

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Gustavo Luiz Rossetto Pescatori

***ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM POPULAÇÕES DE
BRYCONAMERICUS STRAMINEUS, EIGENMANN, 1908,
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) EM RIOS DAS BACIAS DO TIETÊ E
PARANAPANEMA.***

MESTRADO

Botucatu - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Gustavo Luiz Rossetto Pescatori

***ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM POPULAÇÕES DE
BRYCONAMERICUS STRAMINEUS, EIGENMANN, 1908,
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) EM RIOS DAS BACIAS DO TIETÊ E
PARANAPANEMA.***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, área de concentração
Zoologia, do Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências (Ciências
Biológicas), área de concentração:
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu - SP

2008

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

Pescatori, Gustavo Luiz Rossetto.

Estudos citogenéticos em populações de *Bryconamericus stramineus*,
Eigenmann, 1908. (Teleostei, Characidae) em rios das bacias dos Rios Tietê e
Paranapanema / Gustavo Luiz Rossetto Pescatori. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: Fausto Foresti

Assunto CAPES: 20203004

1. Peixe - Genética - Paranapanema, Rio 2. Peixe - Genética - Tietê, Rio

CDD 597.55

Palavras-chave: *Bryconamericus*; Characidae; Incertae sedis; Citoge-
nética;

Sumário

Lista de figuras	VI
Lista de tabelas	X
Resumo	XI
Abstract	XIII
1.Introdução	1
1.1 Família Characidae	2
1.2 Estudos Citogenéticos em Peixes	4
1.3 Gênero Bryconamericus	7
2. Objetivos	10
3. Material	12
4. Métodos	16
4.1 Estimulação de Mitoses	16
4.2 Preparação de cromossomos mitóticos	16
4.3 Coloração com Giemsa	17
4.4 Localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs)	18
4.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (Bandas C)	19
4.6 Bandamento com o fluorocromo base-específico Cromomicina A ₃	19
4.7 Estudos Cariotípicos	20
4.8 Medidas Cromossômicas	21
4.9 Montagem dos Cariótipos	21
4.10 Hibridação “ <i>in situ</i> ” Fluorescente (FISH)	21
4.10.1 <i>Marcação da sonda (a – b)</i>	22
4.10.2 <i>Parâmetros para amplificação (5S e 18S)</i>	23
4.10.3 <i>Precipitação da sonda</i>	23
4.10.4 <i>Soluções reagentes para hibridação</i>	24
4.10.5 <i>Hibridação</i>	25
5. Resultados	28
5.1 Córrego Alambari	28
5.2 Córrego da Quinta	33
5.3 Córrego Jacutinga	38
5.4 Córrego Hortelã	43
5.5 Recanto dos Cambarás	48
6. Discussão	54
7. Conclusões	71
8. Referências	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto de um exemplar de *Bryconamericus stramineus* (pág. 13).

Figura 2: Mapa hidrológico do estado de São Paulo, evidenciando as Bacias dos Rios Tietê e Paranapanema (pág. 13).

Figura 3: Ribeirão Alambari – Município de Botucatu (pág. 14).

Figura 4: Córrego da Quinta – Município de Botucatu (pág. 14).

Figura 5: Córrego Jacutinga – Município de Bofete (pág. 14).

Figura 6: Ribeirão Hortelã – Município de Botucatu (pág. 14).

Figura 7: Recanto dos Cambarás – Município de Itatinga (pág. 14).

Figura 8: Cariótipo de *B. Stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Ribeirão Alambari (pág. 30).

Figura 9: Metáfase somática de exemplar *B. Stramineus* do Ribeirão Alambari, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas (pág. 31).

Figura 10: Metáfase somática de exemplar de *B. Stramineus* do Ribeirão Alambari, marcada com nitrato de prata. As setas estão evidenciando os cromossomos portadores das RONS (pág. 31).

Figura 11: Metáfase somática de exemplar *B. Stramineus* do Ribeirão Alambari, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). A seta indica a distribuição da região rica em pares de base GC (pág. 32).

Figura 12: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Ribeirão Alambari, submetida à hibridação *in situ* fluorescente dupla (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde) (pág. 32).

Figura 13: Cariótipo de *B. Stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos) de exemplar do Córrego da Quinta (pág. 35).

Figura 14: Metáfase somática de exemplar de *B. Stramineus* do Córrego da Quinta, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas (pág. 36).

Figura 15: Metáfase somática de exemplar de *B. Stramineus* do Córrego da Quinta, marcada com nitrato de prata. As setas estão evidenciando os cromossomos portadores das RONS (pág. 36).

Figura 16: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Córrego da Quinta, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). As setas indicam as regiões ricas em pares de base GC (pág. 37).

Figura 17: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Córrego da Quinta, submetida à hibridação *in situ* fluorescente dupla (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde) (pág. 37).

Figura 18: Cariótipo de *B. Stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos) de exemplar do Córrego Jacutinga (pág. 40).

Figura 19: Metáfase somática de exemplar de *B. stramineus*, do Córrego Jacutinga, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas (pág. 41).

Figura 20: Metáfase somática de exemplar *B. stramineus* do Córrego Jacutinga, marcada com nitrato de prata. As setas estão evidenciando os cromossomos portadores das RONS (pág. 41).

Figura 21: Metáfase somática de *B. stramineus* do Córrego Jacutinga, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). As setas indicam as regiões ricas em pares de base GC (pág. 42).

Figura 22: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Córrego Jacutinga, submetida à hibridação *in situ* fluorescente dupla (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde) (pág. 42).

Figura 23: Cariótipo de *B. Stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos) de exemplar do Ribeirão Hortelã (pág. 45).

Figura 24: Metáfase somática de exemplar de *B. stramineus* do Ribeirão Hortelã, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas (pág. 46).

Figura 25: Metáfase somática de *B. stramineus* do Ribeirão Hortelã, marcada com nitrato de prata. As setas estão evidenciando os cromossomos portadores das RONS (pág. 46).

Figura 26: Metáfase somática de *B. stramineus* do Ribeirão Hortelã, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). As setas indicam as regiões ricas em pares de base GC (pág. 47).

Figura 27: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Ribeirão Hortelã, submetida à hibridação *in situ* fluorescente dupla (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde) (pág. 47).

Figura 28: Cariótipo de *B. Stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos) de exemplar do Recanto dos Cambarás (pág. 50).

Figura 29: Metáfase somática de exemplar de *B. stramineus* do Recanto dos Cambarás, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas (pág. 51).

Figura 30: Metáfase somática de *B. stramineus* do Recanto dos Cambarás, marcada com nitrato de prata. As setas estão evidenciando os cromossomos portadores das RONS (pág. 51).

Figura 31: Metáfase somática de *B. stramineus* do Recanto dos Cambarás, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). As setas indicam as regiões ricas em pares de base GC (pág. 52).

Figura 32: Metáfase somática de *B. Stramineus* do Recanto dos Cambarás, submetida à hibridação *in situ* fluorescente dupla (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde) (pág. 52).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Locais de coleta da espécie *Bryconamericus stramineus*, em componentes das Bacias Hidrográficas dos Rios Tietê e Paranapanema (pág. 15).

Tabela 2: Número diplóide, fórmula cariotípica e número fundamental dos exemplares de *Bryconamericus stramineus* das bacias do Rio Tietê e Rio Paranapanema (pág. 53).

Tabela 3: Dados citogenéticos comparativos no gênero *Bryconamericus* em diferentes localidades do Brasil, dispostos em ordem crescente de número fundamental (NF) (pág. 56).

RESUMO

A família Characidae é a maior e mais complexa dentre as famílias de peixes da ordem Characiformes e grande parte dos peixes do Brasil encontra-se na família Characidae. A maioria dos peixes desta família é conhecida popularmente como lambaris, piracanjubas, peixes-cachorros, pacus, piranhas e dourados. Distribuem-se no continente americano – desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina. O gênero *Bryconamericus* possui aproximadamente 51 espécies identificadas e destas, cerca de 30 que vivem em distintas regiões do Brasil, possuem um número diplóide relativamente estável de $2n=52$ cromossomos, mas há muito pouca informação citogenética sobre os representantes deste. No presente projeto, foi realizada a análise citogenética em representantes de cinco populações de *Bryconamericus stramineus*, Eigenmann, 1908, em rios das bacias do Tietê e Paranapanema, região de Botucatu, SP. Para tanto, foram caracterizados seus cariótipos através de coloração convencional com Giemsa, a qual evidenciou um cariótipo padrão de $2n=52$ cromossomos; foram identificados os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva (Bandas C) que revelaram blocos heterocromáticos centroméricos, intersticiais e teloméricos; foram identificadas as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) através de impregnação com nitrato de prata, evidenciando-se RONs simples e múltiplas; foram identificadas as regiões cromossômicas ricas em GC através de coloração com o fluorocromo cromomicina (CMA_3) que também se mostraram simples e múltiplas, mostrando correspondência com as Ag-RONs; foram identificados ainda os cístrons ribossômicos através de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 18S, que revelou de duas a seis marcações e com a sonda de DNAr 5S que revelou de três a cinco marcações. Os dados obtidos, além de revelarem

aspectos citogenéticos desta espécie, podem também ser utilizados em interpretações evolutivas, na inferência da estrutura genética das espécies e/ou populações de *Bryconamericus* e ainda fornecer subsídios a futuros estudos que visem a compreensão das relações entre as espécies deste grupo.

1. INTRODUÇÃO

A ictiofauna Neotropical de água doce é uma das mais ricas e diversificadas do mundo. Segundo VARI e MALABARBA (1998), aproximadamente 24% da diversidade mundial de peixes pode estar representada por peixes continentais da América do Sul. Estimativas apontam que existam cerca de 8000 espécies de peixes neotropicais de água doce encontradas nas Américas Central e do Sul (SCHAEFER, 1998). REIS et. al. (2003), descreve 71 famílias e 4.475 espécies de peixes neotropicais. Outros estudos relacionam aproximadamente 2.240 espécies de peixes de água doce para o Brasil (ABILHOA & DUBOC, 2004). Porém, pesquisas mais recentes confirmam que a fauna de peixes continentais do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies já descritas e existindo ainda muitas em fase de descrição ou desconhecidas (BUCKUP *et al.*, 2007).

Apesar desta grande diversidade de espécies encontradas, muitas correm risco de extinção e podem desaparecer sem ao menos terem sido estudadas. Nesse cenário a destruição de habitats, bem como a introdução de espécies exóticas, figuram como alguns dos principais fatores na diminuição da diversidade dos ambientes aquáticos da região Neotropical (SUNAGA & VERANI, 1991; ORSI & AGOSTINHO, 1999; BOJSEN & BARRIGA, 2002; LATINI & PETRERE JR., 2004).

A maior parte dessa diversidade de peixes, mais especificamente a sul americana, pertence a um dos cinco grupos dominantes: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Ciclídeos (LUNDBERG *et al.*, 2000). Os Characiformes constituem um grupo dominante entre os peixes de água continental da América do Sul, compreendendo formas herbívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas (BRITISKI *et al.*, 1972). Dentro

da ordem Characiformes está inserida a família Characidae, que é a maior e mais complexa entre as famílias desta ordem. Para se saber o número de gêneros e espécies dentro da família Characidae e da ordem Characiformes, estudos foram realizados por alguns autores, dentre eles NELSON em 1994 e 2006 e REIS e colaboradores em 2003. Embora os estudos realizados por NELSON em 2006 sejam mais recentes, a referência mais comumente utilizada relaciona-se aos estudos realizados por REIS *et al.* em 2003, que apresenta os Characiformes com aproximadamente 237 gêneros e 1373 espécies e Characidae com 184 gêneros e 950 espécies.

1.1 FAMÍLIA CHARACIDAE

Characidae é considerada a maior e a mais complexa família de peixes entre os Characiformes (NELSON, 1994). FINK (1979) critica os critérios utilizados na sistemática dos Characidae, pois o sistema de classificação usado baseia-se nos trabalhos realizados por EIGENMANN (1917) e estes já estariam ultrapassados.

Os representantes da família Characidae estão presentes em diversos ambientes de água doce e distribue-se no continente americano, desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina e também no continente africano (LUCENA, 1993; FROESE & PAULY, 2005).

De acordo com FINK & FINK (1981), a posição taxonômica da família Characidae é a seguinte:

CLASSE: Osteichthyes	SUPERORDEM: Ostariophysi
SUBCLASSE: Actinopterygii	ORDEM: Characiformes
INFRACLASSE: Teleostei	FAMÍLIA: Characidae

Os peixes mais comuns da família Characidae são os lambaris, piracanjubas, peixes-cachorros, pacus, piranhas e dourados, sendo que todos os representantes desta família possuem escamas e são muito conhecidos pelos pescadores. Apresentam variados tamanhos, desde dois centímetros como as pequiras, até mais de um metro como os dourados (BRITSKI, 1972). Estes animais encontram-se em habitats bem variados e apresentam um diversificado hábito alimentar, sendo herbívoros, onívoros ou carnívoros (BRITSKI *et al.*, 1988). Os peixes deste grupo são coletados com relativa facilidade na maioria dos cursos de água, e caracterizam-se tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes em geral encontrados (DANIEL – SILVA, 1996).

Os estudos citogenéticos na família Characidae iniciaram-se com POST (1965) relatando o número cromossômico haplóide e/ou diplóide para várias espécies. Segundo FALCÃO (1988) existe uma grande amplitude numérica cromossômica nas subfamílias deste grupo de peixes. OLIVEIRA *et al.* (1988a), relacionaram 199 espécies de Characidae, cujos números haplóides e ou diplóides já conhecidos evidenciaram uma grande diversidade cromossômica. Existe ainda em Characidae uma acentuada predominância de números diplóides entre 48 e 52 cromossomos (83,7%), seguidos dos números entre 54 e 64 (10,2%) e depois, entre 28 e 46 (5,9%) (CESTARI, 1996).

Apesar desta grande diversidade cariotípica, uma característica relativamente constante em diversas espécies da família Characidae é a presença de um par de cromossomos metacêntricos grandes, o primeiro do complemento cariotípico, inicialmente observada por SCHEEL (1972) e ressaltada posteriormente por diversos autores.

A família Characidae, além da grande variabilidade numérica, também apresenta extensa variabilidade em relação ao número de cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos, já tendo sido descritas espécies com um número máximo de até treze pares de cromossomos nucleolares (ROCON-STANGE & ALMEIDA-TOLEDO, 1993), embora a condição mais simples, com apenas um par cromossômico envolvido com a organização nucleolar seja mais freqüentemente encontrada.

Os estudos citogenéticos associados a taxonomia e a sistemática, podem ser de extrema importância na identificação de novas espécies ou de espécies taxonomicamente problemáticas (WEITZMAN & FINK, 1983; BERTOLLO *et al.*, 1986), como parece ocorrer dentro da família Characidae, e também no entendimento dos problemas genéticos, evolutivos e sistemáticos deste grupo (OJIMA, 1983).

1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES

Até o final dos anos 70, pouco se conhecia sobre as características citogenéticas da ictiofauna neotropical. Os dados disponíveis limitavam-se ao conhecimento do número cromossômico de algumas poucas espécies, muitas das quais obtidas de espécimes de origem geográfica desconhecida (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1978).

Os primeiros trabalhos publicados sobre citogenética de peixes Neotropicais foram realizados na década de 70 e atualmente, vários outros têm sido desenvolvidos com uma ampla abrangência dos grupos de peixes, resultando em uma considerável quantidade de conhecimentos disponíveis, segundo revisão feita por OLIVEIRA *et al.* (2006).

Tanto do ponto de vista citogenético, como também do ponto de vista evolutivo, os peixes compõem um interessante grupo de estudo. Em termos cariotípicos, diferentes particularidades já foram relatadas neste grupo, o que justifica o aumento nas pesquisas envolvendo estes animais (AFFONSO, 2000). Diferentemente de outros vertebrados, os peixes encontram-se confinados à água, apresentando maiores restrições quanto à sua dispersão. No caso de peixes de água doce, seu confinamento aos sistemas hidrológicos resulta em um estreito relacionamento entre as histórias das bacias e a história natural-evolutiva destes animais (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003).

Até recentemente, segundo PORTO-FORESTI *et al.* (2006), os exames cariotípicos nos peixes eram considerados principalmente como uma ferramenta para estudos básicos e evolutivos, não sendo utilizados no manejo e monitoramento de estoques. Quando análises não são suficientes para caracterizar precisamente os indivíduos, a identificação pode ser baseada em marcadores cromossômicos estruturais. Entre os marcadores cromossômicos mais utilizados em peixes, têm-se a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através do nitrato de prata, a caracterização dos padrões de heterocromatina constitutiva pela técnica da Banda C, a coloração por fluorocromos base-específicos e a localização de seqüências específicas com o uso da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (OCALEWICZ *et al.*, 2006; PORTO-FORESTI *et al.*, 2006).

Os estudos citogenéticos em peixes tem mostrado um crescente interesse, sendo que atualmente cerca de 2600 espécies de todo o mundo possuem seu cariótipo identificado (OZOUF-COSTAZ e FORESTI, 1992). Hoje existem informações citogenéticas disponíveis para cerca de 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199

espécies não pertencentes à superordem Ostariophysi e 109 espécies de peixes marinhos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os dados citogenéticos disponíveis para os peixes de água doce revelam uma variedade cromossômica surpreendente, além de possibilitarem a identificação das principais tendências evolutivas e de algumas características citogenéticas peculiares desta fauna (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000). Até o presente momento, o menor número diplóide relatado para espécies da região neotropical corresponde a $2n = 20$ cromossomos para *Pterolebias longipinnis* (OLIVEIRA *et al.*, 1988a) e o maior, $2n = 134$ cromossomos, para *Corydoras aeneus* (TURNER *et al.*, 1992). Além disso, entre seus representantes, há grupos de espécies caracterizados por uma estabilidade nos números diplóides e fórmulas cariotípicas e grupos que apresentam uma grande diversidade nestas características (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000; ARTONI *et al.*, 2000).

Técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos como as de BERTOLLO *et al.* (1978) e FORESTI *et al.* (1981) impulsionaram a realização de muitos trabalhos de citotaxonomia em peixes neotropicais. O número diplóide de 52 cromossomos, além de ser comum entre as espécies das subfamílias de Characidae (OLIVEIRA *et al.*, 1988a; FALCÃO, 1988; AREFJEV, 1990), parece ser relativamente comum também no gênero *Bryconamericus*.

Os estudos citogenéticos podem ser de extrema importância na identificação de novas espécies ou de espécies taxonomicamente problemáticas (WEITZMAN & FINK, 1983; BERTOLLO *et al.*, 1986) como parece ocorrer dentro da família Characidae, além de resultarem em informações de interesse e também para o entendimento de problemas genéticos, evolutivos e sistemáticos neste grupo (OJIMA, 1983).

