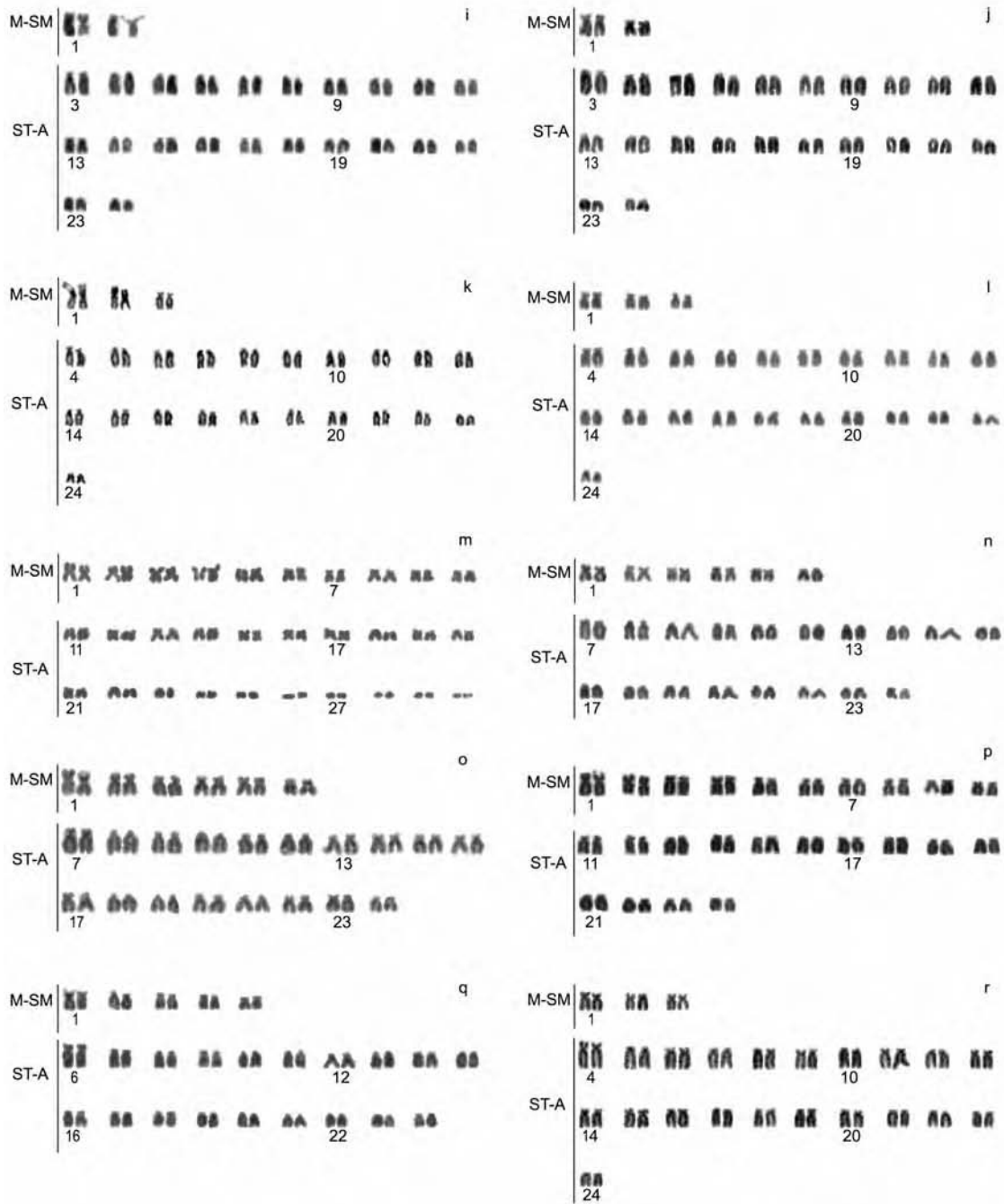


Figura 4 - Continuação.

