



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELLI MARIA MENDES

**“CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO
ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE, DO
GRUPO INCERTAE SEDIS”**

Londrina
2009

MICHELLI MARIA MENDES

**“CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO
ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE, DO
GRUPO INCERTAE SEDIS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

538c Mendes, Michelli Maria.
Caracterização cariotípica de quatro espécies de peixes da família Characidae, do grupo Incertae Sedis / Michelli Maria Mendes. – Londrina, 2009. 79 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Characideo – Citogenética – Teses. 2. Characideo - Cariótipos – Teses. 3. Translocação (Genética) – Teses. I. Dias, Ana Lúcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.312.32

MICHELLI MARIA MENDES

**“CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE QUATRO ESPÉCIES DE
PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE, DO GRUPO INCERTAE SEDIS”**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
UEL - Londrina – PR

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela
UEL - Londrina – PR

Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela-Castro
UEM – Maringá – PR

Londrina, 16 de fevereiro de 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha mãe, Joana, e a todos os meus amigos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças e fazer com este trabalho se realizasse.

À minha família, em especial minha mãe, Joana, por todo carinho, compreensão e apoio, você é a pessoa mais importante da minha vida mãe!

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso de mestrado

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Dias pela orientação neste trabalho e por todo o carinho, amizade, dedicação, compreensão e pela enorme paciência que teve comigo. Aninha, te admiro muito como profissional e principalmente como pessoa! Muito obrigada!

À Profa. Dra. Lúcia Giuliano-Caetano pelas sugestões em meu trabalho e pela amizade. Agradeço principalmente pelas coletas.

Ao Prof. Dr Roberto Malabarba pelo auxílio na identificação das espécies.

Ao Prof. Dr. André Vanzela e ao LABRE em geral pelo empréstimo de materiais indispensáveis à realização da pesquisa, e por terem me recebido sempre no laboratório quando precisei.

Aos técnicos de laboratório, Dário e Melissa, pela disposição, atenção e por toda a ajuda fornecida.

À Sueli, secretária do curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por toda amizade, atenção, ajuda e competência.

Ao Prof. Dr André Vanzela e a Profa. Dra. Ana Luíza Portela Castro que aceitaram fazer parte da banca examinadora da minha dissertação.

Aos colegas de laboratório de citogenética de Peixes: Vítor, Gabriel, Tatiane, Larissa Pires, Larissa Lacerda, Rafael, Angélica e Fábio, pela amizade.

Às doutorandas Renata da Rosa e Marceléia que sempre estiveram dispostas a me ajudar e a me ensinar muitas coisas dentro do laboratório.

À Jamille, minha amiga baiana arretada, que se tornou uma irmã para mim. Gosto muito de você menina!

À Renata Trovarelli, uma amiga muito especial, que sempre me apoiou e sempre esteve do meu lado nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de coração: Alline, Juliana, Marcela, Ariane, Nonalíssia, Renata Issa Rickli que sempre me divertiram muito e me passaram muito carinho.

À Londrina, que me acolheu, e aonde eu vivi muitas coisas novas e importantes e fiz verdadeiros amigos.

Muito obrigada a todos que estiveram comigo, vocês foram muito importantes na realização deste sonho.

MENDES, Michelli Maria. **Caracterização cariotípica de quatro espécies de peixes da família Characidae, do grupo Incertae Sedis**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

No presente estudo foram realizadas análises citogenéticas de quatro espécies de peixes da família Characidae, do grupo Incertae Sedis: *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon luetkenni* e *Hyphessobrycon anisitsi*, coletadas em diferentes bacias hidrográficas, sendo que as duas primeiras espécies foram coletadas em sua localidade tipo. Este trabalho também apresentou os primeiros dados citogenéticos para as espécies *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*. O número cromossômico diplóide igual a 48 foi observado apenas em *A. eigenmanniorum* e as demais espécies apresentaram $2n=50$ cromossomos. Todas mostraram diferentes fórmulas cariotípicas. A *heterocromatina* foi observada distribuída fracamente pela região pericentromérica das espécies *A. eigenmanniorum*, *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*. Em *H. anisitsi* a *heterocromatina* se apresentou mais abundante e distribuída pela região pericentromérica e terminal dos cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs), foram múltiplas nas quatro espécies estudadas. *Deuterodon stigmaturus* e *H. luetkenni* possuem uma grande quantidade de pequenos sítios AgNOR sempre localizados no braço curto de cromossomos acrocêntricos, variando tanto inter quanto intraindividualmente. Em *D. stigmaturus* o FISH com a sonda de DNAr 18S evidenciou 8 cístrons ribossômicos. A coloração com os fluorocromos para *D. stigmaturus* e *H. luetkenni* mostrou pequenos sinais CMA₃ positivos coincidentes com as AgNORs. *A. eigenmanniorum* e *H. anisitsi* apresentaram sempre 3 cromossomos com AgNORs, também correspondentes aos sítios CMA₃ em ambas as espécies e aos sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*, entretanto, pode ser observada uma variação inter e intraindividual dos sítios CMA₃ positivos nas duas espécies e uma variação interindividual dos cístrons de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. Os dados apresentados indicam uma diversidade cariotípica entre as 4 espécies estudadas, confirmando uma variabilidade característica da família Characidae e, além do aumento da documentação cariotípica, contribuem para um melhor entendimento da estrutura cromossômica da família Characidae e para o esclarecimento das relações evolutivas entre espécies e populações deste grupo de peixes.