1.3 GÊNERO BRYCOMAMERICUS

O gênero *Bryconamericus*, segundo REIS *et al.* (2003), pertence atualmente ao grupo dos *Incertae sedis*. Anteriormente era classificado como sendo da subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977), que constituía um grande agrupamento heterogêneo de peixes. Hoje é identificado como uma subfamília monotípica, restringindo-se somente ao gênero *Tetragonopterus*. Dentro de *Incertae sedis* são descritos 88 gêneros, incluindo 620 espécies, sendo que destas, 51 espécies fazem parte do gênero *Bryconamericus*.

Bryconamericus exodon EIGENMANN (1907) é a espécie-tipo do gênero. Na descrição original, EIGENMANN (1907) chama a atenção para o desalinhamento dos dentes da série externa do pré-maxilar. A espécie é morfologicamente semelhante à *B. stramineus* por apresentar corpo relativamente baixo e alongado, sendo sua altura menos de 30% do comprimento padrão (vs. mais de 30% do CP), boca terminal (vs. boca inferior) e série externa de dentes do pré-maxilar desalinhada (vs. série externa de dentes do pré-maxilar alinhada) (PITON, J. S.; LANGEANI, F., 2006).

Segundo EIGENMANN (1927), no gênero *Bryconamericus* estão incluídos todos os peixes caracídeos que possuem linha lateral completa, uma fileira simples de dentes no dentário, duas séries de dentes no pré-maxilar com quatro dentes na série interna, o que o distingue do gênero *Astyanax* segundo BRITSKI (1972), um baixo número de dentes ao longo da margem anterior da maxila, nadadeira caudal nua com escamas apenas na base, terceiro infraorbital grande em contato com o pré-opérculo ao longo de suas margens posterior e ventral, brânquias setiformes, sistema completo de canal látero-sensorial no corpo e ausência de bolsa glandular

na nadadeira caudal dos machos (BRITSKI, 1972; BRITSKI *et al.* 1988; VARI & SIEBERT, 1990).

A definição de *Bryconamericus* é muito ampla; mesmo EIGENMANN (1927) já notava sua grande heterogeneidade e dividia o gênero em três ou quatro grupos "derivados independentemente a partir de diferentes espécies de *Astyanax* e *Hemibrycon*". VARI & SIEBERT (1990) comentam que "existe pouca confiança de que *Bryconamericus* represente um grupo monofilético dentro de Characidae", no que concordam MALABARBA & MALABARBA (1994). ROMÁN-VALENCIA (2000), ao contrário, afirma que o gênero é natural (incluindo *Knodus* e *Eretmobrycon*).

As muitas espécies pertencentes ao gênero *Bryconamericus* - aproximadamente 30 a 40 espécies já identificadas - são encontradas em distintas regiões da América do Sul e América Central (GÉRY, 1977), embora, estudos mais recentes realizados por REIS *et al.* (2003) identifiquem aproximadamente 51 espécies no gênero *Bryconamericus*. Este gênero é o mais diverso nas bacias do Atlântico do continente americano, especialmente na Bacia Amazônica; conhece-se nos rios brasileiros cerca de 30 espécies.

Bryconamericus stramineus Eigenmann, 1908, comumente conhecido como pequirá na região do alto do Rio Paraná, distribui-se desde o Rio Paraguai até o Rio São Francisco (PLANQUETTE *et al.*, 1996). É uma espécie forrageira que não desperta interesse comercial devido ao seu pequeno tamanho, cerca de 76 mm de comprimento (RINGUELET *et al.*, 1967), porém é importante na cadeia alimentar dos sistemas que habita, servindo de alimento para peixes piscívoros.

Conhece-se muito pouco sobre os cromossomos do gênero *Bryconamericus*. O primeiro cariótipo descrito para o gênero foi relatado para a espécie *B. stramineus*, com $2n=52$ cromossomos e fórmula cariotípica

apresentando 13 pares de cromossomos meta-submetacêntricos e 13 pares de subtelo-acrocêntricos (PORTELA *et al.*, 1988). WASKO *et al.* (1996) reorganizou este cariótipo e apresentou-o como tendo 6 cromossomos metacêntricos, 10 submetacêntrico, 16 subtelocêntricos e 20 acrocêntricos. Estudos mais recentes sobre as diferentes espécies do gênero *Bryconamericus* revelam uma notável variabilidade cariotípica. Entretanto, o número diplóide $2n=52$ cromossomos permanece constante (WASKO & GALETTI, 1998; MELO *et al.*, 1999; PAINTNER-MARQUES *et al.*, 2002a-b, 2003; PORTELA-CASTRO *et al.*, 2007; CAPISTANO *et al.*, 2008). Tendo em vista a escassez de informação citogenética e ainda a existência de confusão taxonômica sobre este grupo, estudos mais apurados fazem-se necessários, para melhor identificação dos seus componentes e para compreesão das relações existentes entre as espécies.

2. OBJETIVOS

Constatando-se a necessidade de informações sobre os componentes deste grupo e considerando-se a relativa insuficiência de dados citogenéticos no gênero *Bryconamericus*, mais especificamente na espécie *Bryconamericus stramineus*, e sabendo-se de sua ocorrência e diversidade em localidades no Estado de São Paulo, foram realizadas investigações sobre as características citogenéticas deste grupo, tendo por objetivos:

- a)** caracterizar citogeneticamente diferentes populações de *Bryconamericus stramineus* dos componentes das bacias hidrográficas dos Rios Tietê e Paranapanema (região de Botucatu), inicialmente através da coloração convencional Giemsa;
- b)** identificar a localização e distribuição das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), nos representantes de populações desta espécie em diferentes localidades, através de impregnação com nitrato de prata e Cromomicina A₃ (CMA₃ específica para regiões GC);
- c)** identificar os padrões de distribuições de heterocromatina constitutiva (Bandas C) nos cromossomos;
- d)** identificar a presença de cístrons ribossômicos nos cromossomos do complemento A, através de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), utilizando sondas de DNAr 5 S e 18S;
- f)** identificar com o uso das técnicas de bandeamento clássico e molecular, marcadores que possam fornecer informações comparativas entre as diferentes populações;

g) estabelecer os padrões de diversificação e interpretar os mecanismos de especiação deste grupo de peixes;

h) contribuir com informações citogenéticas tanto para o gênero *Bryconamericus* quanto para a espécie *B. stramineus*, correlacionando os resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.

3. MATERIAL

Os exemplares coletados foram previamente identificados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, para saber se correspondiam à espécie que seria alvo de estudo. Foram analisados 113 exemplares da espécie *Bryconamericus stramineus* (Figura 1) coletados nas bacias do Rio Tietê e Paranapanema (Tabela 1 e Figura 2) em localidades da região de Botucatu, SP (Figuras 3, 4, 5,6 e 7).

Os animais foram coletados com o auxílio de puçás e redes de arrasto. Após serem coletados, foram transportados até o laboratório e mantidos em aquários aerados até seu sacrifício para obtenção de preparações de cromossomos metafásicos, através da extração de fragmentos de tecidos da porção anterior do rim e brânquias em alguns casos. Para os estudos moleculares, foram coletadas amostras de fígado ou tecido com o intuito de se proceder a extração e purificação do DNA.

Após o processamento, os peixes foram numerados de acordo com o livro de registros do laboratório, fixados inicialmente em formol a 10% e posteriormente conservados em álcool etílico a 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.



Figura 1 – Foto de exemplares de *Bryconamericus stramineus*, fixados e numerados para identificação e conservados em álcool. (fonte: Gustavo Pescatori)

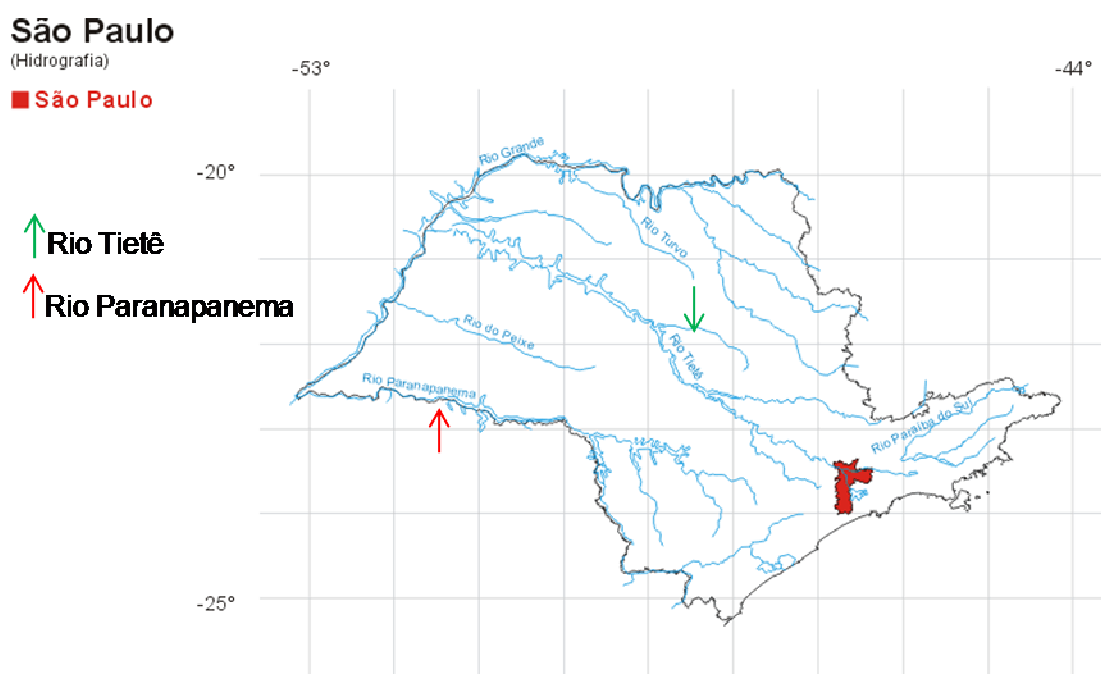


Figura 2 – Mapa hidrológico do estado de São Paulo, evidenciando as Bacias dos Rios Tietê e Paranapanema. (fonte: Google imagens)



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7

Locais de coleta de *Bryconamericus stramineus* em componentes das Bacias dos Rios Tietê e Paranapanema. **Figura 3** – Ribeirão Alambari, município de Botucatu, SP; **Figura 4** – Córrego da Quinta, município de Botucatu, SP; **Figura 5** – Córrego Jacutinga, município de Bofete, SP; **Figura 6** – Ribeirão Hortelã, município de Botucatu, SP; **Figura 7** – Recanto dos Cambarás, município de Itatinga, SP.
(fonte:GustavoPescatori).

Tabela 1: Locais de coleta da espécie *Bryconamericus stramineus*, em componentes das Bacias Hidrográficas dos Rios Tietê e Paranapanema.

Bacia do Rio Tietê			Bacia do Rio Paranapanema		
	Ribeirão Alamabari	Córrego da Quinta	Córrego Jacutinga	Ribeirão Hortelã	Recanto dos Cambarás
Número de Exemplares	25 12♂ 11♀ 2si	22 17♂ 5♀	23 19♂ 4♀	17 5♂ 12♀	26 23♂ 3♀
Coordenadas Geográficas	S 22º 56' 08" W 48º 19' 15"	S 23º 30,181' W 48º 30,181'	S 23º 09' W 48º 16'	S 22º 56' 28,3" W 22º 56' 28,3"	S 19º 34,630' W 57º 01,123'
Figuras	3	4	5	6	7
si: sem identificação / ♂ macho / ♀ fêmea					

si: sem identificação / ♂ macho / ♀ fêmea

4. MÉTODOS

4.1 Estimulação de Mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada a técnica de estimulação da divisão celular através da injeção de solução de fermento biológico, descrita inicialmente por COLE e LEAVENS (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por LEE E ELDER (1980) para pequenos mamíferos e adaptada para peixes por OLIVEIRA *et al.* (1988b). O procedimento consiste em:

- a) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção - 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada;
- b) incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 min;
- c) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1ml/100g de peso do animal;
- d) deixar o animal em aquário bem aerado por 48 a 72 horas.

4.2 Preparação de cromossomos mitóticos

A técnica utilizada para a obtenção de preparações cromossômicas para a análise citogenética, realizada em células extraídas da parte anterior do rim para a obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*, foi a descrita por FORESTI *et al.* (1981) e utilizada com algumas modificações. O procedimento consiste em:

- a) injetar solução aquosa de colchicina 0,025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) intra-abdominalmente no animal com uma seringa, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Deixá-lo nadando livremente por 50 minutos;
- b) sacrificar o animal, retirando rins e brânquias com o auxílio de tesoura e pinças de ponta fina;

- c) colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M);
- d) dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, primeiro deve-se dissociar o material com pinças de ponta fina, depois, homogeneizar com o auxílio de uma Pipeta Pasteur;
- e) retirar a suspensão celular da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrífuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C, durante 21 minutos;
- e) retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de solução fixadora gelada (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente;
- f) adicionar cerca de 6ml do fixador e novamente agitar a mistura. Levar para centrífuga a 1000rpm por 10 minutos;
- g) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6ml de fixador;
- h) centrifugar por 7 minutos a 1000rpm;
- i) centrifugar por mais 2 ou 3 vezes;
- j) pingar o material em lâminas e secá-las ao ar livre.

4.3 Coloração com Giemsa

Para coloração com Giemsa, utilizou-se o seguinte procedimento, que consiste em:

- a) hidrolisar o material em HCL 1N a 60°C por cerca de 3 minutos.
- b) corar com uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por 10 minutos.

4.4 Localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs)

As RONS foram detectadas utilizando-se a técnica descrita por HOWELL & BLACK (1980), seguindo o seguinte protocolo:

São utilizadas duas soluções:

- Solução A: solução coloidal reveladora: 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50ml de água deionizada. Acrescenta-se 0,5ml de ácido fórmico.
- Solução B: solução de Nitrato de Prata: 1g de AgNO₃ dissolvida em 2ml de água deionizada.

Essas soluções, depois de preparadas, devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento utilizado para coloração das RONS foi o seguinte:

- a) hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 minutos em HCL 1N a 60°C;
- b) secar as lâminas;
- c) pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina; cobrir com lamínula;
- d) deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C;
- e) em alguns minutos (aproximadamente 3 minutos) a mistura das soluções se torna marrom dourada;
- f) lava-se a lâmina em água deionizada e deixa-se secar;
- g) corar com Giemsa na proporção de 1:30 da solução-mãe em tampão fosfato (pH = 6,7) por 30 segundos.

4.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (Bandas C)

Para a obtenção de Bandas C foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972) com algumas adaptações, que consiste em:

- a) hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCL 0,2N à temperatura ambiente;
- b) lavar em água destilada;
- c) passar por uma solução de hidróxido de bário $\text{Ba}(\text{OH})_2$ por cerca de 1 minuto;
- d) lavar em HCL 1N a 60°C. Lavar em água destilada;
- e) incubar por 30 minutos em 2x SSC (pH = 6,8), a 60°C;
- f) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (pH = 6,7).

4.6 Bandamento com o fluorocromo base-específico Cromomicina A₃ (CMA₃)

Para a detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de base GC, foi utilizada a técnica descrita por SCHWEIZER (1976) que emprega o corante Cromomicina A₃ (CMA₃), que consiste em:

- a) colocar sobre as lâminas uma solução tampão McIlvaine + MgCl_2 e cobrir com lamínula. Incubar em placa de Petri umidecida com o mesmo tampão por 10 minutos;
- b) retirar o tampão da lâmina com pipeta Pasteur e, sem lavar as lâminas, secar a parte de trás das mesmas;
- c) depositar as lâminas em placa de Petri, colocar 150 μl de cromomicina (0,5 mg/ml), cobrir com lamínulas lavadas em etanol no momento do uso e deixar o conjunto dentro de uma caixa escura por 15 minutos;

- d) retirar as lamínulas em tampão McIlvaine, lavando as lâminas nesta solução, vagarosamente;
- e) incubar as lâminas em solução de methyl-green/hepes por 15 minutos;
- f) secar as lâminas, pingar sobre elas uma gota de glicerol com propilgalato e depositar uma lamínula para montagem de uma lâmina permanente;
- g) deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 20 dias antes da análise;
- h) observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

4.7 Estudos Cariotípicos

As suspensões celulares convencionais foram analisadas em microscópio óptico comum e a análise da coloração cromossômica com composto fluorescente em fotomicroscópio digital de fluorescência.

As melhores metáfases, ou seja, as que apresentaram melhor dispersão e cromossomos com morfologia mais nítida e melhores padrões de bandamento, foram fotografadas em filme branco e preto 25 ASA AGFA-GEVAERT (suspensões celulares convencionais) ou registradas no fotomicroscópio digital OLYMPUS BX-UCB (suspensões celulares convencionais e de coloração cromossômica com composto fluorescente).

O número fundamental (NF) de cada espécie foi obtido através da contagem do número de braços cromossômicos. Assim, com relação ao NF, os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados como tendo dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos, como tendo somente um braço.

4.8 Medidas Cromossômicas

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), proposta por LEVAN *et al.* (1964) e foram classificados em metacêntrico (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntrico (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

4.9 Montagem dos Cariótipos

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos e acrocêntricos (A), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo (M, SM, ST, A) e em ordem decrescente de tamanho.

4.10 Hibridação “*in situ*” Fluorescente (FISH)

O protocolo descrito a seguir foi baseado nos procedimentos adotados por PINKEL *et al.* (1986), com alterações, adaptado para a espécie estudada para a realização da hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

A sonda de DNAr 5S utilizada na hibridação *in situ* fluorescente foi obtida de uma sequência do DNAr 5S da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999), clonada no vetor pGEM-T e a sonda de DNAr 18S foi obtida de uma sequência do DNAr 18S da espécie *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004), clonada no vetor pGEM-T. As sondas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, professor do programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

4.10.1 Marcação da sonda

a- Marcação da sonda DNAr 5S por PCR – digoxigenina 11 dUTP

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima	10x	5,0 µl
DNA		Variável 10-100ng(1µl)
dATP	2mM	1,0 µl
dCTP	2mM	1,0 µl
dGTP	2mM	1,0 µl
dTTP	2mM	0,7 µl
Digoxigenina 11 dUTP	1mM	0,6 µl
Primer F	10mM	0,5 µl
Primer R	10mM	0,5 µl
MgCL ₂ (50mM)	2mM	4,0 µl
dH ₂ O		34,2 µl
Taq pol	5U/µl	0,5 µl
Total		50 µl

b- Marcação da sonda de DNAr 18S por PCR – biotina 14 dATP

Reagentes	Concentrações	Quantidades
Tampão da enzima	10x	5,0 µl
DNA		Variável 10-100ng
dATP	2mM	1,0 µl
dCTP	2mM	1,0 µl
dGTP	2mM	1,0 µl
dTTP	2mM	0,5 µl
Biotina 14 dATP	0,4 mM	2,5 µl
Primer F	2mM	2,5 µl
Primer R	2mM	2,5 µl
MgCL ₂	2mM	4,0 µl
dH ₂ O		
Taq pol	5U/µl	0,5 µl
Total		50 µl

4.10.2 Parâmetros para amplificação de DNAr 5S e 18S

- 1- 94°C – 5'
 - 2- 94°C – 1"
 - 3- 53°C – 45
 - 4- 72°C – 2'
 - 5- 72°C – 5'
 - 6- 4°C – manutenção
- } 35 ciclos

OBS. Checar o produto da PCR em gel de agarose 0,8%.