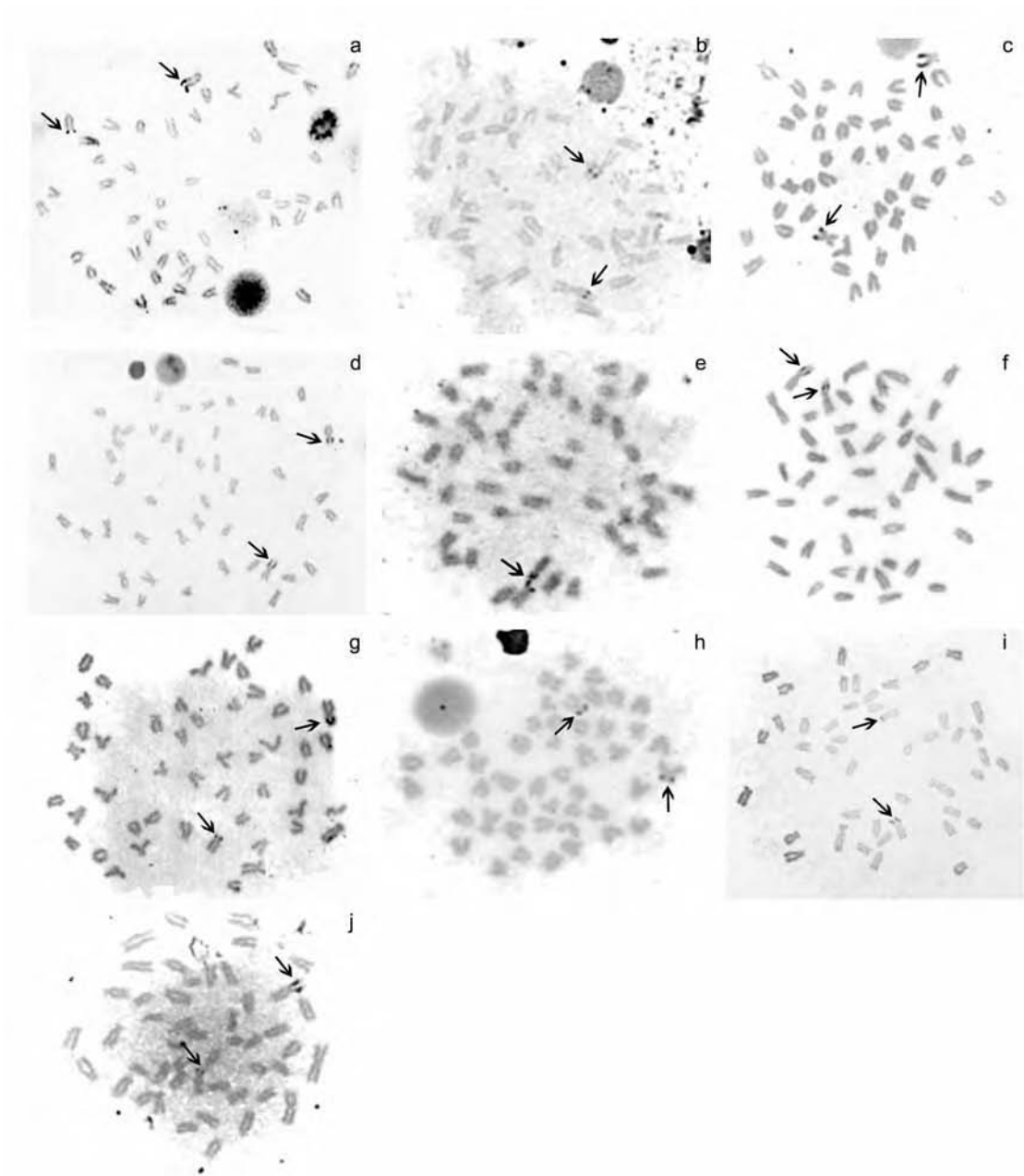


Figura 5 – Metáfases coradas pelo Nitrato de Prata evidenciando par cromossômico portador das RONS: a) *Cichla orinocensis*; b) *Crenicichla vitatta*; c) *C. sp2*; d) *Astronotus ocellatus*; e) *Geophagus brasiliensis*; f) *G. surinamensis*; g) *Cichlasoma paranaense*; h) *Heros efasciatus*; i) *Aequidens plagiozonatus* ; j) *Satanoperca jurupari*. As setas apontam a localização da RON das diferentes espécies.