Palavras-chave: *Astyanax eigenmanniorum*. *Deuterodon stigmaturus*. *Hyphessobrycon*. Banda C. FISH. Fluorocromos. NOR. Variabilidade cromossômica.

MENDES, Michelli Maria. **Karyotype characterization of four species of fish of the Characidae family, group Incertae Sedis.** 2009. 79 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

In the present study were performed cytogenetic analysis of four species of fish of the Characidae family, group Incertae Sedis: *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon luetkenni* and *Hyphessobrycon anisitsi*, collected in different hydrographic basins, and the first two species were collected in your type locality. This work also presented the first cytogenetic data for the species *D. stigmaturus* and *H. luetkenni*. The diploid chromosome number equal to 48 was observed only in *A. eigenmanniorum* and other species have $2n = 50$ chromosomes. All have different karyotypic formulas. The heterochromatin was visualized distributed weakly by pericentromeric region of the species *A. eigenmanniorum*, *D. stigmaturus* and *H. luetkenni*. In *H. anisitsi* the heterochromatin is more abundant and distributed by the terminal and pericentromeric region of chromosomes. The nucleolar organizers regions (NORs) were multiple in four species studied. *Deuterodon stigmaturus* and *H. luetkenni* have a large number of small sites AgNOR always located on the short arm of acrocentric chromosomes, varying inter and intra-individually in both species. In *D. stigmaturus* the FISH with the probe of 18S rDNA revealed eight ribosomal cistrons. The staining with fluorochromes to *D. stigmaturus* and *H. luetkenni* showed small signs CMA₃ coincident with AgNORs. *A. eigenmanniorum* and *H. anisitsi* always presented three chromosomes AgNORs, also corresponding to CMA₃ sites in both species and sites of 18S rDNA in *A. eigenmanniorum*, however, can be seen a inter and intra-individual variation CMA₃ sites in both species and variation interindividual of cistrons 18S rDNA in *A. eigenmanniorum*. The data show a karyotypic diversity among the 4 species studied, confirming variability characteristic of the family Characidae and, besides increasing the karyotypic documentation, contribute to a better understanding of chromosomal structure of the family Characidae and to the clarification of evolutionary relationships between species and populations of this group of fish.

Keywords: *Astyanax eigenmanniorum*. *Deuterodon stigmaturus*. *Hyphessobrycon*. C banding. Chromosome variability. FISH. Fluorochromes. NOR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para o grupo Incertae Sedis, família Characidae (2n=número diplóide; 3n=número triplóide; NF=número fundamental).....	22
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho (2n=número diplóide; NF=número fundamental).....	44
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Foto das espécies coletadas: (A) *Astyanax eigenmanniorum*, (B) *Deuterodon stigmaturus*, (C) *Hyphessobrycon luetkenni* e (D) *Hyphessobrycon anisitsi* 37
- Figura 2** – Imagens de Satélite da Bacia da Laguna dos Patos e do Tramandaí/RS, indicando os locais de coleta..... 38
- Figura 3** – Imagens de satélite do local de coleta Ribeirão Cambé, pertencente à Bacia do Rio Tibagi 39

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Cariótipos de *Hyphessobrycon anisitsi*: (A) com coloração convencional com Giemsa e (B) com banda C..... 52
- Figura 2** – Cariótipos com coloração convencional de Giemsa: (A) *Hyphessobrycon luetkenni*, (B) *Deuterodon stigmaturus* e (C) *Astyanax eigenmanniorum*..... 53
- Figura 3** – Metáfases somáticas submetidas à técnica de banda C: (A) *Hyphessobrycon luetkenni*, (B) *Deuterodon stigmaturus* e (C) *Astyanax eigenmanniorum*, mostrando A heterocromatina pericentromérica 54

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Metáfases de *Deuterodon stigmaturus*: (a) AgNOR, (b) sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃, (c) FISH com a sonda de DNAr 18S; e de *Hyphessobrycon luetkenni*: (d) AgNOR; (e) sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃..... 66
- Figura 2** – Metáfases somáticas de: (a) *Astyanax eigenmanniorum* e (b) *Hyphessobrycon anisitsi* submetidas à técnica de impregnação por nitrato de prata. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolo (RONs)..... 66