4.10.3 Precipitação da sonda

- precipitar o produto da PCR com 1/10 do volume da reação com acetato de sódio
- 3M e duas vezes o volume total da reação com de etanol PA gelado;
- incubar a –20°C overnight;
- centrifugar a 14.000 rpm por 10 min;
- descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50 µl etanol 70%;
- centrifugar a 14.000 rpm 5 min;
- descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em **x** µl de água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

4.10.4 Soluções reagentes para hibridação

a) Solução RNase

- 5 µl RNase 10mg/ml
- 995 µl 2xSSC

b) Solução pepsina

- 99 mL de H₂O
- 1 mL de HCl 1M
- 50 µl de pepsina 10%

c) Solução de formaldeído

- 10 mL de PBS 10x
- 5 mL de MgCl₂ 1 M
- 1 mL de formaldeído
- Completar para 100 ml com H₂O destilada

d) Solução Formamida 70%

- 70 mL de formamida
- 30 mL de 2xSSC

e) Solução de Hibridação: (estringência 77%) duas sondas (DOUBLE FISH)

- 200 µl Formamida (50% de Formamida);
- 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 8 µl DNA de placenta 10mg/ml (1µl/ lâmina);
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda A
- 36 µl de H₂O qsp. Acrescentada a sonda B
- Volume final 400 µl.

f) Solução formamida 15%/0,2xSSC

- 30 mL de formamida

- 20 mL de 2xSSC
- 150 mL de H₂O destilada

g) Solução de Tween 0,5%/4xSSC

- 200 mL de 20xSSC
- 5 mL solução estoque Tween 10%; ou 500 µl Tween puro
- completar para 1L de H₂O

h) Tampão 5% NFDM/4xSSC

- 20 mL de 20xSSC
- 80 mL de água milli Q
- 5 g de leite em pó molico Ca⁺⁺ desnatado

OBS. antes de incubar alicotar 5 tubos com 1000 µl cada do tampão 5% NFDM/4xSSC

4.10.5 Hibridação (protocolo para 10 lâminas)

Tratamento com RNase (*solução a*)

- 1- lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker);
- 2- desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar);
- 3- incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
- 4- lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
- 5- lavar durante 5 min em PBS 1x.

OBS. durante a incubação na RNase preparar o mix de hibridação, a formamida a 70% a 70°C e o formaldeído;

Tratamento com Pepsina (*solução b*) - (*opcional – pular para passo 8*)

- 6- incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C (pode ser T° ambiente);
- 7- lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) a temperatura ambiente;

Fixação (*solução c*)

- 8- fixar a preparação em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 min a temperatura ambiente;
- 9- lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker);
- 10- desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada;

Pré-hibridação (*solução d*)

- 11- simultaneamente a desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
- 12- desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min;
- 13- desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.

Obs. a série alcoólica deverá estar a –20°C;

Hibridação (*solução e*)

- 14- preparar a câmara úmida a 37°C (IMPORTANTE);
- 15- montar cada lâmina com 40 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar o material incubando overnight a 37°C;

Lavagens – Segundo dia (*soluções f e g*)

- 16- lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min cada (Shaker);
- 17- lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 min cada (Shaker);
- 18- lavar durante 5min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Bloqueio (*solução h*)

- 19- incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;
- 20- lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Deteção de duas sondas “DOUBLE FISH”

OBS. montar o mix de anticorpos respeitando as concentrações do fabricante.

- 21- montar um mix contendo 994 µl NFDM + 1 µl de avidina FITC conjugada + 5 µl de anti digoxigenina rodamina conjugada.
- 22- incubar as lâminas com 100 µl cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- 23- lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);
- 24- desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

Montagem das lâminas com DAPI

- 25- Misturar 400 µl de antifading mais 1 µl de dapi (0,2 mg/mL);
- 26- Colocar 50 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

5. RESULTADOS

Os exemplares de *Bryconamericus stramineus* das cinco populações analisadas apresentaram número diplóide constante de $2n=52$ cromossomos. No entanto, foi identificada uma fórmula cariotípica diferenciada para cada localidade e a ocorrência de três diferentes números fundamentais; não ocorreram diferenças entre machos e fêmeas em quaisquer dos resultados obtidos com diferentes metodologias empregadas (Tabela 2).

5.1 População de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari (Município de Botucatu, SP).

Foram analisados 25 exemplares de *B. stramineus*, sendo 12 indivíduos machos, 11 indivíduos fêmeas e 2 de sexo indeterminado. Após a análise com a coloração convencional com Giemsa, foi constatado um número diplóide de $2n=52$ cromossomos e sua fórmula cariotípica é composta de 10 cromossomos do tipo metacêntrico, 18 cromossomos do tipo submetacêntrico, 12 cromossomos do tipo subtelocêntrico e 12 cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo o número fundamental (NF) igual a 92 (Figura 8, Tabela 2).

A análise da heterocromatina constitutiva, utilizando-se a técnica de bandamento C, evidenciou a presença de blocos heterocromáticos centroméricos e terminais distribuídos na maioria dos cromossomos do seu complemento cariotípico (Figura 9).

A análise das RONS, evidenciadas através da técnica de impregnação por nitrato de Prata, que marca apenas cístrons de DNAr ativos, ocorreu em dois cromossomos do tipo submetacêntrico, com marcações na posição terminal do braço curto (Figura 10).

A análise das regiões ricas em GC, através da técnica de coloração por fluorocromo CMA₃, foi evidenciou em algumas células a marcação em apenas um dos homólogos do par cromossômico portador das RONS, o que apresenta um maior sítio ribossomal. Entretanto, outras marcações menos evidentes estão presentes no complemento cariotípico (Figura11).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 18S para a localização dos genes ribossômicos, revelou dois cromossomos com marcações bem evidentes, corroborando os resultados da impregnação por nitrato de Prata (RONS) e pela coloração pelo fluorocromo CMA₃. Além disso, outros quatro cromossomos apresentaram marcações menos evidentes nesta população de *B. stramineus* (Figura12)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 5S mostrou a presença de dois cromossomos com marcações bem evidentes e a presença de um cromossomo com marcações mais fracas. (Figura 12).

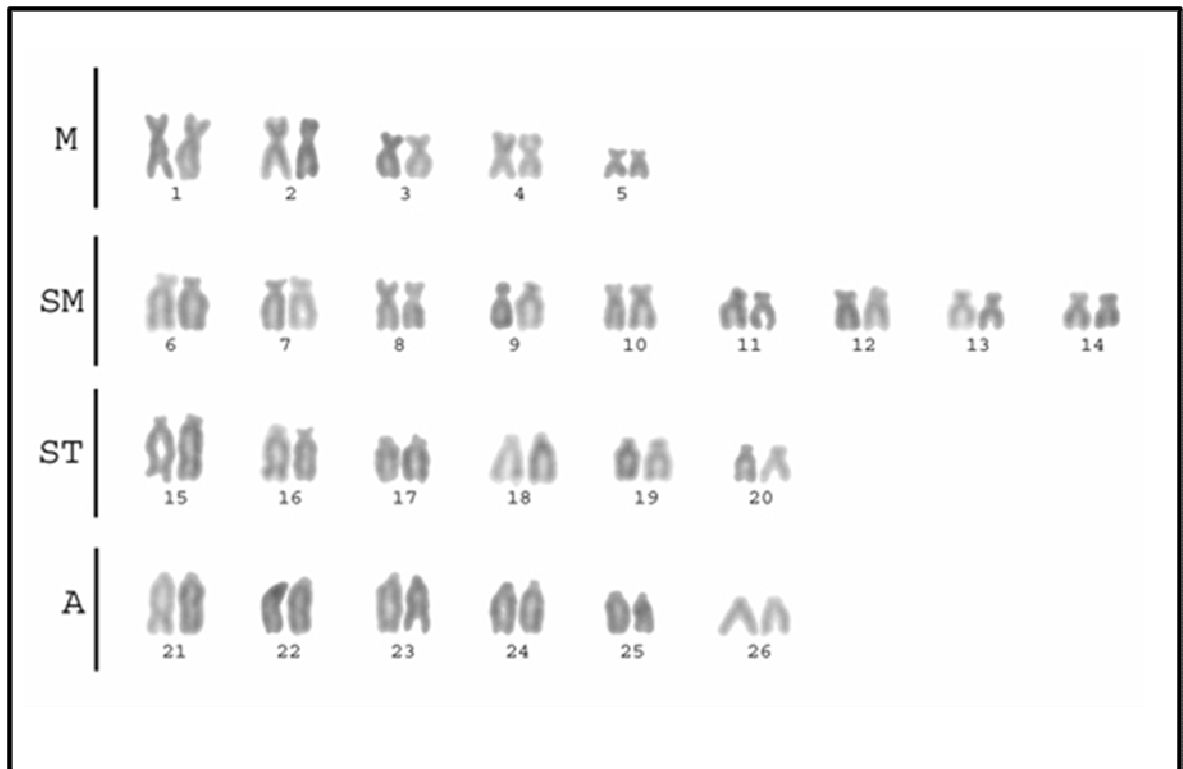


Figura 8 – Cariótipo de *B. stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Ribeirão Alambari.

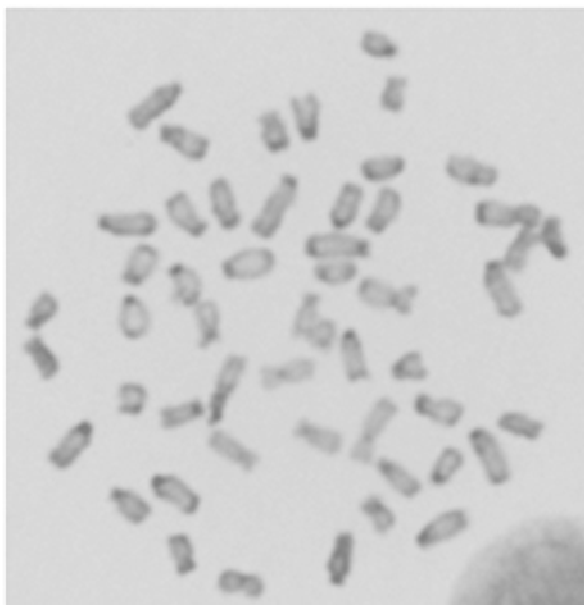


Figura 9 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas, nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos.

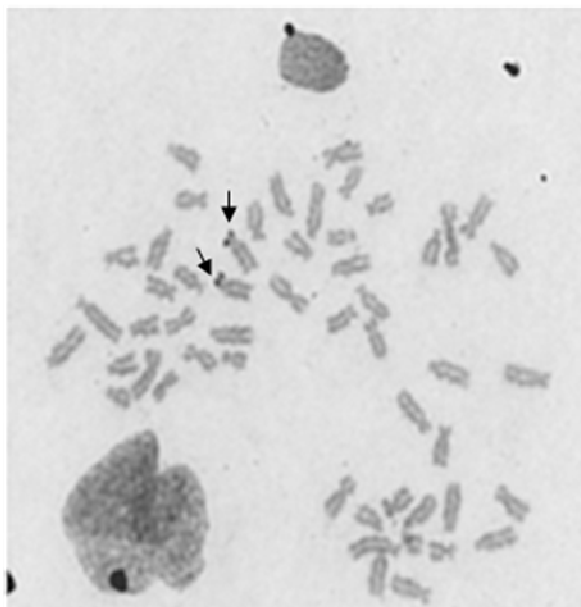


Figura 10 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, marcada com nitrato de prata. As setas evidenciam os cromossomos portadores das RONS.

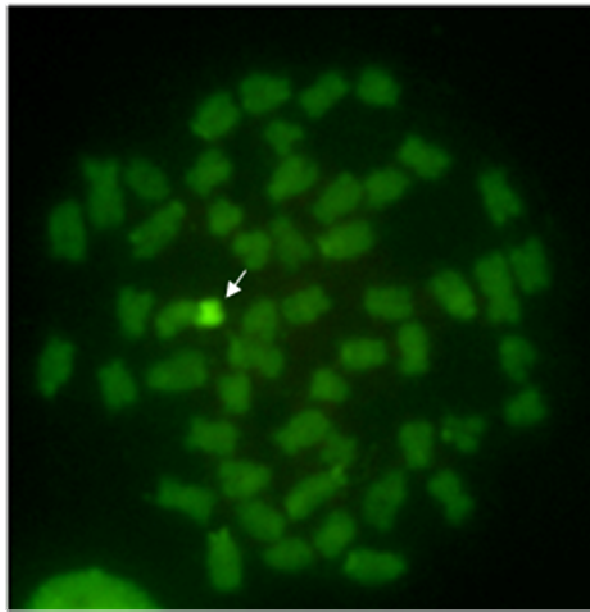


Figura 11 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). A seta indica as regiões mais fortemente marcadas, regiões ricas em pares de base GC.

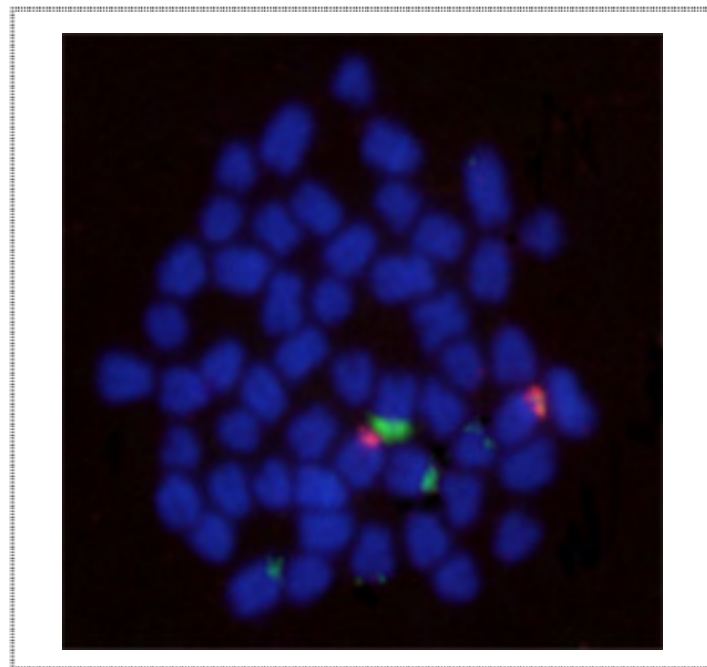


Figura 12 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde).

5.2 População de *Bryconamericus stramineus* do Córrego da Quinta (Município de Botucatu, SP).

Foram analisados 22 exemplares de *B. stramineus*, sendo 17 machos e 5 fêmeas. Após a análise com a coloração convencional com Giemsa, foi constatado que todos apresentaram número diplóide de $2n=52$ cromossomos. A fórmula cariotípica é composta de 14 cromossomos do tipo metacêntrico, 12 cromossomos do tipo submetacêntricos, 14 cromossomos do tipo subtelocêntrico e 12 cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo seu número fundamental (NF) igual a 92 (Figura 13, Tabela 2).

A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, evidenciou a presença de blocos heterocromáticos teloméricos, centroméricos e intersticiais distribuídos nos cromossomos do complemento cariotípico (Figura 14).

A análise das RONS, evidenciadas através da impregnação pelo nitrato de prata, revelou marcação evidente em três cromossomos do tipo submetacêntrico em um grande número de metáfases, indicando a ocorrência de um sistema do tipo de RONS múltiplas, com marcações na posição terminal do braço curto dos cromossomos (Figura 15).

A análise das regiões ricas em GC, através da coloração dos cromossomos com o fluorocromo CMA₃, evidenciou marcações coincidentes com as RONS nos respectivos cromossomos (Figura 16).

Através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 18S, para a localização dos genes ribossômicos, foram observados pelo menos três cromossomos com marcações bem evidentes e mais um

cromossomos com marcações menos evidentes nesta população de *B. stramineus* (Figura17).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 5S mostrou a presença de três cromossomos com marcações evidentes e a presença de um cromossomo com marcações mais fracas. (Figura 17).

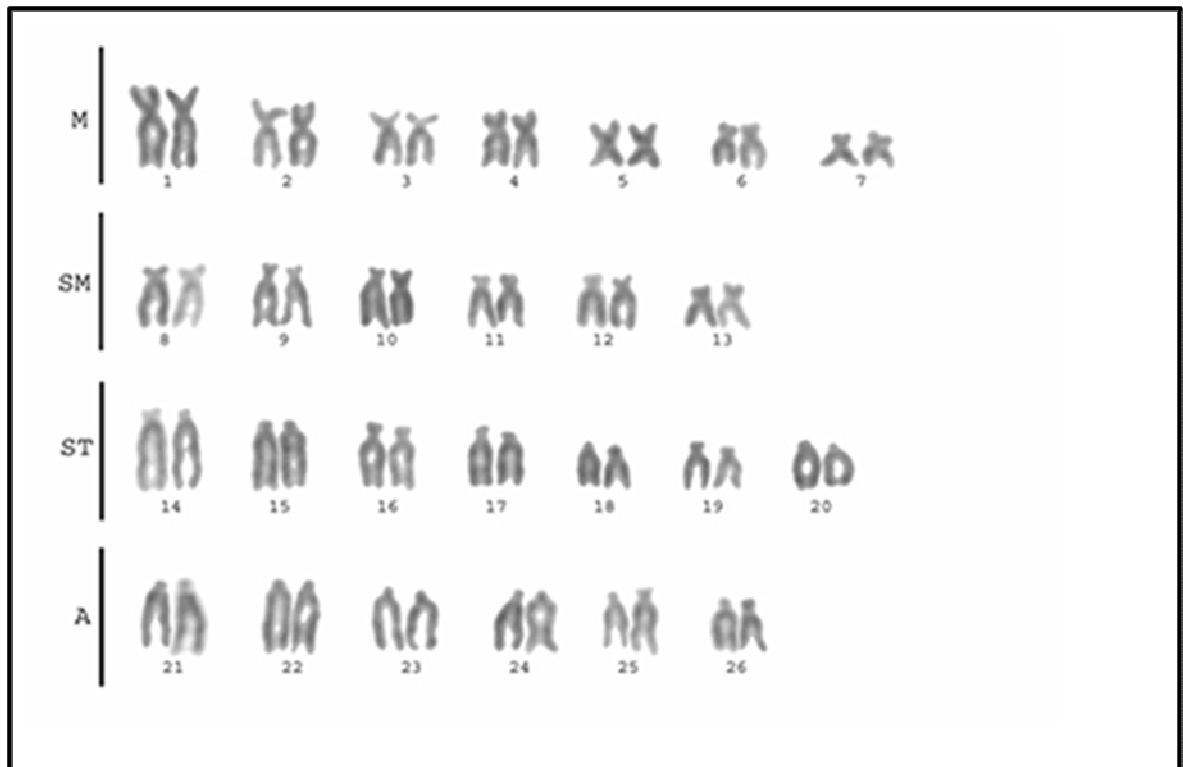


Figura 13 – Cariótipo de *B. stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Córrego da Quinta.