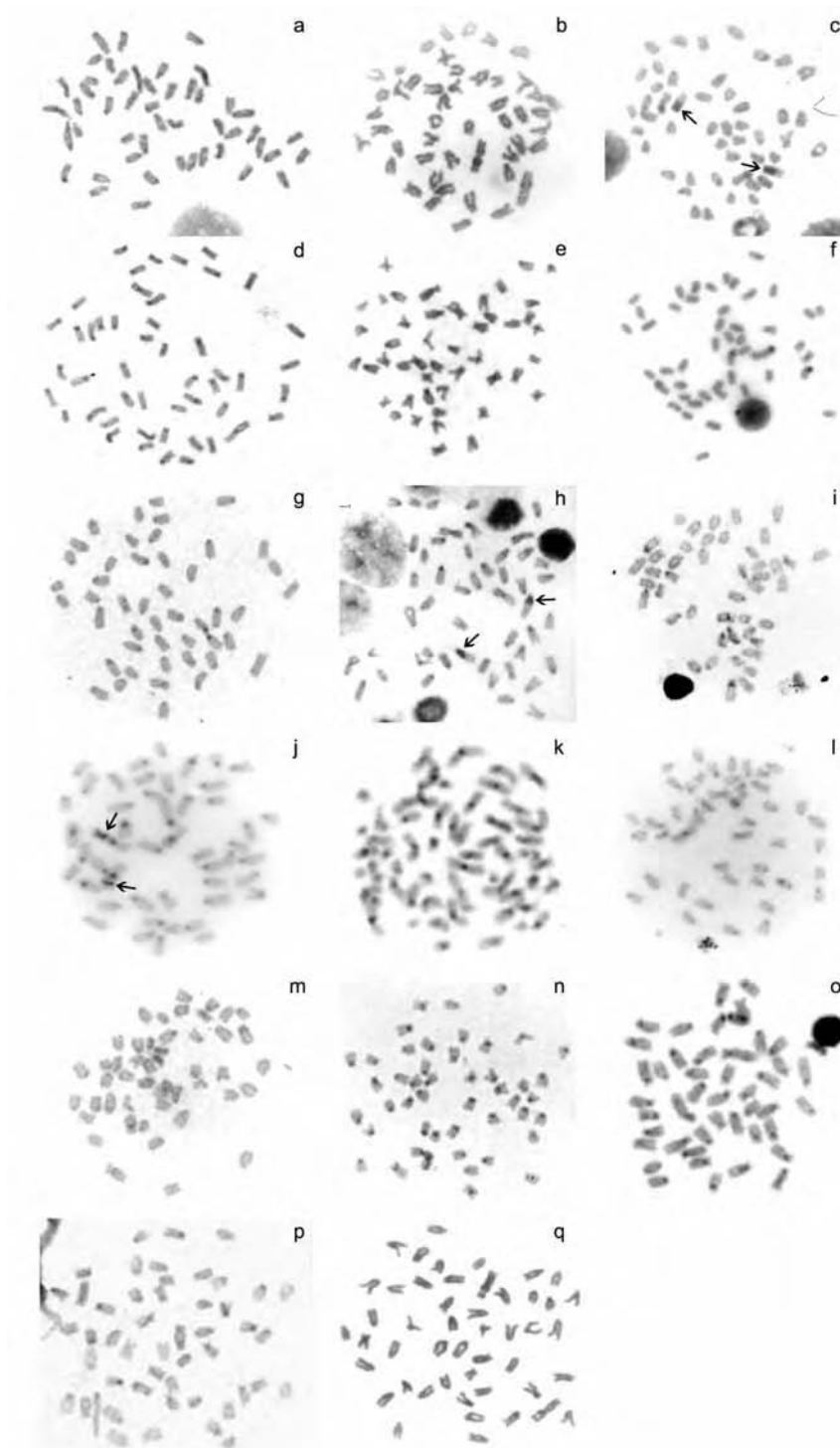


Figura 6 – Cromossomos metafásicos de espécies de ciclídeos submetidas ao bandamento C. a) *Cichla temensis*; b) *Crenicichla vitatta*; c) *Crenicichla* sp2; d) *Astronotus ocellatus*; e) *Apistogramma borelli*; f) *Biotodoma cupido*; g) *Geophagus brasiliensis*; h) *G. surinamensis*; i) *Satanoperca jurupari*; j) *Acaronia nasa*; k) *Symphysodon aequifaciatus*; l) *Heros efasciatus*; m) *Mesonauta festivus*; n) *Pterophyllum leopoldi*; o) *Aequidens plagiozonatus*; p) *A. tetramerus*; q) *Cichlasoma paranaense*. As setas indicam os blocos de heterocromatina citados no texto.

5. DISCUSSÃO.

5.1 Comparações cariotípicas entre as espécies de ciclídeos

Os estudos citogenéticos realizados em Teleostei têm demonstrado uma quantidade diversa de números cromossômicos, variando de 14 até 140, havendo no entanto uma frequência em torno de $2n=48$, sem a presença de microcromossomos no complemento cariotípico padrão. Os cariótipos de teleósteos apresentam também uma imensa variedade de fórmulas cromossômicas com diferentes quantidades de metacêntricos, submetacêntricos, subteloacêntricos e acrocêntricos (Brum, 1995).

Análises comparativas realizadas com citogenética apontam ser muito conservativo o número diplóide dos Perciformes, sendo que o grupo parece manter em alta frequência o cariótipo tido como ancestral de $2n=48$ cromossomos, sendo todos acrocêntricos (NF=48) (Brum, 1995). No presente estudo, foi verificado que todas as espécies do gênero *Cichla* apresentaram $2n=48$ cromossomos e NF=48, evidenciando um cariótipo mais próximo do padrão basal para os Perciformes. Coincidentemente, este gênero apresenta diversas características morfológicas (Stiassny, 1991) e genéticas (Farias *et al.*, 2000) que o colocam entre os grupos basais da filogenia dos ciclídeos neotropicais.

Por outro lado, as espécies de *Crenicichla* analisadas mostraram que neste gênero parece ter ocorrido mais mudanças cariotípicas, principalmente em relação a morfologia dos cromossomos, quando comparadas com as espécies de *Cichla*. As espécies *Crenicichla vitatta*, *C. lacustris*, *C. sp1* e *C. sp3* apresentaram cariótipos compostos por cromossomos meta-submetacêntricos e subte-acrocêntricos, mostrando um padrão cromossômico divergente em relação aos Cichlinae do gênero *Cichla*.

Do grupo considerado mais basal desta família, foi analisado apenas um exemplar de *Retroculus lapidifer* do Rio Araguaia, bacia do Tocantins. Esta espécie, segundo Gosse (1971), é superficialmente similar a *Geophagus*, mas sem a expansão anteroventral no primeiro arco branquial e tem sido normalmente associado ao grupo Geophaginae. Kullander (1998) separou *Retroculus* dessa subfamília formando outro grupo denominado Retroculinae. Essa proposta foi mais tarde confirmada por Farias *et al.* (2000) com estudos em DNA mitocondrial e nuclear, concluindo que este grupo representa a posição mais basal ente os ciclídeos neotropicais. Do ponto de vista citogenético não há diferenças na macroestrutura cariotípica em relação a outros grupos como espécies da subfamília Geophaginae. Os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho mostram que as espécies *Cichlasoma paranaense*,

Acaronia nasa, *Australoheros fascetum* (subfamília Geophaginae) e *Retroculus lapidifer* possuem o mesmo número cromossômico ($2n=48$) e fórmula cariotípica bastante similar ($6m-sm+42st-a$).