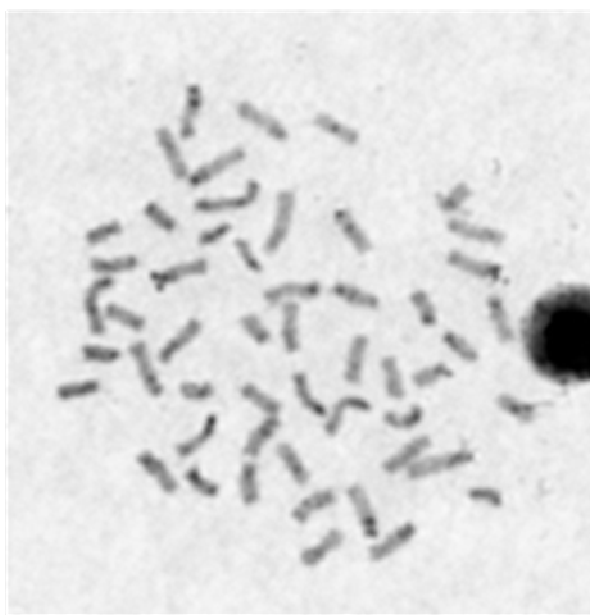


Figura 14 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego da Quinta, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas, centroméricas e intersticiais.

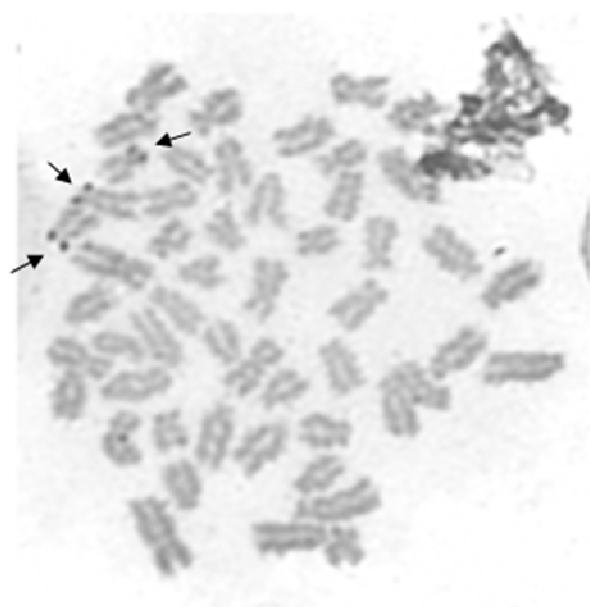


Figura 15 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego da Quinta, marcada com nitrato de prata. As setas evidenciam os cromossomos portadores das RONS.

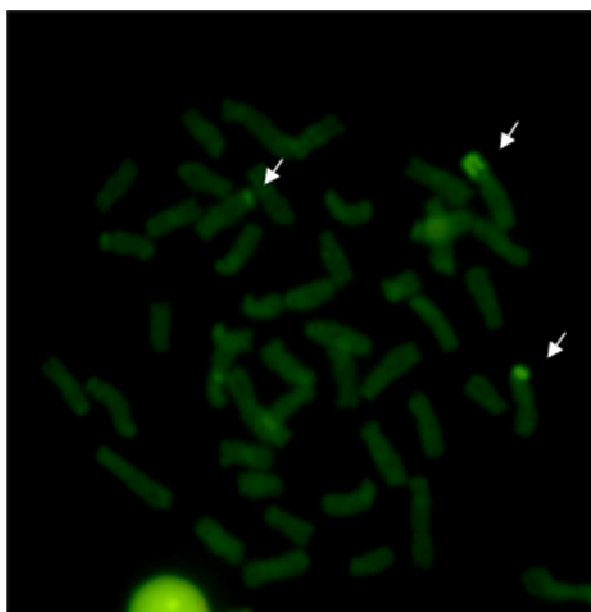


Figura 16 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego da Quinta, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). A seta indica as regiões mais fortemente marcadas, regiões ricas em pares de base GC.

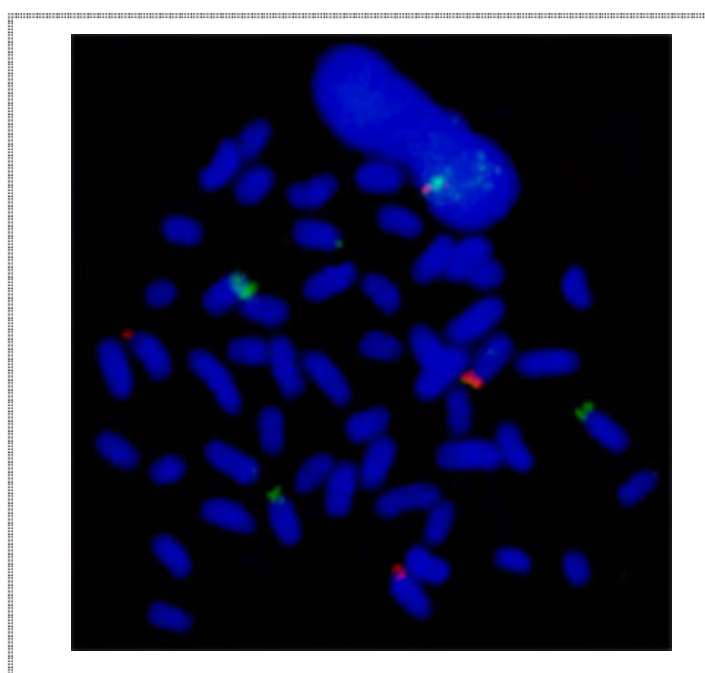


Figura 17 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego da Quinta, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde).

5.3 População de *Bryconamericus stramineus* do Córrego Jacutinga (Município de Bofete, SP).

Foram analisados 23 exemplares de *B. stramineus*, sendo 19 machos e 4 fêmeas. Após a análise com a coloração convencional com Giemsa, foi constatado que todos apresentaram um número diplóide $2n=52$ cromossomos. Sua fórmula cariotípica é composta de 12 cromossomos do tipo metacêntrico, 16 cromossomos do tipo submetacêntrico, 16 cromossomos do tipo subtelocêntrico e 8 cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo seu número fundamental (NF) igual a 96 (Figura 18, Tabela 2).

A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, evidenciou a presença de blocos heterocromáticos na maioria dos cromossomos. Blocos centroméricos, intersticiais e teloméricos também foram observados em alguns cromossomos do complemento cariotípico (Figura 19).

A análise das RONS, evidenciadas através da impregnação pelo nitrato de prata, ocorreu em dois cromossomos do tipo submetacêntrico, com as marcações localizadas na posição terminal do braço curto deste par cromossômico (Figura 20).

A análise das regiões ricas em GC, através da coloração dos cromossomos com o fluorocromo CMA₃, evidenciou marcações coincidentes com as RONS nos respectivos cromossomos (Figura 21).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 18S, para a localização dos genes ribossômicos, revelou dois cromossomos com marcações bem evidentes, corroborando os resultados da impregnação por nitrato de Prata (RONS) e pela coloração pelo fluorocromo CMA₃.

Além disso, mais um cromossomo apresentou marcações menos evidentes nesta população de *B. stramineus* (Figura 22)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 5S mostrou a presença de dois cromossomos com marcações bem evidentes e a presença de mais um cromossomo com marcação mais fraca. (Figura 22).

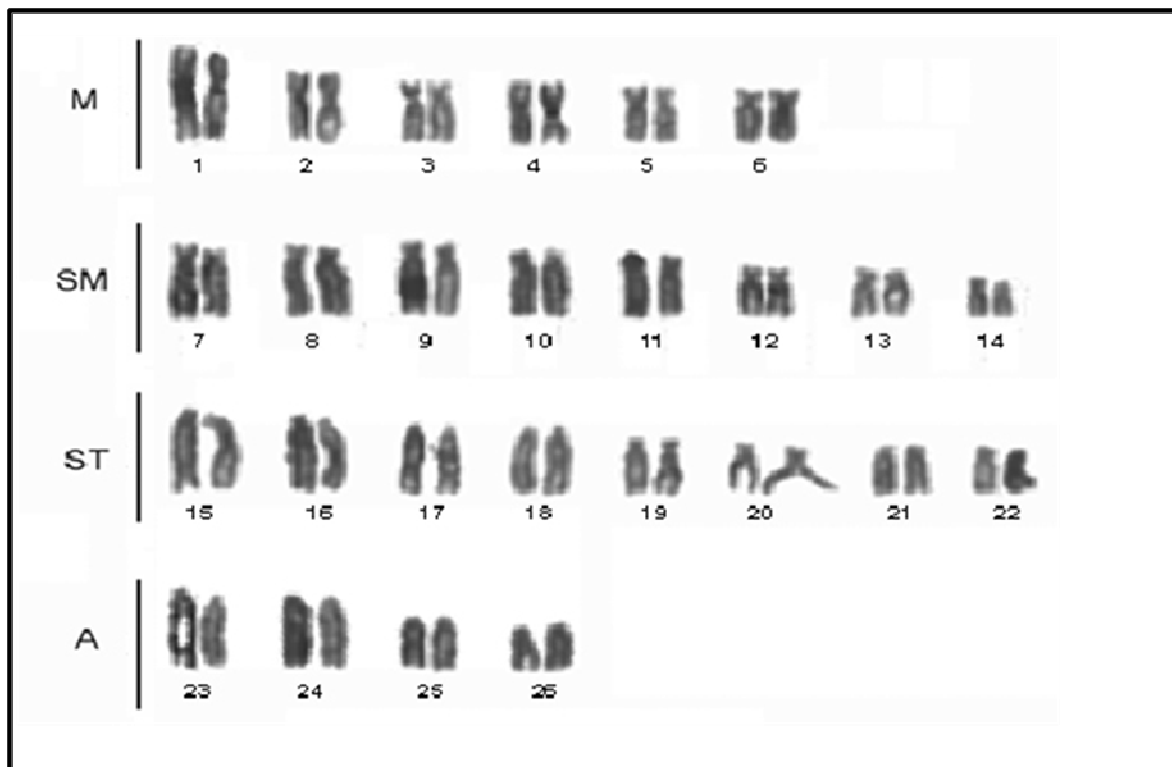


Figura 18 – Cariótipo de *B. stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Córrego Jacutinga.

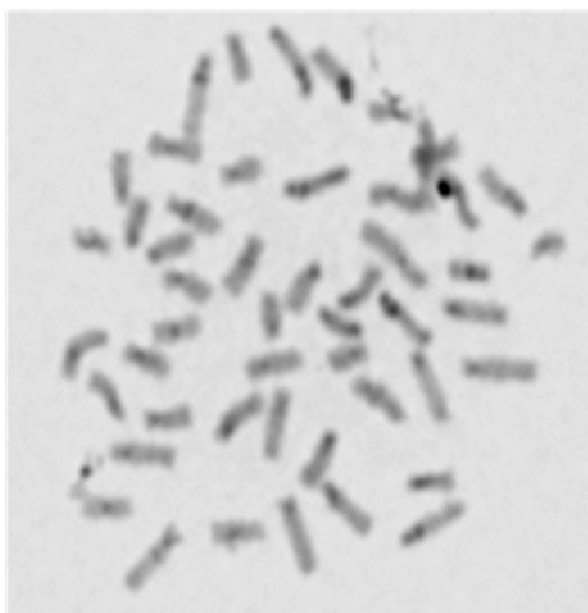


Figura 19 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego Jacutinga, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas, centroméricas e intersticiais.

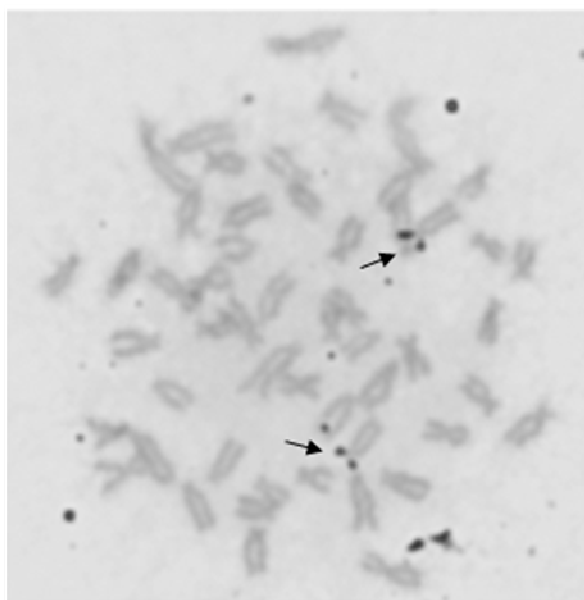


Figura 20 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego Jacutinga, marcada com nitrato de prata. As setas evidenciam os cromossomos portadores das RONS.

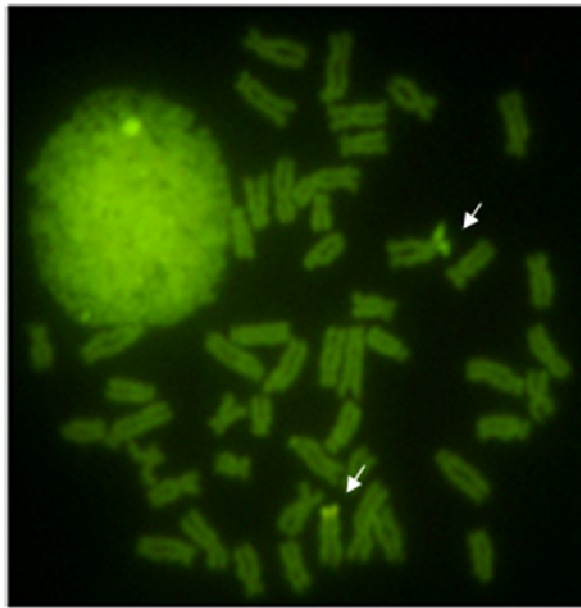


Figura 21 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego Jacutinga, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). A seta indica as regiões mais fortemente marcadas, regiões ricas em pares de base GC.

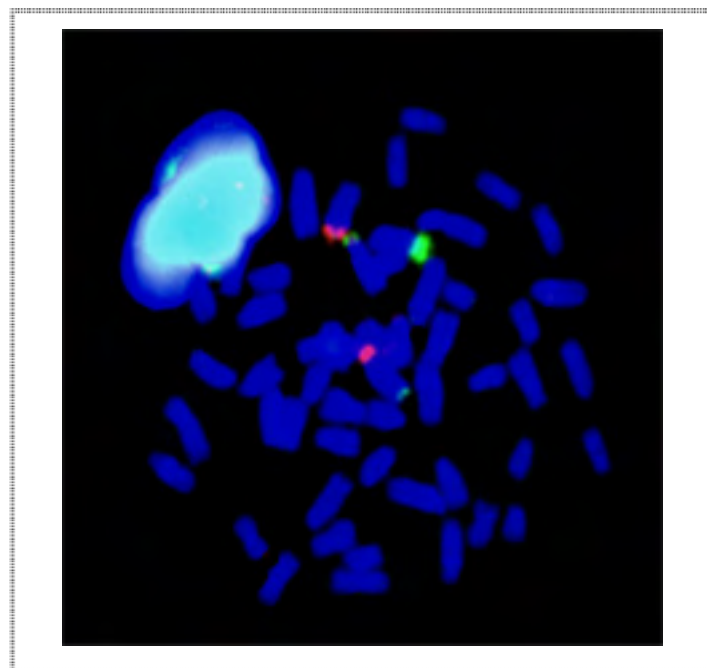


Figura 22 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Córrego Jacutinga, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde).

5.4 População de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Hortelã (Município de Botucatu, SP).

Foram analisados 17 exemplares de *B. stramineus*, sendo 5 machos e 12 fêmeas. Após a análise com a coloração convencional com Giemsa, foi constatado que todos apresentaram um número diplóide $2n=52$ cromossomos. A fórmula cariotípica é composta de 6 cromossomos do tipo metacêntrico, 12 cromossomos do tipo submetacêntrico, 14 cromossomos do tipo subtelocêntrico e 20 cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo seu número fundamental (NF) igual a 84 (Figura 23, Tabela 2).

A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, evidenciou a presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos distribuídos em alguns cromossomos do complemento cariotípico (Figura 24).

A análise das RONS, evidenciadas através da impregnação pelo nitrato de prata, ocorreu em dois cromossomos do tipo submetacêntrico, com as marcações na posição terminal do braço curto deste par cromossômico (Figura 25).

A análise das regiões ricas em GC, através da coloração dos cromossomos com o fluorocromo CMA₃, evidenciaram marcações coincidentes com as RONS nos respectivos cromossomos (Figura 26).

Através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 18S, para a localização dos genes ribossômicos, foi observado dois cromossomos com marcações bem evidentes corroborando com os resultados da impregnação por nitrato de Prata (RONS) e pela coloração pelo fluorocromo CMA₃. Além disso, mais um cromossomo apresentou marcações menos evidentes nesta população de *B. stramineus* (Figura 27).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 5S mostrou a presença de dois cromossomos com marcações bem evidentes e a presença de dois cromossomos com marcações mais fracas. (Figura 27).