Da subfamília Geophaginae foram coletados espécimes de quatro gêneros pertencentes à tribo Geophagini: Entre as espécies analisadas, apenas *Apistograma borelli* possui $2n=46$ cromossomos ($16m-sm+30st-a$). As outras espécies analisadas dessa subfamília apresentaram $2n=48$, com pequenas variações em relação a fórmula cariotípica. *Geophagus brasiliensis* apresentou número fundamental igual a 62 com o cariótipo composto por $2m-sm+46st-a$. Análises cariotípicas realizadas nesta mesma espécie por Feldberg (1985) em indivíduos coletados na localidade de Brotas, S. Carlos, Registro e Pirassununga (SP) foram similares aos resultados no presente trabalho. Porém Thompson (1979) encontrou diferenças cariotípicas para esta espécie relacionadas ao número fundamental (NF=52) e fórmula cariotípica ($4sm+44st-a$). Estudos realizados por Brum *et al.* (1998), Couto *et al.* (1998) e Martins (1995) também demonstram diferenças na fórmula cariotípica desta espécie (NF=56 e $8sm+40st-a$). Segundo Loureiro (2000), todas essas diferenças encontradas para *Geophagus brailiensis* não podem ser devidas apenas a problemas técnicos, podendo estar relacionadas a mecanismos de alteração cromossômica, levando a ampla variação cariotípica detectada.

Para os indivíduos de *Geophagus surinamensis* analisados no presente trabalho, apesar de pertencerem a diferentes bacias (Bacia do Orinoco - Venezuela e Rio Tietê – Brasil), não foram observadas modificações ou alterações morfológicas em seus cariótipos. Feldberg & Bertollo (1985) e Thompson (1979) analisando espécimes coletados em regiões distintas também encontraram os mesmos resultados. As análises cromossômicas mostraram uma estrutura cariotípica muito semelhante entre *G. Surinamensis* e os Geophaginae *Satanoperca pappaterra* e *S. jurupari*.

Foram analisados cinco exemplares de *Biotodoma cupido* do Rio Araguaia (bacia do Tocantins) e o cariótipo apresenta morfologia típica para o grupo Geophagini com dois pares $m-sm$ sendo o maior par possuidor de constrição secundária. Vale ressaltar que estes dados para essa são inéditos para esta espécie.

Dentro da subfamília Astronotinae, foram feitas análises cariotípicas de *Astronotus ocellatus* e os resultados diferem dos apresentados por outros autores. Thompson, analisando espécimes encontrou $6m-sm+42st-a$ e Feldberg (1985) encontrou $12m-sm+36st-a$. Essas diferenças podem ter sido provenientes de dificuldades técnicas ou procedência dos espécimes. Neste trabalho, foi encontrado $4m-sm+44st-a$ sendo que um par é metacêntricos (par 2) e os demais não são diferentes dos observados pelos autores citados.

A subfamília Cichlasomatinae é um dos maiores grupos de Cichlidae com 33 gêneros e 210 espécies dos quais 24 gêneros estão relacionados na árvore filogenética proposta por Kullander (1986). Foram analisadas oito espécies englobando representantes das três tribos (Acaroni, Heroini e Cichlasomatini). Com exceção da espécie *Symphysodon aequifasciatus* com $2n=60$, todas as outras apresentaram um número diplóide igual a 48 cromossomos com diferentes fórmulas cariotípicas e um número fundamental variando de 62 a 106. Foram analisados três exemplares de *Symphysodon aequifasciatus* adquiridos em lojas de aquário. Apesar do pequeno tamanho dos cromossomos, o número diplóide está de acordo com os dados apresentados na literatura. No entanto, a disposição cariotípica encontrada não coincidiu com as análises feitas por outros autores (Ohno & Atkin, 1966; Scheel, 1973; Thompson, 1979; Salgado *et al.*, 1995, 1996b; Mesquita *et al.*, 2000). Torna-se importante ressaltar que nos trabalhos citados acima também foi verificado a presença de vários microcromossomos.

O aumento do número de cromossomos portadores de dois braços nos Perciformes indica um cariótipo mais derivado (Prirodina, 1994). O aumento do número de braços nos cromossomos pode ser o resultado de inversões pericêntricas indicando que rearranjos cromossômicos estiveram presentes durante a história evolutiva do grupo. Retroculinae e Cichlinae são considerados grupos basais para os ciclídeos sul americanos (Stiassny, 1991; Farias *et al.*, 2000) e apresentam cariótipos com um reduzido número de cromossomos de dois braços ou mesmo sua ausência, como observado no gênero *Cichla*. Além disso, a presença de um grande número de cromossomos subtelo-acrocêntricos nos diferentes grupos da família Cichlidae sugere um certo nível de manutenção da macroestrutura cariotípica durante a evolução do grupo. Por outro lado, a presença de cromossomos de dois braços nos diferentes grupos da família Cichlidae demonstram que mecanismos de rearranjos cromossômicos estiveram envolvidos durante a história evolutiva do grupo levando a diversificação das fórmulas cariotípicas observadas.