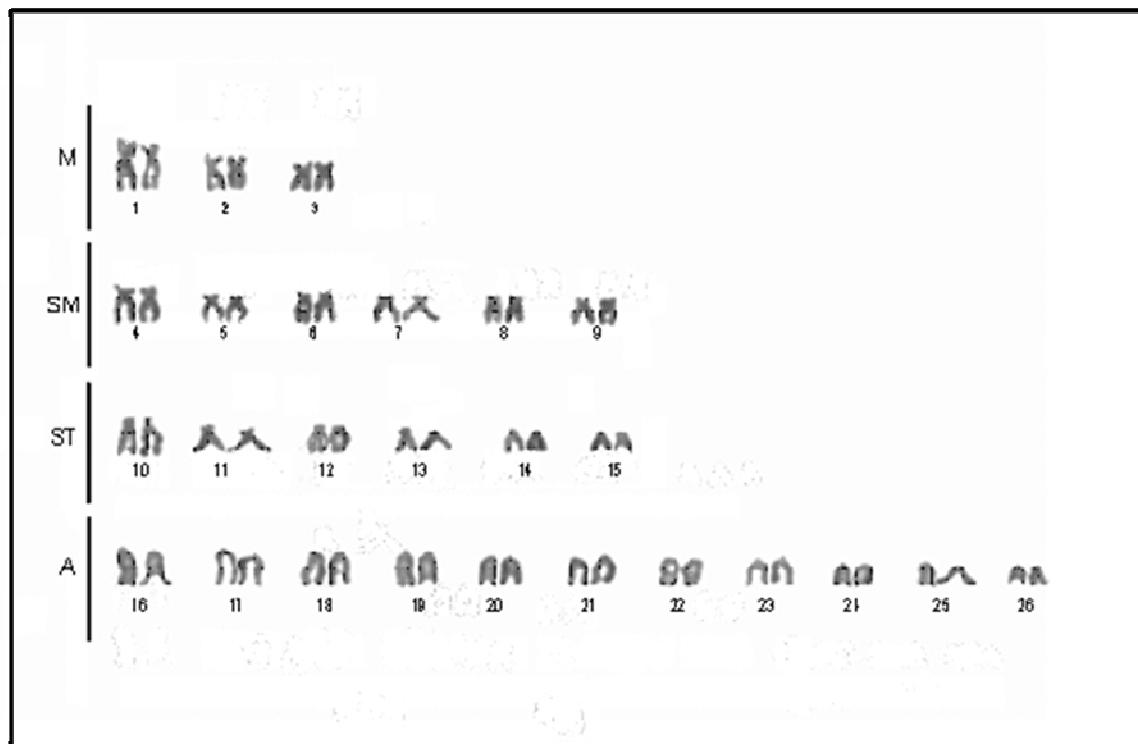


Figura 23 – Cariótipo de *B. stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Ribeirão Hortelã.

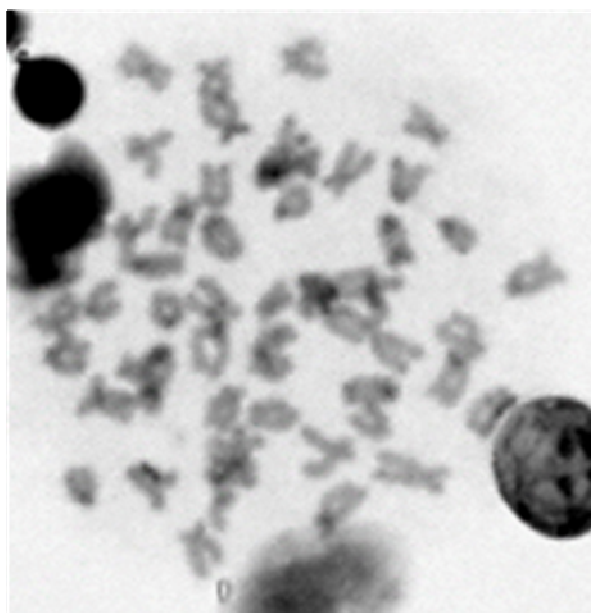


Figura 24 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Hortelã, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas e centroméricas.

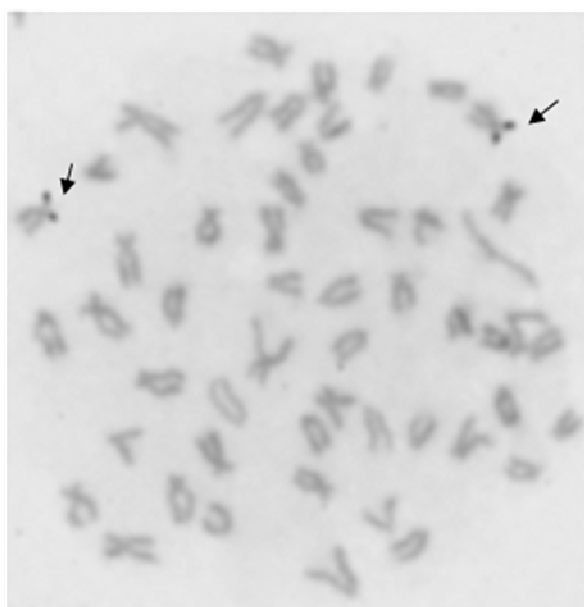


Figura 25 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Hortelã, marcada com nitrato de prata. As setas evidenciam os cromossomos portadores das RONS.

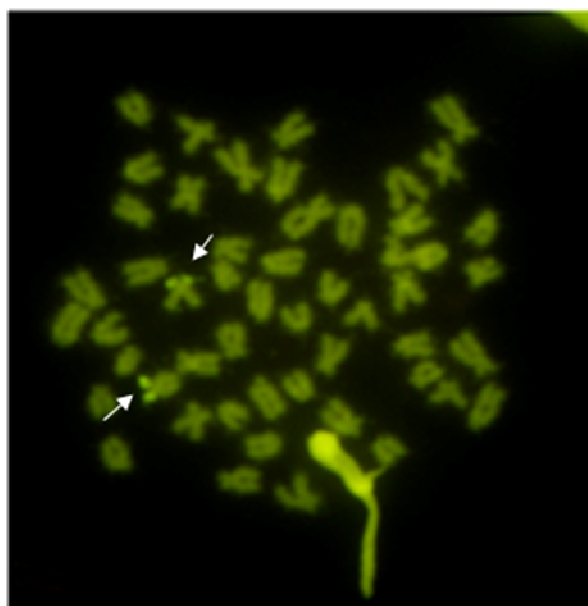


Figura 26 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Hortelã, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA₃). A seta indica as regiões mais fortemente marcadas, regiões ricas em pares de base GC.

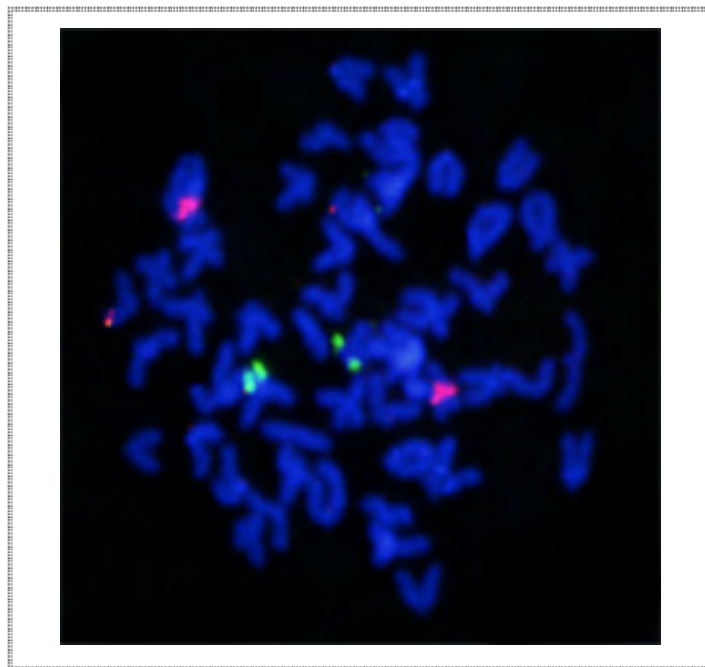


Figura 27 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Hortelã, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde).

5.5 População de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás (Município de Itatinga, SP).

Foram analisados 26 exemplares de *B. stramineus*, sendo 23 machos e 3 fêmeas. Após a análise com a coloração convencional com Giemsa, foi constatado que todos apresentaram um número diplóide $2n=52$ cromossomos. A fórmula cariotípica é composta de 6 cromossomos do tipo metacêntrico, 10 cromossomos do tipo submetacêntrico, 28 cromossomos do tipo subtelocêntrico e 8 cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo seu número fundamental (NF) igual a 104 (Figura 28, Tabela 2).

A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, evidenciou a presença de blocos heterocromáticos centroméricos, intersticiais e teloméricos distribuídos em alguns cromossomos do complemento cariotípico (Figura 29).

A análise das RONS, evidenciadas através da impregnação pelo nitrato de prata, ocorreu freqüentemente em três cromossomos do tipo submetacêntrico, evidenciando a ocorrência de RONS múltiplas, com as marcações ocorrendo na posição terminal do braço curto dos cromossomos (Figura 30).

O tratamento dos cromossomos com o fluorocromo CMA₃, analisando a distribuição de regiões ricas em GC, evidenciou marcações brilhantes em apenas dois cromossomos submetacêntricos, provavelmente coincidindo com os portadores da Ag-RONS, que apresentam sítios ribossomais maiores (Figura 31).

A utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 18S, para a localização dos genes ribossômicos, revelou dois cromossomos com marcações bem evidentes, corroborando os resultados da coloração pelo fluorocromo CMA₃ nesta população de *B. stramineus* (Figura 32).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de DNAr 5S mostrou a presença de três cromossomos com marcações bem evidentes e a presença de dois cromossomo com marcações mais fracas. (Figura 32).

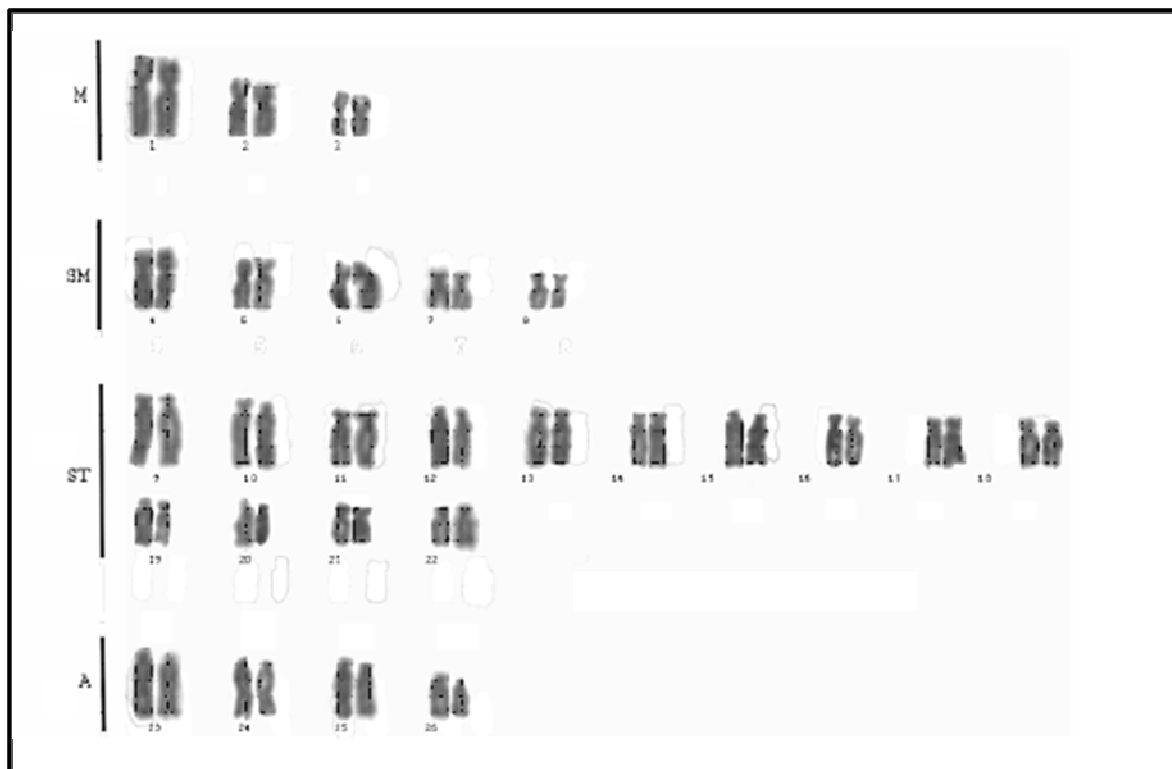


Figura 28 – Cariótipo de *B. stramineus* com coloração convencional por Giemsa ($2n=52$ cromossomos), de exemplar do Recanto dos Cambarás.

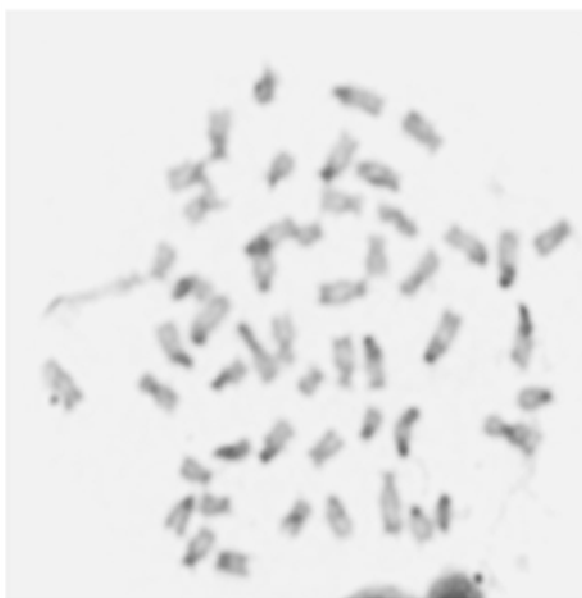


Figura 29 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás, submetida ao Bandamento C, evidenciando as regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas, centroméricas e intersticiais.

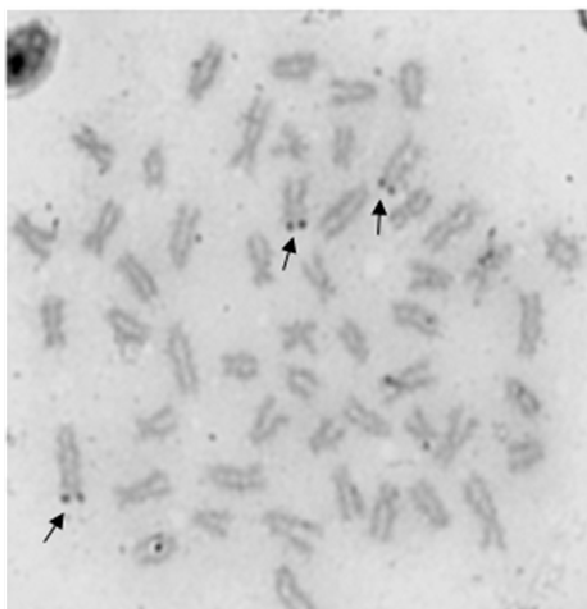


Figura 30 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás, marcada com nitrato de prata. As setas evidenciam os cromossomos portadores das RONS.

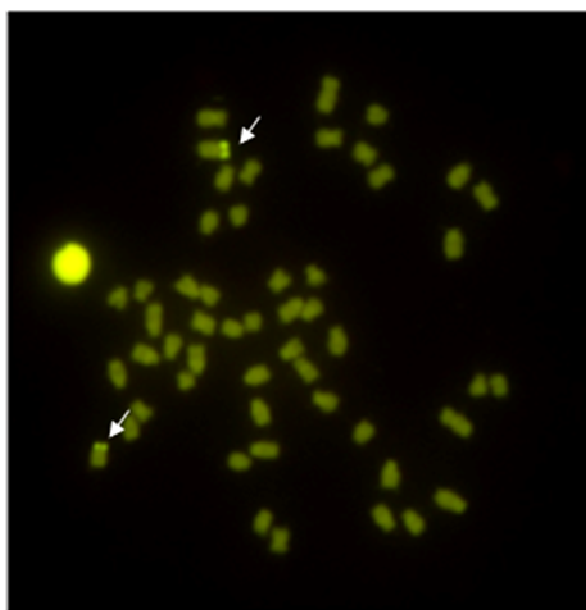


Figura 31 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA_3). A seta indica as regiões mais fortemente marcadas, regiões ricas em pares de base GC.

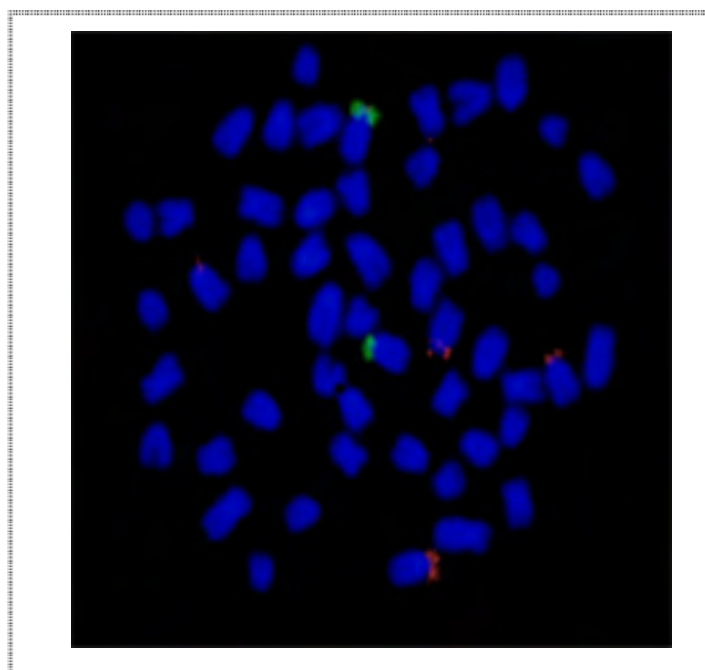


Figura 32 – Metáfase somática de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação vermelha) e 18S (marcação verde).

Tabela 2: Número diplóide, fórmula cariotípica e número fundamental dos exemplares de *Bryconamericus stramineus* proveniente de populações encontradas nos componentes hidrográficos das bacias do Rio Tietê e Rio Paranapanema.

	Bacia do Rio Tietê			Bacia do Rio Paranapanema	
	<i>Ribeirão Alamabari</i>	<i>Córrego da Quinta</i>	<i>Córrego Jacutinga</i>	<i>Ribeirão Hortelã</i>	<i>Recanto dos Cambarás</i>
Número Diplóide	52	52	52	52	52
Fórmula Cariotípica	10M+18SM+12ST+12A	14M+12SM+14ST+12A	12M+16SM+16ST+8A	6M+12SM+14ST+20A	6M+10SM+28ST+8A
Número Fundamental	92	92	96	84	96
Fórmula cariotípica: número de cromossomos por classe					

6. DISCUSSÃO

Citogeneticamente, as espécies de Characidae são bastante diversificadas. Apresentam variações quanto ao número diplóide (MORELLI, BERTOLLO e MOREIRA-FILHO, 1983; OLIVEIRA *et al.*, 1988a; PORTELLA, GALETTI Jr. e BERTOLLO, 1988; AREFJEV, 1990), distribuição de heterocromatina constitutiva (SOUZA, MOREIRA-FILHO e GALETTI Jr., 1996; MANTOVANI *et al.*, 2000, MANTOVANI *et al.*, 2004), localização, número e tamanho das regiões organizadoras de nucléolos (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO e GALETTI Jr., 1984; GALETTI Jr., 1998), presença de cromossomos supranumerários (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001), cromossomos sexuais (ARTONI e BERTOLLO, 2002) diplocromossomos (SOUZA, MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1995) e poliploidia (FAUAZ, VICENTE e MOREIRA-FILHO, 1994). Entretanto, são poucos os casos de polimorfismo cromossômico estrutural relatado para representantes desta família (CENTOFANTE, PORTO e FELDBERG, 2002; PACHECO, GIULIANO-CAETANO e DIAS, 2001).

O número diplóide $2n=52$ cromossomos é um dos mais freqüentes no gênero *Bryconamericus* - exceto para indivíduos de uma população estudada por WASKO & GALETTI (1998) que apresenta $2n=54$ cromossomos - sendo descrito por diversos autores e apresentando fórmula cariotípica muito variável (Tabela 3). Um complemento cromossômico de $2n= 52$ cromossomos é muito comum entre as espécies da família Characidae (OLIVEIRA *et al.* 1988a; FALCÃO, 1988; AREFJEV, 1990) incluindo algumas outras espécies de *Incertae sedis*, como *Piabina argentea* (MOREIRA-FILHO, *et al.*, 1978; PORTELLA, *et al.*, 1988; WASKO, 1996), *Hemigramus aff. Schmardae* e *Hyphessobrycon stictus* (SCHELL e CRISTENSEN, 1970). No presente trabalho, os cariótipos analisados de

Bryconamericus mantiveram-se conservativos quanto ao número, sendo encontrado um número diplóide $2n=52$ cromossomos para todos os exemplares analisados, nas cinco populações desta espécie, em duas Bacias Hidrográficas, corroborando os resultados descritos para a espécie e para o gênero. WASKO E GALETTI JR. (1998) acreditam que um cariótipo de $2n=52$ cromossomos seja uma característica primitiva em *Bryconamericus*.

Nas populações analisadas, cinco citótipos diferentes foram encontrados, distintos dos já descritos para a espécie, apresentando uma pequena variação para o gênero, porém com valores muito próximos aos já encontrados, comprovando assim a alta variabilidade cariotípica descrita para o gênero *Bryconamericus* (Tabela 3). Contudo, pequenas diferenças envolvendo a estrutura cariotípica em peixes que apresentam quatro tipos de cromossomos (m, sm, st, a) podem, algumas vezes, ser atribuídas a desvios na medida dos cromossomos no momento da montagem dos cariótipos, visto que muitos cromossomos encontram-se no limite entre um tipo e outro, segundo a classificação de LEVAN *et al.* (1964).

O número fundamental (NF) neste gênero varia de 84 a 102 (PORTELA *et al.*, 1988; WASKO *et al.*, 1996; WASKO E GALETTI JR., 1998; PAINTNER-MARQUES *et al.*, 2002a, 2003; PORTELA-CASTRO *et al.*, 2007; CAPISTANO *et al.*, 2008). Neste trabalho, os exemplares de uma das localidades apresentaram um número fundamental NF=84, resultado este igual ao descrito por WASKO *et al.* (1996) nesta espécie; duas localidades apresentaram o número fundamental NF=92 e em outras duas o número fundamental foi NF=96, corroborando os resultados da literatura (Tabela 3). As diferenças na estrutura cariotípica podem ter sido evidenciadas principalmente por divergências no número de cromossomos acrocêntricos. Variações do número fundamental (FN) podem ser resultados de

rearranjos cromossômicos, principalmente dos tipos translocações e inversões pericêntricas, que podem ser considerados como mecanismo importante de diversificação e evolução cariotípica neste grupo de peixes (WASKO *et al.*, 1996; WASKO E GALETTI JR., 1998). Contudo, DENTON (1973) e KIRPICHNIKOV (1973) sugerem que as inversões pericêntricas são um dos principais tipos de mecanismos responsáveis pela evolução cariotípica em peixes.

Tabela 3: Dados citogenéticos comparativos no gênero *Bryconamericus* em diferentes localidades do Brasil, dispostos em ordem crescente de número fundamental (NF).

Espécies	Localidades Rios (estados)	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Referência
<i>B. stramineus</i>	Ribeirão Hortelã (SP)	52	84	6M+12SM+14ST+20A	presente estudo
<i>B. stramineus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	52	84	6M+10SM+16ST+20A	WASKO <i>et al.</i> (1996)
<i>B. aff. exodon</i> - cit. I ^a	Riacho Três Bocas (PR)	52	86	16M+12SM+6ST+18A	PAINTNER-MARQUES <i>et al.</i> (2002a)
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Rio Piracicaba (SP)	52	88	6M+10SM+16ST+20A	WASKO and GALETTI (1998)
<i>B. aff. Iheringii</i> - cit. III ^a	Riacho Tatupeba	52	88	8M+20SM+8ST+16A	CAPISTANO, <i>et al.</i> (2008)
<i>B. aff. Iheringii</i> - cit. I ^a	Rio Keller (PR)	52	90	12M+18SM+8ST+14A	PORTELA-CASTRO <i>et al.</i> (2007)
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Riacho Três Bocas (PR)	52	90	6M+18SM+14ST+14A	WASKO and GALETTI (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Riacho Avoadeira (MT)	52	90	8M+14SM+16ST+14A	WASKO and GALETTI (1998)
<i>B. aff. Iheringii</i> - cit. I ^a	Córrego Maringá (PR)	52	90	12M+18SM+8ST+14A	CAPISTANO, <i>et al.</i> (2008)
<i>B. stramineus</i>	Córrego da Quinta (SP)	52	92	14M+12SM+14ST+12A	presente estudo
<i>B. stramineus</i>	Ribeirão Alambari (SP)	52	92	10M+18SM+12ST+12A	presente estudo
<i>B. aff. exodon</i> - cit. II ^a	Riacho Três Bocas (PR)	52	92	10M+24SM+6ST+12A	PAINTNER-MARQUES <i>et al.</i> (2002a)
<i>B. aff. Iheringii</i>	Rio Água da Floresta (PR)	52	92	8M+22SM+10ST+12A	PAINTNER-MARQUES <i>et al.</i> (2003)
<i>B. aff. Iheringii</i> - cit. II ^a	Rio Keller (PR)	52	94	8M+28SM+6ST+10A	PORTELA-CASTRO <i>et al.</i> (2007)
<i>Bryconamericus</i> sp. A	Rio Piracicaba (SP)	52	94	6M+30SM+6ST+10A	WASKO and GALETTI (1998)
<i>B. stramineus</i>	Córrego Jacutinga (SP)	52	96	12M+16SM+16ST+8A	presente estudo
<i>B. stramineus</i>	Recanto dos Cambarás (SP)	52	96	6M+10SM+28ST+8A	presente estudo
<i>B. ornateps</i>	Rio Suruí, Roncador (RJ)	52	98	32M-SM+14ST+6A	MELO <i>et al.</i> (1999)
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Riacho Avoadeira (MT)	54	102	10M+16SM+22ST+6A	WASKO and GALETTI (1998)

O bandamento C tem sido amplamente utilizado em estudos citogenéticos de peixes (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1996; MARGARIDO e GALETTI JR., 1999; MANTOVANI *et al.*, 2004; entre outros). O padrão de distribuição da

heterocromatina constitutiva ao longo dos cromossomos tem sido utilizado para a identificação de polimorfismos cromossômicos (MOLINA, 1995), para a identificação de cromossomos sexuais (GALETTI & FORESTI, 1986; ANDREATA *et al.*, 1992; entre outros) e para caracterizar espécies ou grupos de espécies (GALETTI *et al.*, 1991; MARGARIDO & GALETTI, 1996, entre outros).

Entre os peixes, há uma tendência para a presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1981; GOLD *et al.*, 1986; GARCIA *et al.*, 1987; FORESTI *et al.*, 1989). DERGAN & BERTOLLO (1990) indicam que há uma predominância de Bandas C pericentroméricas entre os Characiformes. Entretanto, FORESTI *et al.* (1989) afirmam que, no caso da família Characidae, não existem evidências que indiquem uma tendência a uma localização específica de Bandas C para as espécies deste grupo. A espécie *Astyanax scabripinnis*, por exemplo, tem uma predominância de bandas heterocromáticas teloméricas (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MAISTRO *et al.*, 1992), enquanto que em *Moenkhausia santafilomenae* a heterocromatina intersticial está presente em vários cromossomos.

Através da técnica de bandeamento C, fazendo-se a análise da heterocromatina constitutiva em *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, Córrego da Quinta, Córrego Jacutinga, Ribeirão Hortelã e Recanto dos Cambarás foi constatada a presença de um padrão de blocos heterocromáticos preferencialmente em regiões centroméricas e teloméricas em diferentes cromossomos do complemento cariotípico. Foi observada também a presença de alguns pequenos blocos heterocromáticos intersticiais e a presença de blocos maiores de heterocromatina nas regiões teloméricas, estas associadas às regiões das RONS. Os resultados mostram que os exemplares de todas as localidades

analisadas mantiveram um mesmo padrão, uma mesma tendência na distribuição da heterocromatina, não existindo grandes diferenças na quantidade de heterocromatina sendo assim. Tais características corroboram com os resultados descritos por outros autores para o gênero.

A distribuição da heterocromatina constitutiva é variável nas espécies de *Bryconamericus* e parece não ter uma tendência geral quanto à sua localização. Sendo assim, cada espécie pode ser caracterizada por um determinado padrão de Banda C, de acordo com WASKO e GALETTI (1998). Em 1996, WASKO e colaboradores em estudos realizados em duas populações de *Bryconamericus*, observou em ambas a presença de blocos de heterocromatina preferencialmente localizados nas regiões de centrômero e telômero dos cromossomos, além de pequenos blocos intersticiais e também grandes blocos de heterocromatina associados às NORs, principalmente aqueles detectados no par 21 de *Bryconamericus* sp A e no par 13 de *Bryconamericus* sp B.

WASKO e GALETTI JR. (1998), observaram blocos heterocromáticos nas regiões intersticial, telomérica e centromérica dos cromossomos de cinco populações de *Bryconamericus* spp.; *Bryconamericus* sp A tinha uma grande quantidade de heterocromatina no braço curto dos pares 4, 6 e 9; *Bryconamericus* sp. B mostrou blocos heterocromáticos pericentroméricos nos pares 10, 11, 13, 20, 21 e 24; *Bryconamericus* sp. C apresentou heterocromatina telomérica no braço curto dos pares 9 e 16; *Bryconamericus* sp. D mostrou heterocromatina centromérica e telomérica e *Bryconamericus* sp. E mostrou grandes blocos de heterocromatina nos pares 1, 2, 8 e 14, parecendo envolver todo o braço destes. Em estudos realizados por PORTELLA-CASTRO (1999) *Bryconamericus aff. Iheringii*, citótipos 1 e 2, e *Bryconamericus* spp. da bacia do Rio Ivaí (PR), blocos

heterocromáticos estão restritos as regiões centroméricas de praticamente todos os cromossomos e também sobre braços curtos de pares correspondentes àqueles com marcação de RONS. No rio Água da Floresta, parte da bacia do Rio Tibagi (PR), PAINTNER-MARQUES *et al.* (2003) observou em *Bryconamericus aff. Iheringii*, blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas e teloméricas na maioria dos cromossomos e também fortes marcações nas regiões teloméricas dos pares 16, 17, 18, 19 e 20, todos subtelocêntricos, que podem ser considerados marcadores heterocromáticos nesta espécie. Em estudos realizados por PORTELLA-CASTRO *et al.* (2007) em *Bryconamericus aff. Iheringii* do Rio Keller (afluente do Rio Ivaí – PR), a heterocromatina constitutiva foi detectada na região pericentromérica e telomérica da maior parte dos cromossomos dos dois citótipos descritos nessa população, no entanto, os pares 2, 9 e 12 do citótipo I e os pares 6, 7, e 11 do citótipo II, apresentam blocos heterocromáticos teloméricos, o que permite a identificação de cada cariótipo.

Entre os peixes, uma correspondência entre as RONS e sítios de Banda C positivos é relativamente comum (GALETTI JR. e RASH, 1993b; SOUZA, MOREIRA-FILHO e GALETTI JR, 1996). Para MOREIRA-FILHO, BERTOLLO e GALETTI (1984) a presença de heterocromatina na região de RONS poderia ter influência nos rearranjos cromossômicos nestas regiões, podendo facilitar o acúmulo desses *loci* (FUJIWARA *et al.*, 1998).

Todos os indivíduos aqui analisados parecem apresentar RONS coincidentes com regiões heterocromáticas. Geralmente, em peixes, as RONS estão associadas a regiões heterocromáticas, ou seja, a regiões Banda C – positivas, ao contrário do que ocorre em mamíferos (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1981). Segmentos heterocromáticos coincidentes com as RONS, já foram relatados

em *Apareiodon piracicabae* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984), *Leporinus* (GALETTI *et al.*, 1991) e diversas espécies de *Brycon* (MARGARIDO & GALETTI, 1996). Esta situação de congruência das RONS e das regiões de heterocromatina mostra um aparente antagonismo, ou seja, uma região altamente ativa (RON), associada a segmentos que apresentam comportamento de uma região inativa (heterocromatina). Talvez a metodologia empregada para a detecção de regiões de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolos não forneça nitidez suficiente para demonstrar que na realidade tais regiões não são coincidentes, mas sim adjacentes ou intercaladas (WASKO, 1996). Situação similar também foi detectada em diferentes espécies de Anura (SCHMID, 1978 e 1980; KING, 1980).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONS) podem constituir excelentes marcadores citotaxonômicos, podendo inclusive ser utilizadas para formular hipóteses filogenéticas. Em peixes, o número e/ou a localização das RONS foram descritos para 231 espécies. Destas, 164 (71%) apresentaram RONS simples, 35 (15%) apresentaram 2 pares de cromossomos nucleolares e 32 (14%) apresentaram mais de 2 pares de cromossomos portadores de RONS (OLIVEIRA & FORESTI, 1994).

Algumas subfamílias de Characidae podem ser caracterizadas por apresentarem RONS simples, como Bryconinae (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1996; MARGARIDO e GALETTI JR., 1996) ou múltiplas como Serrasalminae (GALETTI JR., SILVA e CERMINARO, 1985b). Outros grupos podem apresentar tanto RONS simples como múltiplas, como é o caso de *Astyanax*. Para este gênero, tem sido descrito a presença de RONS simples ou múltiplas com até 15 cromossomos marcados (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993).

Nas populações de *Bryconamericus stramineus* estudadas neste trabalho, foi identificada a presença de RONS simples e múltiplas. A primeira RON simples encontrada no gênero *Bryconamericus* foi observada em uma população de *Bryconamericus aff. Iheringii* do rio Água da Floresta, bacia do rio Tibagi (PR), na qual foram identificadas RONS em regiões teloméricas sobre o braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos grandes, em estudos realizados por PAINTNER-MARQUES *et al.* (2003). Mais recentemente, CAPISTANO *et al.* (2008) estudando a população do riacho Tatupeba (PR) revelou também um padrão de RONS simples, marcando apenas um par de cromossomos submetacêntricos. Embora seja rara a presença de RONS simples neste gênero, nos exemplares analisados das populações do Ribeirão Alambari, Córrego Jacutinga e Ribeirão Hortelã foram também observadas RONS simples, encontradas na região telomérica sobre o braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos grandes, corroborando assim com resultados existentes para este gênero. RONS simples são observadas em outros gêneros da subfamília *Incertae sedis*, como *Moenkausia* (PORTELA, GALETTI E BERTOLLO, 1988), *Gymnocorymbus* (ALBERDI e FERNOCCHIO, 1997); para a sub-família *Bryconinae*, também é descrita a ocorrência de RONS simples (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1996; MARGARIDO; GALETTI JR., 1996). Na espécie *Orthospinus franciscensis*, RONS simples foram descritas por PFISTER, MOREIRA-FILHO e BERTOLLO (1997).

Entre os mamíferos, os cariótipos com um único par de RONS podem ser considerados como sendo ancestrais em relação aos cariótipos com múltiplas RONS (HSU *et al.*, 1975). Considerando-se estas características e tomando-se estes dados como verdadeiros também para peixes, as populações do Ribeirão Alambari, Córrego Jacutinga e Ribeirão Hortelã podem ser considerados

ancestrais, com relação às regiões organizadoras de nucléolos, quando comparadas a outras populações do gênero e às outras duas populações de *B. stramineus* analisadas no presente estudo (Córrego da Quinta e do Recanto dos Cambarás), que apresentam RONS múltiplas e seriam assim consideradas mais recentes.

A presença de um sistema de RONS múltiplas é a condição mais freqüente encontrada no gênero *Bryconamericus*, sendo descrita por vários autores. Em estudos realizados por WASKO e GALETTI JR. (1999) em quatro espécies de *Bryconamericus*, duas pertencentes ao rio Piracicaba (SP), uma população do córrego Três Bocas (PR) e outra população do córrego Avoadeiras (MT), observou-se nove fenótipos diferentes, baseados sobre o número e a localização das RONS. Não há um fenótipo de RONS comum partilhada pelas quatro espécies mas, a ocorrência de um fenótipo denominado 3p (NOR no braço curto de um acrocêntrico médio) detectado em *Bryconamericus* sp. B, *Bryconamericus* sp.C e *Bryconamericus* sp.D, indicando que esta poderia ser uma posição ancestral que figura entre estes peixes. PORTELLA–CASTRO (1999), analisou três espécies de *Bryconamericus* da bacia hidrográfica do rio Ivaí (PR) e observou uma variação de dois a quatro cromossomos nucleolares. PAINTNER-MARQUES *et al.* (2002b) realizou estudos em *Bryconamericus* aff. *exodon* coletados no córrego Três Bocas (PR) e relatou a ocorrência de dois a cinco cromossomos nucleolares nesta população. Em estudos realizados por CAPISTANO *et al.* (2008) em populações de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do córrego Maringá (PR) e do rio Keller (PR), ambas apresentaram dois a quatro cromossomos marcados pelo nitrato de prata.

Nas populações de *Bryconamericus stramineus* do Recanto dos Cambarás e do Córrego da Quinta, através da técnica de impregnação por nitrato de prata

ficou evidente a marcação de três cromossomos do tipo submetacêntrico na maioria das metáfases analisadas, estando as RONS presentes na posição terminal do braço curto destes cromossomos, e enquadrando estas duas populações no grupo de peixes que apresentam múltiplas RONS (GALETTI *et al.*, 1985a; ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1985).