5.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo em espécies da Família Cichlidae

Outra metodologia empregada rotineiramente é a marcação com nitrato de prata (AgNO_3) das regiões organizadoras de nucléolos. Essas regiões são constituídas por múltiplas cópias de genes ribossomais, sendo, portanto sítios de transcrição do RNAr (RNA ribossomal). Estes sítios podem estar localizados em um par ou distribuídos em vários cromossomos do

complemento. Esta é uma ferramenta muito eficiente nos estudos complementares para caracterização de espécies, populações e em estudos evolutivos.

As RONS em peixes geralmente estão situadas em constrições secundárias nos cromossomos e são identificadas, de forma indireta, através da técnica de impregnação por sais de prata, pois o material marcado não é o DNAr, e sim proteínas ácidas presentes ao redor ou associadas aos genes ribossômicos, tais como a nucleolina associada à estrutura fibrilar do nucléolo e o pré-RNA nascente. Organismos nos quais existem apenas um par de cromossomos apresentando constrição secundária, geralmente é este sítio da região organizadora de nucléolo (Warburton & Henderson, 1979). De acordo com Miller *et al.* (1978), a impregnação das RONS por sais de prata se restringe àquelas regiões que estiveram ativas na intérfase precedente.

Estudos sobre as regiões organizadoras nucleolares têm revelado que sua localização é espécie-específica para vários grupos de peixes (Galetti *et al.*, 1984; 1991; Vênere & Galetti, 1989). As análises realizadas na família Cichlidae permitiram identificar a presença de RONS, em um único par cromossômico para todas as espécies, porém em posições distintas. Em algumas espécies, a RON apresentou localização próxima aos telômeros do braço curto (como observado em *Geophagus brasiliensis*, *Heros efasciatus*, *Aequidens plagiozonatus* e *Cichlasoma paranaensis*) e braço longo (como observado em *Cichla orinocensis* e *Crenicichla* sp2), e em posições intersticiais no braço curto de cromossomos m-sm (como observado em *Crenicichla vitatta*, *Astronotus ocellatus*, *G. Surinamensis*, *Satanoperca jurupari*). Torna-se importante salientar que em algumas espécies a RON apresentou heteromorfismo em relação ao tamanho da região entre os cromossomos homólogos (Figura 5c e d), o que pode estar relacionado com o grau de condensação ou com variações no número de cópias das repetições do DNAr presentes nestas regiões.

5.3 Distribuição da heterocromatina constitutiva em espécies da Família Cichlidae

Uma metodologia muito informativa e, portanto, muito empregada atualmente na citogenética de peixes é o bandamento C. Este método mostra-se muito eficiente nos estudos sobre estrutura, função e origem das heterocromatinas nos diferentes organismos.

O termo heterocromatina é utilizado, atualmente, em citogenética e biologia celular para designar a cromatina de regiões específicas dos cromossomos que permanecem condensados durante a intérfase (Sumner, 1990). Devido a esta propriedade (nível de condensação), a

heterocromatina apresenta um padrão de colorabilidade que permite distinguí-la da cromatina não compacta (eucromatina) durante um mesmo período do ciclo celular. Alguma quantidade de heterocromatina sempre é encontrada em alguns ou todos os cromossomos de um eucarioto. Suas propriedades de coloração variam enormemente entre as espécies e dentro de uma mesma espécie, mostrando-se, dessa forma, importante nos estudos sobre a natureza do DNA, identificação de polimorfismos, caracterização de espécies, populações e em estudos evolutivos (Sumner, op. cit.).

Devido ao aspecto de que regiões heterocromáticas permanecem condensadas durante o ciclo celular e que estudos moleculares mostraram ser estas regiões compostas por DNA altamente repetitivo, a heterocromatina tem sido descrita como sítios de genes inativos. No entanto, nem todas as regiões de DNA não transcrito e de genes inativos encontram-se como heterocromatina e não necessariamente a heterocromatina não possui atividade transcricional. A heterocromatina nos cromossomos ocorre em grandes blocos ou segmentos e estes podem estar intercalados por segmentos de eucromatina. Inversamente, quantidades pequenas de heterocromatina podem ocorrer na eucromatina (Pieczarka & Mattevi, 1998).

A heterocromatina responde diferencialmente a diversas técnicas empregadas na sua detecção. Muitos tipos diferentes de heterocromatina têm sido identificados em plantas e animais através de níveis variados de coloração após diferentes tratamentos (Rocchi, 1982). O estudo da heterocromatina, dessa forma, representa uma importante ferramenta através da qual se detecta alterações complexas na estrutura cariotípica.

Na maioria das espécies de ciclídeos analisadas foi verificada a presença de heterocromatina em regiões centroméricas. Entretanto, as espécies *Crenicichla* sp2 e *Geophagus surinamensis* apresentaram blocos heterocromáticos que ocupam grande região do braço longo próximo ao telômero e centrômero, respectivamente. Já em *Acaronia nasa* foi observada heterocromatina no centrômero e região intersticial do braço curto de apenas um par cromossômico.