Variações no número de cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos são comuns também em outros peixes da subfamília *Incertae Sedis*. Em estudos realizados por PORTELLA *et al.* (1988), *Piabina argentea* apresentou de um a quatro cromossomos com RONS; MORELLI (1981), estudando a espécie *Astyanax* (*A. bimaculatus*, *A. fasciatus* e *A. schubarti*) detectou de três a seis cromossomos portadores de RONS e *Astyanax scabripinis* (SOUZA & MOREIRA-FILHO, 1992; ROCON-STANGE & ALMEIDA-TOLEDO, 1993) também apresenta mais de um par de cromossomos nucleolares. Em outros Characidae, como em Cynopotaminae (FALCÃO & BERTOLLO, 1985), Triporteinae (FALCÃO, 1988; BERTOLLO & CAVALLARO, 1992) e Serrasalminae (GALETTI *et al.*, 1985b; CESTARI & GALETTI, 1992a, b; MARTINS-SANTOS *et al.*, 1994; CESTARI, 1996) também foram detectadas RONS múltiplas. Outra espécie de Characidae, pertencente à subfamília Tetragonopterinae, *Tetragonopterus chalceus* (PORTELLA *et al.*, 1988) também apresenta mais de um par de cromossomos portadores de RONS.

A localização dos sítios das RONS pela coloração com nitrato de prata não pode, contudo, ser considerada como uma identificação definitiva, uma vez que só identifica os sítios que estiverem funcionalmente ativos na interfase anterior (GOODPASTURE & BLOOM, 1975; MILLER *et al.*, 1976; HOWELL, 1977; HOWELL & BLACK, 1980), tal fato se deve ao fato deste composto combinar-se às

proteínas ácidas presentes ao redor dos genes ribossômicos e não com o próprio DNAr (HOWELL, 1977). Entretanto, estas RONS também podem ser evidenciadas, independentemente de sua atividade transcricional, com o uso de corantes GC-específicos, como a cromomicina A₃ (CMA₃), mitramicina (MM) (HOWELL, 1982; SCHMID *et al.*, 1982; ROCCHI, 1982; SATYA-PRAKASH & PATHAK, 1984; PHILLIPS *et al.*, 1989a,b; SOLA *et al.*, 1992a, b; GALETTI & RASCH, 1993a,b). Geralmente a coloração com os fluorocromos GC específicos detecta as RONS independentemente de suas atividades (SCHMID, 1980). O estudo das RONS com fluorocromos, no entanto, também não pode ser considerado como definitivo, pois podem evidenciar regiões heterocromáticas ricas em GC não associadas às RONS (SOUZA *et al.*, 2001) além de marcar alguns sítios de DNAr 18S (MANDRIOLI *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001). Alguns tipos de heterocromatina, aparentemente não associados a regiões organizadoras de nucléolos, têm sido vistas fluorescentes pela mitramicina ou pela cromomicina, em diferentes grupos de peixes (PHILLIPS & HARTLEY, 1988; PENDÁS *et al.*, 1993; MESTRINER, 1993; ARTONI, 1996).

A correspondência entre as regiões de RONS positivas e CMA3 positivas indica uma composição rica em bases GC na região de RONS, provavelmente presente nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre seqüências de DNA repetitivos adjacentes (SCHMID, 1980). Em peixes, fluorocromos AT específicos produzem pouca ou nenhuma banda positiva. Já os fluorocromos GC específicos vêm sendo bastante utilizados no estudo de NORs, uma vez que, apresentam uma notável relação com estas regiões (SOUZA, MOREIRA-FILHO, BERTOLLO, 1995). Contudo, este tipo de abordagem deve ser feito com certas

ressalvas, visto que igualmente podem ocorrer regiões cromossômicas ricas em GC sem correspondência com as RONS (ARTONI *et al.*, 1999).

A análise do tratamento com o fluorocromo CMA₃ em preparações cromossômicas de *Bryconamericus stramineus* da população do Córrego Alambari, permitiu identificar uma marcação mais evidente e algumas outras bem menos evidentes de fluorescência, enquanto que no tratamento com nitrato de prata apenas duas marcações ficaram evidentes (RONS simples). O mesmo ocorreu na população do Recanto dos Cambarás, que no tratamento com a cromomicina apresentou apenas duas marcações e no tratamento com nitrato de prata foram evidenciadas três marcações (RONS múltiplas). O que provavelmente ocorreu no Ribeirão Alambari é que foram evidenciados somente os sítios ribossomais maiores e as outras marcações menores não ficaram evidentes e no Recanto dos Cambarás ficaram evidentes somente os sítios ribossomais, não ocorrendo nenhuma outra marcação, diferindo dos resultados encontrados para as outras localidades e também na literatura. O nitrato de prata mostra a atividade transcricional das RONS, o que poderia explicar a variação encontrada, mas a CMA₃ pode detectar tanto as regiões ativas quanto inativas das RONS (PHILIPS e HARTLEY, 1988)

Exemplares das outras três localidades analisadas, Córrego da Quinta, Córrego Jacutinga e Ribeirão Hortelã, apresentaram as marcações de nitrato de prata coincidentes com as marcações de cromomicina, mostrando que estes sítios são ricos em GC, corroborando assim os resultados descritos para este gênero e outras espécies de peixes. PORTELLA-CASTRO (1999), utilizou o fluorocromo CMA₃ em quatro populações de *Bryconamericus* (*Bryconamericus* sp. (1 e 2) e *Bryconamericus* aff. *iheringii* (citótipos 1 e 2)) e observou uma correspondência

com os sítios de Ag-RONs. Nos estudos realizados por PAINTNER-MARQUES (2002) em exemplares de *Bryconamericus aff. exodon* do Córrego Três Bocas (PR), também foi observada uma correspondência entre as marcações do nitrato de prata e do fluorocromo CMA₃. Em exemplares de *Bryconamericus aff. iheringii* do Rio Água da Floresta analisados por PAINTNER-MARQUES (2003) mostrou concordância entre sítios detectados pela Ag-RONs e CMA₃, indicando que as RONS nesta espécie são ricas em GC.

A fim de se obter um melhor esclarecimento sobre a localização e a quantidade exata de cístrons ribossômicos, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* (FISH) com a utilização da sonda de DNAr 18S. Esta técnica vem se mostrando uma ferramenta bastante utilizada na detecção e mapeamento das RONS ao longo do complemento cromossômico, pois podem identificá-las independente de ter sido ativa ou não na interfase (PERES, 2005).

Através da técnica de hibridização *in situ* com a utilização da sonda de DNAr 18S aplicada na população de *Bryconamericus stramineus* do Ribeirão Alambari, foi evidenciado um número maior de sítios de DNAr 18S (seis marcações, sendo duas mais evidentes e quatro pouco evidentes) em relação ao número de sítios de Ag-RONs (duas marcações) e CMA₃ (uma marcação). As duas marcações mais evidentes provavelmente correspondem às RONS. No Córrego da Quinta, foi evidenciado também um número maior de sítios de DNAr 18S (quatro marcações, sendo três mais evidentes e uma menos evidente) em relação ao número de sítios de Ag-RONs (três marcações) e CMA₃ (três marcações). Neste caso, as três marcações mais evidentes são possivelmente correspondentes às marcações das Ag-RONs e CMA₃. Nos exemplares estudados dos Córregos Jacutinga e Hortelã, os resultados foram coincidentes, também evidenciam um número maior de sítios

de DNAr 18S (três marcações, sendo duas mais evidentes e uma menos evidente) em relação ao número de sítios de Ag-RONs (duas marcações) e CMA₃ (duas marcações). Estes sítios de DNAr 18S mais evidentes provavelmente correspondem aos resultados das Ag-RONs e CMA₃. No Recanto dos Cambarás foi evidenciado um número menor de sítios de DNAr 18S (duas marcações evidentes) em relação ao número de sítios de Ag-RONs (três marcações) mas em relação às marcações evidenciadas pela cromomicina CMA₃, os resultados são iguais (duas marcações), diferindo dos demais resultados encontrados para a espécie. Neste caso, poderia ser considerado que a prata estaria detectando segmentos pequenos, não detectáveis pela CMA₃ ou pela sonda específica de DNAr.

Rearranjos cromossômicos, como a transposição e/ou translocações resultando na dispersão de genes ribossômicos, parece ocorrer em diversas espécies piscícolas (GALETTI Jr. *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1996; MANTOVANI *et al.*, 2000). Estes mecanismos poderiam explicar estas variações nas RONS destas populações.

Nas populações do Ribeirão Alambari, Córrego da Quinta, Córrego Jacutinga e Ribeirão Hortelã o número de sítios de DNAr 18S foram superiores aos de nitrato de prata (Ag-RONs) e ao de cromomicina (CMA₃). Condição semelhante já foi relatada para *Bryconamericus aff. exodon* por PAINTNER-MARQUES (2002) onde após a impregnação por nitrato de prata (Ag-RONs) e o tratamento com o fluorocromo cromomicina (CMA₃) foram detectados dois a cinco cromossomos marcados e o resultado da hibridização *in situ* com a sonda de DNAr 18S apresentou oito sítios ribossomias. PAINTNER-MARQUES (2003) analisando uma população de *Bryconamericus aff. iheringii* após o tratamento com nitrato de prata,

CMA3 e hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S, observou uma correspondência entre os resultados, com os sinais no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos. CAPISTANO (2008), examinando duas populações de *Bryconamericus aff. iheringii* com RONS múltiplas, também observou um número maior de sítios de DNAr em relação aos de Ag-RONS e ao examinar uma população de *Bryconamericus aff. iheringii* com RONS simples, observou uma correspondência entre os resultados das Ag-RONS e FISH 18S.

É relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios identificados pela hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S que os identificados pela técnica de impregnação por nitrato de prata como observado por exemplo em *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000) *Astyanax scabripinnis* (FERRO et al., 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *Prochilodus lineatus* (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2003).

A população do Recanto dos Cambarás apresentou um resultado diferente das demais populações analisadas e descritas na literatura. O número de sítios obtidos pela impregnação por nitrato de prata, que se mostrou múltipla, foi superior ao número de sítios obtidos pela cromomicina CMA3 e hibridação *in situ* DNAr 18S, que mostraram-se simples. A presença de um único par de clusters de DNAr 18S tem sido referida como uma condição ancestral compartilhada por diversos grupos de peixes. Tal condição é mais comum em peixes que apresentam após a impregnação por nitrato de prata RONS simples, como por exemplo *Astyanax altiparanae* e *Astyanax lacustris* (PERES, 2005) e após a hibridação são marcados os mesmos cromossomos.

O gene ribossomal DNAr 5S é considerado altamente conservado (DANNA et al., 1996). Por ser um gene conservado e localizado em diferentes áreas do

genoma, está sendo utilizado como ferramenta para estudos filogenéticos e como um marcador populacional (MARTINS & GALETTI Jr., 2001). Ele é uma seqüência menor de gene ribossomal que não participa da formação do nucléolo. A unidade de repetição do DNAr 5S é uma seqüência de 120pb associada a espaçadores não transcritos (LONG e DAVID, 1980) bastante variáveis que possibilita um grande dinamismo a esses genes (WILLIAMS e STROBECK, 1985)

Entre os peixes, algumas espécies de Acipenseriformes, Anguiliformes, Salmoniformes, Cypriniformes, Perciformes e Characiformes já possuem estudos relacionados com a organização e/ou localização do DNAr 5S.

Analisando-se as populações de *Bryconamericus stramineus* estudadas no presente trabalho através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 5S verifica-se que ocorreu uma variação de três a cinco cromossomos apresentando sítios de DNAr 5S, umas marcações mais evidentes e outras menos evidentes. Na literatura não foi encontrado nenhum outro estudo no gênero *Bryconamericus* onde tenha sido aplicada a técnica de FISH com a sonda de DNAr 5S mas, os resultados encontrados estão entre os apresentados na literatura para a família Characidae, da qual o gênero *Bryconamericus* faz parte.

Entre os Characiformes, a maioria das espécies estudadas apresenta um número máximo de quatro sítios de DNAr 5S, localizados preferencialmente em região intersticial, próxima ao centrômero, região esta que poderia ser considerada estratégica para a manutenção e preservação do gene, uma vez que estaria menos sujeita a rearranjos cromossômicos (MARTINS & GALETTI Jr., 2001). Dados posteriores, principalmente na família Characidae, vêm mostrando ampla variabilidade envolvendo o número e localização desses sítios (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004; MANTOVANI *et al.*,

2005). Nas espécies ora analisadas observaram-se dois *loci* em *Astyanax altiparane*, *Astyanax lacustris*, *Myleus micans*; quatro *loci* em *Astyanax scabripinnis*, *Piabina argêntea*, *Orthospinus franciscensis*, *Serrapinnus heterodon* e oito *loci* em *Serrapinnus piaba*, os quais se localizavam em três pares de cromossomos homólogos. As posições ocupadas por esses sítios também são diversas, podendo ser pericentromérica, intersticial ou terminal. Desse modo, a localização e a posição dos sítios de DNAr 5S em Characidae tem se mostrado tão variável quanto os sítios de DNAr 18S (PERES, 2005).

O aumento dos sítios de DNAr 5S poderia estar correlacionado com uma dispersão dessas seqüências gênicas, levando a um aumento da variabilidade genética para estas populações, segundo descrito por CENTOFANTE (2003). Este autor observou tal situação em populações de *Astyanax scabripinnis* e em *Hyphessobrycon anisitsi*. ABEL (2001) propõe que em populações isoladas em pequenos corpos de água, como ocorre com *A. scabripinnis*, as alterações cromossômicas seriam eventos importantes para a manutenção de sua variabilidade genética.

7. CONCLUSÕES

- As análises citogenéticas na espécie *Bryconamericus stramineus* mostraram uma estabilidade quanto ao número diplóide de $2n=52$ cromossomos e uma variabilidade na sua fórmula cariotípica, sendo que cada população analisada apresentou um citótipo diferente, distintos dos já descritos.
- Não foram detectadas diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas nas populações analisadas, sugerindo que estas sejam citogeneticamente homogaméticas.
- Foram encontrados três números fundamentais diferentes: 84, 92 e 96. As diferenças na estrutura cariotípica podem ter sido determinadas por variações no número de cromossomos acrocêntricos. Variações do número fundamental (NF) pode ser resultado de rearranjos cromossômicos dos tipos translocações e inversões pericêntricas, podendo ser considerado um mecanismo importante de diversificação e evolução cariotípica neste grupo de peixes.
- A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C revelou um padrão bastante semelhante para todas as populações estudadas, com blocos heterocromáticos centroméricos, intersticiais e teloméricos, sendo que todas provavelmente possuem blocos heterocromáticos coincidentes com RONS, corroborado com resultados apresentados por outros autores.
- A impregnação por nitrato de prata para a localização das RONS revelou em três populações analisadas, embora rara neste gênero, a ocorrência de RONS simples. Nas outras duas populações ocorreram RONS múltiplas, que é a condição mais freqüente neste gênero.

- O tratamento com o fluorocromo cromomicina CMA₃ mostrou marcações correspondentes com as posições das RONS em três populações, mostrando que essas regiões são ricas em GC enquanto que nas outras duas a CMA₃ apresentou um menor valor em relação às RONS, tendo evidenciado somente os sítios ribossomais maiores.

- A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente com a sonda de DNAr 18S revelou uma variação de dois a seis cromossomos marcados, sendo que em quatro populações o número de marcações pelo FISH é superior ao das Ag-RONS e CMA₃ e uma das populações apresentou as marcações do FISH iguais a de CMA₃ e inferiores à das Ag-RONS.

- A técnica de hibridação *in situ* fluorescente com a sonda de DNAr 5S apresentou de três a cinco cromossomos marcados por esta técnica, com algumas marcações mais evidentes e outra menos. Estes resultados corroboram os dados disponíveis para outros representantes da família Characidae, onde mostram que estes sítos têm uma ampla variabilidade quanto ao número, localização e posição ocupada.

- Estudos citogenéticos no gênero *Bryconamericus*, principalmente no que diz respeito ao uso da hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 18S e 5S, que ao que parece é a primeira vez que é utilizada para este gênero, ainda são muito escassos e os dados obtidos no presente trabalho poderão colaborar com informações para o entendimento dos padrões de diversificação, especiação e evolução deste grupo de peixes.

8- REFERÊNCIAS

- ABEL, L.D.S. (2001) A variabilidade do complexo de espécies *scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE) como estratégia adaptativa. Estudo da diversidade cariotípica do grupo com ênfase em populações da bacia do rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.
- ABILHOA, V. & L.F. DUBOC. (2004). PEIXES – Água doce, p. 581-677. In: S.B. Mikich & R.S. Bérnils (Eds). Livro Vermelho dos animais ameaçados de extinção no estado do Paraná. Curitiba, Mater Natura e Instituto Ambiental do Paraná. XVI+764p (<http://www.pr.gov.br/iap>).
- AFFONSO, P.R.A.M. (2000) Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- ALBERDI, A. J.; FENOCCHIO, A. S. (1997) Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia*, v. 62, p. 171-176.
- ALMEIDA – TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO, S. A. (1981) Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apteronotus albifrons* (Pisces, Apteronotidae). *Experientia*, 37: 953-954.
- ALMEIDA-TOLEDO, LF; FORESTI, F. (1985) As regiões organizadoras de nucléolos em peixes. *Ciência e cultura*, 37: 448-453.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *et al.* (1996) Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia*, v. 49, p. 3543.

ALMEIDA-TOLEDO, LF, FORESTI, F, E TOLEDO-FILHO, SA (2000). Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chromosome Today* vol. 13 pg 169-182.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *et al.* (2002) Conservation of the 58 bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 97, p. 229-233.

ANDREATTA, A. A.; ALMEIDA – TOLEDO, L. F.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO – FILHO, S. A. (1992) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietenses*. *Cytologia*, 57: 369-372.

AREFJEV, V.A. (1990). Karyotypic diversity of Characid families (Pisces, Characidae). *Caryologia*, 43(3-4): 291-304.

ARTONI, R.F. (1996) Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). MSc Thesis, Universidade Federal de São Carlos 162 pp.

ARTONI, R. F. (1999). Citogenética do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Triportheus* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

ARTONI, R. F., VARI, M. R., BERTOLLO, L. A. C. (2000) Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biol. Health Sci.*, Ponta Grossa, v.6, n.1, p.43-60.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the chromosome. *Heredity*, v. 89, p. 15-19.