Embora a maioria das espécies analisadas tenha apresentado 48 cromossomos com uma macroestrutura cariotípica bastante conservada, as variações nos números de cromossomos m-sm e st-a assim como a presença de 46 cromossomos em *Apistograma borelli*, indica que diversos tipos de rearranjos cromossômicos ocorreram durante a diversificação cariotípica do grupo. As análises de bandamento C mostram uma tendência de distribuição das heterocromatinas em torno do centrômero. Outras técnicas como hibridação cromossômica com sondas de DNAs repetitivos deverão esclarecer de forma mais detalhada os níveis de heterogeneidade nas heterocromatinas observadas.

Segundo Loureiro *et al.* (2000), apesar de, em alguns aspectos citogenéticos, a família Cichlidae apresentar certa conservação, principalmente no número diplóide, não podem ser desconsideradas as informações levantadas no presente trabalho sobre variações encontradas no cariótipos de espécies deste grupo. Sabendo que poucas espécies de ciclídeos apresentam algum tipo de dado citogenético (aproximadamente 10%), as informações são ainda restritas para que a família Cichlidae seja denominada de cromossomicamente conservada.

6. CONCLUSÃO

A presença de 48 cromossomos acrocêntricos na maioria dos Perciformes e sua manutenção em *Cichla* sugere que este gênero mantém as características do grupo basal que deu origem à família ciclídae. Além disso, a presença de um grande número de cromossomos subtelo-acrocêntricos nos diferentes grupos da família Cichlidae sugere um certo nível de manutenção da macroestrutura cariotípica durante a evolução do grupo. Por outro lado, a presença de cromossomos de dois braços nos diferentes grupos da família Cichlidae demonstra a ocorrência de mecanismos de rearranjos cromossômicos durante a história evolutiva do grupo.

A distribuição das RONS nos ciclídeos mostra a presença de um par cromossômico de maior tamanho portador destas regiões. Embora as RONS mantiveram-se conservadas em um único par cromossômico, diversos rearranjos cromossômicos estiveram envolvidos levando a origem dos diferentes fenótipos de RONS observados.

O padrão de distribuição centromérica da heterocromatina na maioria das espécies analisadas reforça a hipótese de que a presença de blocos heterocromáticos centroméricos é uma condição amplamente distribuída nas diferentes ordens de peixes. A presença de grandes blocos intersticiais de heterocromatina, como observado em *Crenicichla* sp2 e *Geophagus surinamensis*, mostra que mecanismos de heterocromatinização ou amplificação de heterocromatina podem contribuir para a diferenciação cariotípica das espécies do grupo.

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- Almeida-Toledo, L.F. 1998 – Cytogenetic Markers in Neotropical Freshwater Fishes. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena e C.A.S. Lucena, (eds). pp. 583-587. 603p. **Edipucrs**. Porto Alegre.
- Axelrod H.R. 1996 – The most complete colored lexicon of cichlids. 2nd Edition. **TFH Publications**. NJ, USA. 864pp.
- Brum, M.J.I. 1995 – Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes Teleósteos. *Série Monografias 2*: 5-42. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Brum, M.J.I. and Galetti Jr., P.M., 1997 – Teleostei group plan karyotype. **J. Comp. Biol.**, 2: 91-102.
- _____, Oliveira, C.C.; Voigt, N. & Corrêa, M.M.O. 1998 – Discrepância cariotípica entre duas populações de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae), incluindo a população da localidade-tipo, com possíveis implicações taxonômicas. **VII Simpósio de Citogenética Evol. e Aplicada de Peixes Neotropicais**, Londrina (PR), C-21.
- Cichocki, F.P. 1976 – Cladistic history of cichlid fishes and reproductive strategies of the American genera *Acarichthys*, *Biotodoma* and *Geophagus*, Ph.D. Thesis, Vol. 1, **University of Michigan**, Ann Arbor, Michigan USA.
- Couto, T.M.; Abreu, C.S.; Maistro, E.L.; Oliveira, C. & Foresti, F. 1998 – Análises cariotípicas preliminares na espécie *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Cichlidae) provenientes do Rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. **VII Simpósio de Citogenética Evol. e Aplicada de Peixes Neotropicais**, Londrina (PR), C-20.

- Farias I.P, Orti G, Sampaio I, Schneider H e Meyer A. 2000 – Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. **Journal of Molecular Evolution** 48: 703-711.
- Feldberg, E., and Bertollo, L.A.C. 1985 – Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38: 257-268.
- _____, Porto, J.I.R., Bertollo, L.A.C. 2003 – Chromosomal Changes and adaptation of Cichlid fishes during evolution, 285-308. In: VAL, A.L., Kapoor, B.G. *Fish Adaptations*. **Science Publishers, INC**. New Dehli & New York. 418p.
- Foresti, F.; Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L.F. 1993 – A method for chromosome preparation from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, **49**: 810-813.
- Galetti Jr., P.M.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 1984 – Characterization of eith species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing regions. **Caryologia**, 37:401-406.
- _____, César, A.C.G. & Vêneré, P.C. 1991 – Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, 44:287-292.
- Galis, F. e Metz, J.A.J. 1998 – Why are there so many cichlid species? **Trends in Ecology & Evolution** 13(1): 1-2.
- Giles, V., Thode, G. and Alvarez, M.C., 1985 – A new Robertsonian fusion in the multiple chromosome polymorphysm of a Mediterranean population of *Gobius paganelus* (Gobiidae, Perciformes). **Heredity**, 55: 255-260.
- Gosse, J.P. 1971 – Révision du genre *Retroculus* (Castelnaud, 1855), designation d'un neotype de *Retroculus lapidifer* (Castelnaud, 1855) et description de deux espèces

- nouvelles. Bulletin, **Institut royale des Sciences naturelles de Belgique**, 47 (43): 1-13.
- Greenwood, P.H. 1974a – The cichlid fishes of Lake Victoria, East África; the biology and evolution of a species flock. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist.(Zool.)**, Supp. 6, 1-134.
- Greenwood, P.H., 1978 – A review of the pharyngeal apophysis and its significance in the classification of African cichlid fishes. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)**, **33**, 297-323.
- Greenwood, P.H., 1987a – The genera of pelmatochromine fishes (Teleoste, Cichlidae). A phylogenetic review. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)**, **53**, 139-203.
- Guerra, M.S.I. 1986 – Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Braz. J. Genet.** **9**: 741-743.
- Klett V & Meyer A. 2002 – What, if anything, is a Tilapia? - Mitochondrial ND2 phylogeny of tilapiines and the evolution of parental care systems in the African cichlid fishes. **Mol. Biol. Evol.** 19(6): 865-883.
- Kocher TD. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature** 5: 288-298.
- Krichanã, S.R.L.; Falcão, J.N.; Feldberg, E.; Porto, J.I.R., 1996 – Caracterização citogenética de tres especies de peixes ornamentais da bacia amazônica. Proc. **VI Simp. Citog. Evol. Aplic. Peixes. Neotropicais**, p.91.
- Kornfield, I.L., 1978 – Evidence for rapid speciation in cichlid fishes. **Experientia**, 34: 335-336.
- Kullander, S.O. 1983b – Review of the South American Cichlidae. PhD Thesis. University of Stockholm.

- _____, 1986 – Cichlid Fishes of the Amazon River Drainage of Peru. **Swedish Museum of Natural History**. Stockholm.
- _____, 1989; "Description of a new *Acaronia* species (Teleostei: Cichlidae) from the Rio Orinoco and Rio Negro drainages"; **Zoologica Scripta**; pp. 447-452
- _____, 1998 – A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes), 461-498. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S - Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Part 5. Edipucrs. RS, **Brasil**.
- _____, 2006 – Guide to the South American Cichlid.
<http://www2.nrm.se/ve/pisces/acara/cichintr.shtml>.
- _____, Nijssen, H. 1989 – The Cichlids of Surinam. Leiden, The Netherlands: E. J. Brill.
- Lauder, G.V. e Liem, K.S. 1983 – The evolution and interrelationship of the actinopterygian fishes. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, **150** (3): 95-197.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52**: 201-220.
- Loureiro, M.A; Caetano, L.G.; Dias, A.L. 2000 – Cytogenetic characterization of two species of the Genus *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae). **Cytologia**, **65**: 57-63.
- Lowe-McConnell R.H. 1999 – Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP. São Paulo. 536p.
- Marescalchi, O. 2005 – Karyotype and mitochondrial 16S gene characterization in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). **JZS**. **43**. p. 22-28.

- Martins, C., 1997 – Novas contribuições à citogenética de Anostomidae (Pisces, Characiformes). Citotaxonomia e Filogenia no Gênero Schizodon. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de São Carlos/SP**, 99p.
- Martins C., Porto-Foresti F., Wasko A.P., Oliveira C. & Foresti F. 2002 – Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 28: 12-15.
- Martins, C., Ferreira, A. I., Oliveira, C., Foresti, F., & Galetti Jr, P. M. 2006 - A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141.
- Martins-Santos, I.C., Portela-Castro, A. L. B., Julio Jr. H. F. 1995 – Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. **Cytologia**, 60: 223-231.
- Martins-Santos, I.C., Portela-Castro, A. L. de Brito, Julio JR H. F. 2005 – Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara cf. dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the river Paraná PR Brazil. **Cariologia**, Vol. 58, nº 2: 95-101.
- Mesquita, D.R., Feldberg, E., Porto, J.I.R. 2000 – Análise da variabilidade cromossômica do peixe ornamental acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus*) da Amazônia: população natural de Manacapuru, AM. **Proc. VII Simp. Citog. e Genet de Peixes**. p. 34.
- Michele, J.L., and Takahashi, C.S. 1977 – Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). **Cytologia**. 42: 535-537.
- Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravahi, R.& Miller, O. J. 1976 – Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cell. **Expl. Cell Res.**, 101: 235-243.