- BERTOLLO, LAC, TAKAHASHI, CS E MOREIRA-FILHO, O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Rev. Bras. Genet. 1: 103-120.
- BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA FILHO, O., GALETTI, P.M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of fresh-water fish. J. Fish Biol., 28: 153-159.
- BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLARO, Z. I. (1992) A highly differentiated ZZ/ZW chromosome system in Characid fish, *Tripotlheus guenterii*. Cytogenetics and Cell Genetic. v. 60, p. 60-63, 1992.
- BOJSEN, B. H.; BARRIGA, R. (2002) Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. Freshwater Biology, v. 47 p. 2246-2260.
- BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A C. (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. Chromosome Research, v. 8, p. 111-118.
- BRITSKI, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática In: Poluição e Piscicultura 79-108. Faculdade de Saúde Pública da Universidade do Estado de São Paulo – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura.
- BRITSKI, H.A., SATO, Y. E ROSA, ABS (1988). Manual de identificação dos peixes da região de Três Marias. CODEVASP Brasília, 115p.
- BUCKUP, P.A., MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. (eds.) (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CAPISTANO, T. G.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO-JUNIOR, H.F. (2008) Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. lheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the rivers Paranapanema and Ivaí, Paraná, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*.

CASTRO J, VIÑAS A, SÁNCHEZ L AND MARTÍNEZ P (1996) Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag- and CMA3 -staining, and fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 75:234-239.

CESTARI, M.M. (1996), Estudos citogenéticos preliminares de peixes pertencentes à Bacia do Rio Iguaçu. In - Anais do III Encontro Paranaense de Genética. Curitiba, Brasil.

CESTARI, M.M. & GALETTI, P.M. (1992a). Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. *Copeia*, 1: 108-112.

CESTARI, M.M. & GALETTI, P.M. (1992b). Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). *Brazilian Journal of Genetics*, 15(3): 555-567.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. (2002) Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon Basin. *Caryologia*, v. 55, p. 37-45.

CENTOFANTE, L. (2003) Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da Mantiqueira. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.

COLE, C. J.; LEAVENS, C. R. (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetology*, Van Nuys, v.3, p. 102.

DANNA, K.J., WORKMAN, R., CORYELL, V. & KEIM, P. (1996). 5S rDNA genes in tribe Phaseoleae: array size, number, and dynamics. *Genome*, 39: 445-455.

DANIEL-SILVA, M. F. Z., (1996) Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). 176p. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo, SP.

DENTON, T.E. (1973). *Fish chromosome methodology*. Springfield, Illinois, C. C. Thomas Publ. 166p.

DERGAN, J. & BERTOLLO, L.AC. (1990). Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná Basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, 13: 755-756.

EIGENMANN, C.H., MCATEE, W.L. & WARD, D.P. (1907). On further collections of fishes from Paraguay. *Ann. Carn. Mus.* 4:109-157.

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

EIGENMANN, C.H. (1927). The American Characidae. Mem. Mus. Comp. Zool. Harvard College, 43: 311-428.

FALCÃO, J. N. (1988). Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FALCÃO, J.N. & BERTOLLO, L.A.C. (1985) Chromosome characterization in *Acestrorhynchinae* and *Cynopotaminae* (Pisces, Characidae). *J. Fish Biol.*, 27: 603-610.

- FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. (1994) Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). Brazilian Journal of Genetics, v. 17, p. 157-163.
- FERRO, D. A M. *et al.* (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. Genetica, v. 110, p. 55-62.
- FINK, W. L. (1979) A new species of *Moenkhausia* from the Mato Grosso region of Brazil (Pisces, Characidae). Breviora (Museum of Comparative Zoology), 450: 1-12.
- FINK, S.V. & FINK, W.L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). Zoological Journal of the Linnean Society, 72(4): 297-353.
- FORESTI, F, ALMEIDA-TOLEDO, L.F., TOLEDO-FILHO, S.A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogen. Cell Genet. 31:137-144.
- FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., TOLEDO, S.A. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica, 79: 107-114.
- FROESE R, PAULY D. (2005). Fish Base World Wide Web Electronic Publication, www.fishbase.org, version (11/2005).
- FUJIWARA, A *et al.* (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid Fishes. Chromosome Research, v. 6, p. 463-471.

GALETTI, P.M., BERTOLLO, L.AC., MOREIRA FILHO, O. (1985a). A ocorrência de NORs simples e múltiplas caracterizando diferentes grupos de peixes. In: XII CONGR. BRASIL. ZOOL., p.175.

GALETTI, JR, P. M.; SILVA, E. B.; GERMINARO, R T. (1985b) A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Gharacidae). Brazilian Journal of Genetics, v. 8, p. 479-484.

GALETTI, P. M. & FORESTI, F. (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. Cytogenet. Cell Genet., 43: 43-46.

GALETTI, P. M., CESAR, A. C. G., VENERE, P. C. (1991) Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish. (Anostomidae, Characiformes). Cariologia, 44 (3-4): 287-292.

GALETTI, P.M. & RASCH, E.M. (1993a). Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphisms as shown by silver nitrate and chromomycin - (Teleostei:Poeciliidae). Ichthyol. Expiar. Freshwaters, 4(3): 269-277.

GALETTI, P.M. & RASCH, E.M. (1993b). NOR variability in diploid and triploid forms of *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin As staining. Brazilian Journal of Genetics, 12: 927-938.

GALETTI JR, P. M.; MESTRINER, C. A; MONACO, P. J. (1995) Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual Nucleolar Organizing Region variations in fish: report of a case involving *Leporinus frideriei*. Chromosome Research, v. 3, p. 285-290.

GALETTI JR, P. M. (1998) Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. Italian Journal of Zoology, v. 65, p. 53-56, 1998.

GÉRY, J. (1977). Characoids of the world. Neptune City, New Jersey. TFH Publications.

GARCIA, E, ALVAREZ, M.C.F., THODE, G. (1987). Chromosome relationships in the genus *Blennius* (Blenniidae, Perciformes). C banding patterns suggest two karyoevolutional pathways. *Genetica*, 72: 27-36.

GOLD, J.R., AMEMYIA, C.T, ELLISON, J.R. (1986). Chromosomal heterochromatin differentiation in north american Cyprinid fishes. *Copeia*, 1: 557-566.

GOOOPASTURE, C. & BLOOM, S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37-50.

HOWELL, W.M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.

HOWELL, W.N. E BLACK, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

HOWELL, W.M. (1982). Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: *The call nucleus*. New York-London, Bush H., Roth Blum I., eds., vol. XI, Academic Press. p.89 -142.

HSU, T. C., SPIRITO, S. E., PARDUE, M. L. (1975) Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Cromossoma*, 53: 37-50.

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

- KAVALCO, K.F.; MOREIRA-FILHO, O. (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia*, v,56. n.4, p.453-461.
- KAVALCO, K. F. *et al.* (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 106, p. 107-110.
- KING, M. (1980). C-banding studies on australian hyloid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80: 191-217.
- KIRPICHNIKOV, V.S. (1973). On karyotype evolution in Cyclostomata and Pisces. *Ichthyologia*, 5(1): 55-77.
- LATINI, A O.; PETRERE JR, M. (2004) Reduction of native fish fauna by alien species: an exmple from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Managemente and Ecology*, v. 11, p. 71-79.
- LEE, M. R., ELDER, F. F. B. (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet Cell Genet*, v.26, p.36-40.
- LEVAN A, FREDGA K. AND SANDBERG A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52:201- 220.
- LONG, E.O.; DAVID, I. D. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 727-764.
- LUCENA, C. A. S. D. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo, Brasil.

- LUNDBERG, J. G. et al. (2000) So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental water. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 87, p. 26-62.
- MAISTRO, E. L., FORESTI, F., OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1992). Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, 87: 101-106.
- MANDRIOLI, M. et al. (2001) Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* Teleostei, Gobiidae). *Genética*, v. 110, p. 73-78.
- MALABARBA, M.C.S.L. & MALABARBA, L.R. (1994) *Hypobrycon maromba*, a new genus and species of characiform fish from the upper rio Uruguai, Brazil (Ostariophysi: Characidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 5:19-24.
- MANTOVANI, M. et al. (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nuclear organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, v. 109, p. 161-168.
- MANTOVANI, M. et al. (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 536-542.
- MANTOVANI, M.; ADEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v. 123, p. 211-216.
- MARGARIDO, V. P. & GALETTI, P. M. (1996) Chromosomes studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios*

- MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR. (1999) Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, p. 357-361.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, v. 44, p. 903-910.
- MARTINS-SANTOS, I.C., JULIO, H.F., SANTOS, S.J. (1994). Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana river. *Cytologia*, 59: 175-181.
- MELO FAG, BRUM MJ, BUCKUP PA (1999) Cariótipos de *Deuterodon* sp e *Bryconamericus ornaticeps* de riachos costeiros do estado do Rio de Janeiro. XIII Encontro Brasileiro de Ictiologia, São Carlos, São Paulo, Brazil. Abstract p 145
- MESTRINER, C.A. (1993). Análise das regiões organizadoras de nucléolos e investigação do sistema XX/XY descrito para *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos.
- MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAHAHI, R., MILLER, O.J. (1976). Supression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid ceUs. *Expl. Cell. Res.*, 101: 235-243.
- MOLINA, W. F. (1995) Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Dissertação de mestrado. Departamento de Genética e Evolução, UFSCAR.
- MOREIRA FILHO, O., GALETTI, P.M., FORESTI, F., BERTOLLO, L.A.C. (1978). Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Ciência e Cultura*, 30: 548:549.

MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L. A. C. & GALETTI JR., P.M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. Can. J. Genet. Cyto., 26: 564-568.

MOREIRA FILHO, O. & BERTOLLO, L.AC. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Brazilian Journal of Genetics, 14: 331-357.

MOREIRA-FILHO, O., FENOCCHIO, A.S., PASTORI, M.C. E BERTOLLO, L.A.C. (2001) .Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species os the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Cytologia v. 66, p. 59-64.

MORELLI, S. (1981). Aspectos citogenéticos do gênero *Astvanax* (Pisces. Characidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos

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

NELSON, J.S. (1994). Fishes of the World. 3rdedition. USA, Ed. John Wiley & Sons Inc., 600p.

NELSON, J.S. (2006). Fishes of the world. Hoboken, John,Wiley and Sons, 4th ed., 624p.

OCALEWICZ K, JANKUN M. E LUCZYNSKI M. (2006) Cytogenetic characteristics of interspecific hybrids and chromosome set manipulated finfish. /n: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F e Kapoor BG (eds.), Fish Cytogenetics. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.

OJIMA, Y. (1983). Fish cytogenetics. In: Chromossomes in evolution of eukaryotic groups, CRC Press, A. K. Sharma & A. Sharma eds., 1: 111-145.

- OLIVEIRA, C., ALMEIDA TOLEDO, L.F., FORESTI, F., BRITSKI, H. E TOLEDO FILHO, S.A. (1988a). Chromosome formule of Neotropical freshwater fishes. Rev. Brasil. Genet. 11 (3) 577-624.
- OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. & TOLEDO, S. A. (1988b). Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Caryologia 41: 227-236.
- OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. (1994) Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: V SIMP. CITOGENET. EVOLUT. APLIC. PEIXES NEOTROP., p.6.
- OLIVEIRA C, ALMEIDA-TOLEDO LF E FORESTI F (2006) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F e Kapoor BG (eds.), Fish Cytogenetics. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- ORSI, M.L.; AGOSTINHO, A.A. (1999) Introdução de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v.16, n. 2, 1999. p.557-560.
- OZOUF-COSTAZ C. & F. FORESTI. (1992). Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology. Netherlands Journal of Zoology, 42 (2-3): 277-290.
- PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. (2001) Cytotypes and multiples NORs in the *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). Chromosome Science, v. 5, p. 109-114.
- PAINTNER-MARQUES, T. R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. (2002a) Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *Exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae). Cytologia, v. 67, p. 397-402.

Paintner-Marques TR, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2002b) Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *Exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas* 137:107-112.

PAINTNER-MARQUES TR, GIULIANO-CAETANO L AND DIAS AL (2003) Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genet Mol Biol* 26:145-149.

PENDÁS A.M., MORAN P. AND GARCIA-VASQUEZ E. (1993). Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome. Res.* 1: 63–67.

PERES, W. A. M. (2005) Análise da diversidade cariotípica de characidae da baía do São Francisco, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.

PFISTER, S. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A C. (1997) Cytogenetic studies in *Orthopinus franciscensis* (Pisces, Characidae, Stethaprioninae) and some considerations about karyotype evolution of the group. *Cytobios*, v. 91, p. 97-101.

PHILIPS, R.B. AND HARTLEY, S.E. (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome* 30: 193–197.

PHILLIPS, RB., PLEYTE, K.A, EART, L.M.V., HARTLEY, S.E. (1989a). Evolution of nucleolar organizer regions and ribosomal RNA genes in *Salvelinus*. *Physiol. Ecol. Jpn. Spec.*, 1: 429-447.

PHILLIPS, RB., PLEYTE, K.A, IHSEN, P.E. (1989b). Patterns of chromosomal nucleolar organizer region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia*: 47-53.

- PITON, J. S.; LANGEANI, F. (2006) Redescription and osteology of *Bryconamericus exodon* Eigenmann, 1907 (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Biota Neotrop.* vol.6 no.3 Campinas, SP.
- PLANQUETE, P. et al. (1996). Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. Paris: Museum National D' Histoire Naturelle. Service du Patrimoine Naturel D' Ecologie et de Gestion de la Biodiversité. T.1. (Collection du Patrimoine Naturel: v. 22).
- PORTELA, A.L.B., GALETTI, P.M. JR. & BERTOLLO, L.A.C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 11 (2): 307-316.
- PORTELA-CASTRO, A.L.B. (1999) Citogenética de Peixes da Subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Aspectos Citotaxômicos e Evolutivos. Doctoral Thesis. Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.
- PORTELA-CASTRO A.L.B, JÚLIO-JÚNIOR H.F, SANTOS, I. C. M. AND PAVANELLI, C.S. (2007) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus aff. iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* (on line), Netherlands, v. Agosto, p. 2007, 2008. .
- PORTO-FORESTI F., OLIVEIRA C., TABATA Y.A., RIGOLINO M.G. E FORESTI F. (2006) NOR markers in the identification and management of cultured fish species: The case of Rainbow Trout stocks reared in Brazil. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F e Kapoor BG (eds.), *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- POST, A. (1965). Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Susswasser Teleosteen. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 3: 47-93.
- REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARI Jr., C.J. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.

- RINGUELET, R. et al. (1967). Los peces argentinos de agua dulce. La Plata: Comission de Investigacion Científica.
- ROMÁN-VALENCIA, C. (2000) Tres nuevas especies de *Bryconamericus* (Ostariophysi: Characidae) de Colombia y diagnóstico del género. *Rev. Biol. Trop.* 48:449-464.
- RONCON-STANGE, E.A. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 16 (3): 601-615.
- ROCCHI, A. (1982). On the heterogeneity of heterochromatin. *Caryologia*, 35(2): 169-189.
- SATYA-PRAKASH, KL. & PATHAK, S. (1984). Silver staining pattern of male meiosis in the house cricket. *J. Hered.*, 75: 319-320.
- SCHAEFFER, S. A. (1998). Conflict and Resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. & LUCENA, C. A. S. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.375-400.
- SCHMID, M. (1978). Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hy/a*. *Chomosoma*, 66: 361-388.
- SCHMID, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosomes regions in *Anura*. *Chromosoma*, v. 77, p. 83-103.
- SCHMID, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in *Anura*. *Chromosoma*, 87: 327-344.

SCHWEIZER, D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, Berlin, v.58, p.307-324.

SCHEEL J. J. and Christensen B. (1970). The chromosomes of the common neon tetras. *Trop. Fish Hobb.* 19 24-31.

SCHELL, J.J. (1972). The chromosomes of the third neon tetra. *Tropical Fish Hobbyist*, 20 (11): 60-65.

SOLA, L., ROSSI, A.R, IASELU, V., RASCH, E.M., MONACO, P.J. (1992a). Cytogenetics of bisexuallunisexual speCies of *Poecilia*. 11. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding , DAPI, quinacrine, chromomycin ~ and silver staining. *Cytogenet. Cell Genet.*, 60: 229-235.

SOLA, L., IASELLI, Y., ROSSI, AR, RASCH, E.M., MONACO, P.J. (1992b). Cytogenetics of bisexuallunisexual species of *Poecilia*. 111. The karyotype of *Poecilia formosa*, a gynogenetic species of hybrid origino *Cytogenet. Cell. Genet.*, 60: 236-240.

SOUZA, I.L. & MOREIRA FILHO, O. (1992). Divergências cariotípicas entre duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae) em diferentes altitudes no rio Piracuama (Bacia do Paraíba). In: IV SIMP. CITOGNET. EVOLUT. APLIC. PEIXES NEOTROP., p.20.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C (1995). Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurence of diplochromosomes. *Cytobios*, v. 83, p. 273-281.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, p. 405-410.

- SOUZA L.I., GALIAN J., DE LA RUA P., BERTOLLO L.A.C. AND MOREIRA-FILHO O. (2001). Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* 66: 85–91.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- SUNAGA, T.; VERANI, J. R. (1991) The fish communities of the lakes in the Rio Doce Valley, Northeast Brazil. *Verhandlungen der internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, v. 24, p. 2563-2566.
- TOLEDO-FILHO, A. S.; FORESTI, F.; RIBEIRO, A. F. (1978) *Ictiogenética: Aspectos básicos e aplicados*. *Ciência e Cultura*, v. 30, p. 320-327.
- TURNER, B. J., DIFFONT N., RASH, E. M. (1992) The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, München, v.3, p. 17-23.
- VARI, R.P. & SIEBERT, D. J. (1990). A new, unusually sexually dimorphic species of *Bryconamericus* (Pisces: Ostariophysi: Characidae) from the Peruvian Amazon. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 103: 516-524.
- VARI, R.P. & MALABARBA, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena, eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 1-11.
- WASKO, A.P. (1996) Estudos citogenéticos no gênero *Bryconamericus* (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonômica evolutiva. Masters Thesis. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

- WASKO, A.P.; VÊNERE, P.C. AND GALETTI JR, P.M. (1996) Chromosome divergence between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Braz J Genet* 19:225-230.
- WASKO, A.P. AND GALETTI JR, P.M. (1998) Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios* 94:185-193.
- WASKO, A.P. AND GALETTI JR., P.M. (1999). Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). *Cytologia* 64: 63–67.
- WEITZMAN, S. H. & FINK, W. L. (1983) Relationships of the Neon Tetras, a group of South America freshwater fishes (Teleostei, Characidae) with comments on the phylogeny of New World Characiformes. *Bull. Mus. Comp.Zool.*,150(6): 339-395.
- WILLIAMS, S. M.; STROBECK, C. (1985) Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer lenght. *Journal of Theoretical Biology*, v. 116, p. 625-636.