- Murray A.M., 2001 – The fossil record and biogeography of the Cichlidae (Actinopterygii, Labroidei). **Biological Journal of the Linnean Society** 74:517-532.
- Nelson, J.S., 2006 – Fishes of the world. 4rd Edition. John Wiley & Sons Inc. NY, USA. 601p.
- Ohno, S. & Atkin, N.B., 1966 – Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. **Chromosoma**, 18: 455-466.
- Ojima, Y. 1983 – Fish cytogenetics. In: Chromosomes in Evolution of Eukariotic Group. Sharma A. K. e Sharma A. (eds). V.1. CRC Pres, **Boca Raton**, pp 111-145.
- Oliveira, C., Foresti, F., Almeida-Toledo, L.F. - Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Fish Cytogenetics. Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., eds. Enfield, Science Publisher, Inc., em publicação.
- Oliver, M.K. 1984 – Systematics of African cichlid fishes; determination of the most primitive táxon, and studies on the haplochromines of Lake Malawi (Teleostei: Cichlidae). PhD Thesis, **Yale University**.
- Oyhernart-Perera M.F., Luengo, J.A. and Brum-Zorrila, N., 1975 – Estúdio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jennyns) y *Crenicichla sexatilis* (LINN) (Teleostei, Cichlidae). **Revista Del Uruguai**. 3, 29-36.
- Pellegrin, J. 1904 – Contribution à l'étude anatomique, biologique et taxonomique des poissons de la famille Cichlides. **Mén. Soc. Zool. Fr.**, **16**, 41-399.
- Pieczarka, J.C. & Mattevi, M.S. 1998 – Heterocromatina constitutiva. *Série Monografias* 7: 185-225. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

- Prirodina, V.P. 1994 – Review of Karyotypic and Taxonomic Diversity in the Suborder Notoheinioidae (Perciformes). **Journal of Ichthyology**, **34**, 6: 1:13.
- Regan, C.T., 1906 – A revision of the fishes of the South American cichlid genera *Cichla*, *Chaetobranchius* and *Chaetobranchopsis*, with notes on the genera of the American Cichlidae. **Ann. Mag. nat. Hist.**, **7** (17), 230-239.
- Regan, C.T., 1920 – The classification of the fishes of the family Cichlidae. I. The Tanganyican genera. **Ann. Mag. nat. Hist.**, **9** (5), 33-53.
- Regan, C.T., 1922b – The classification of the fishes of the family Cichlidae. II. On African and Syrian genera not restricted to Great Lakes. **Ann. Mag. nat. Hist.**, **9** (10), 249-64.
- Salgado, S.M., Feldberg, E., Porto, J.I.R. 1994 – Estudos citogenéticos na família Cichlidae (Perciformes, Labroidei) da bacia amazônica Central. In: 41. Congresso Brasileiro de Genética, **Revista Brasileira de Genética (Supl.)**, V. 18.: p.463.
- _____, Falcao, J.N., Feldberg, E., Porto, J.I.R., 1996b – Ocorrência de citótipos diferentes em *Symphysodon aequifaciatus* (Perciformes, Cichlidae) da bacia amazônica. **Proc. VI Simp. Citog. Evol. Aplic. Peixes Neotropicais**, p. 89.
- Scheel, J.J., 1973 – Fish Chromosome and Their Evolution. Internal Report of Danmarks Akvarium, **Charlottenlund**, Denmark.
- Stiassny, M.L. J., 1981a – The phyletic status of the family Cichlidae (Pisces: Perciformes): a comparative anatomical investigation. **Neth. J. Zool.**, **31**: 275-314.
- Stiassny, M.L. J., 1987 – Cichlid familial intrarelationships and the placement of the neotropical genus *Cichla* (Perciformes, Labroidei). **J. nat. Hist.** V.21.: 1311-31.

Stiassny, M.L. J., 1991 – Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. Chapter one. p. 1 – 35. In: Keenleyside, M.H.A., Cichlid Fishes – behaviour ecology and evolution. **Chapman & Hall**. London, 378p.

Sumner, A.T. 1972 – A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, **75**: 304-305.

Thode G., Giles, V. and Alvarez M.C., 1985 – Multiple chromosome polymorphism in *Gobius paganelus* (Teleostei, Perciformes). **Heredity**, **55**: 3-7.

Thompson, K.W., 1979 – Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. **Copéia** 1979: 679-691.

Trewavas, E., 1973 – On the cichlid fishes of the genus *Pelmatochromis* with a proposal of a new genus for *P. congicus*; on the relationship between *Pelmatochromis* and *Tilapia* and the recognition of *Sarotherodon* as a distinct genus. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist.** (Zool.) **25**, 2-26.

Trewavas, E., 1983 – *Tilapiine* Fishes fo the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*, **British Museum (Natural History)**, London.

Vandewalle, P., 1971 – Comparasion ostéologique et myologique de cinq Cichlidae Africains et Sud-Américains. **Annls. Soc. R. zool. Belg.**, **101**. 259-92.

Vênere, P.C. & Galetti Jr., P.M. 1989 – Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Brazil. J. Genetic.**, **12**:17-25.

Vervoot, A., 1980 – The karyotypes of seven species of *Tilapia* (Teleostei: Cichlidae). **Cytologia**, **45**: 651- 656.

Warburton, D & Henderson, A.S. 1979 – Sequential silver staining and hybridisation in situ on nucleolus organizing regions in human cells. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 24: 168-175.

Watanabe W.O., Losordo T.M., Fitzsimmons, K. e Hanley, F., 2002 – Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science** 10: 465-498.

Wikipédia. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation – Apresenta conteúdo enciclopédico. Disponível: <<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Perciformes&oldid=3540436>>. Acesso em: 4 Dez 2006.