- Figura 3** – Metáfases somáticas de *Astyanax eigenmanniorum*: (a) e (c) FISH com a sonda de DNAr 18S; (b) e (d) sobreposição de metáfases como fluorocromos DAPI e CMA₃. As setas indicam as regiões cromossômicas CMA₃ positivas 67
- Figura 4** – Sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃ de diferentes indivíduos de *Hyphessobrycon anisitsi*. Em destaque os cromossomos com sítios CMA₃ positivos 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CHARACIDAE E O GRUPO INCERTAE SEDIS	12
1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CHARACIDAE - GRUPO INCERTAE SEDIS	13
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA	37
3.1 SISTEMA HIDROGRÁFICO DA LAGUNA DOS PATOS/RS	37
3.2 BACIA DO TRAMANDAÍ/RS	38
3.2.1 Bacia do Rio Tibagi/PR	38
CAPÍTULO I	40
1.1 ANÁLISE DO CARIÓTIPO E DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA <i>HETEROCROMATINA</i> DE QUATRO ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II	55
2.1 VARIABILIDADE DE SÍTIOS AGNOR, CMA ₃ E DNAR18S EM QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CHARACIDAE E O GRUPO INCERTAE SEDIS

A família Characidae contém a maior diversidade da ordem Characiformes, com cerca de 950 espécies de peixes descritas (Reis et al., 2003). A área geográfica ocupada pelos representantes da família é, também, a mais ampla dentro da ordem (Menezes et al., 2007). Os representantes encontram-se distribuídos em vários ambientes da região Neotropical (Lima et al., 2003), se estendendo a partir dos Estados Unidos até o sul da Argentina, sendo encontrados também no continente africano (Lucena, 1993).

Os membros da família Characidae apresentam portes diversificados, desde muito pequenos (“mato-grosso”, “piaba”, etc.) a muito grandes (“dourado”, “pacu”, etc.) (Lima et al., 2003). Além dessa grande variação no porte das espécies, também podem ser encontrados inúmeros tipos de hábitos alimentares, estratégias reprodutivas, padrões comportamentais, preferências de habitats, padrões de cor e variações osteológicas, anatômicas e morfológicas, caracterizando esta família como a mais heterogênea dentro dos peixes neotropicais (Graça e Pavanelli, 2007). Muitas espécies de Characidae apresentam importância na pesca comercial e esportiva e outras são amplamente utilizadas por aquarofilistas (Graça e Pavanelli, 2007).

Por causa da ampla distribuição desta família, da grande quantidade de espécies e da grande diversidade biológica e morfológica, o estabelecimento de relações filogenéticas é muito difícil (Lucena, 1993), existindo diversos gêneros que ainda não são bem caracterizados.

Characidae era constituída por 13 subfamílias, sendo que a maioria dos gêneros desta família estavam incluídos na subfamília Tetragonopterinae. Entretanto, a ausência de evidências que esta subfamília constituía um grupo monofilético, fez com que esses gêneros fossem recentemente colocados dentro de um grupo Incertae Sedis por Lima et al. (2003), com base em trabalhos de sistemática filogenética.

Incertae sedis —"com posição incerta"— é uma expressão latina utilizada na Taxonomia para indicar a incapacidade de estabelecer a posição exata de um táxon dentro da classificação. A utilização desse termo reflete a parcialidade do conhecimento sistemático, e, por trás do seu uso, está a falta de acordo entre os especialistas da área e a falta de informações e suposições sobre o grau de parentesco. Seu uso é provisório e dura o tempo

necessário para se estabelecer um consenso à respeito da posição do táxon na classificação vigente (Wikipédia, 2008).

Segundo a classificação de Lima et al., (2003) as relações entre os representantes de Characidae são pouco conhecidas e, desse modo, a divisão em subfamílias só foi proposta para os caracídeos que apresentam alguma evidência de monofiletismo. Sendo assim, muitos gêneros e suas respectivas espécies, ou mesmo espécies de gêneros incluídos em alguma subfamília, que possuam suas relações filogenéticas incertas, são incluídos na família Characidae, sabidamente polifilética, mas não são incluídos em nenhuma subfamília (Graça e Pavanelli, 2007).

Oitenta e oito gêneros são listados como Incertae Sedis por Lima et al. (2003), incluindo 620 espécies. Entre essas, 64% ou 399 espécies são taxonomicamente pouco conhecidas e, possivelmente, não fazem parte de gêneros monofiléticos de Characidae. Adicionalmente, mais que 53% ou 47 gêneros incluídos dentro de Incertae Sedis são monotípicos e 26% ou 23 gêneros contêm somente duas ou três espécies (Lima et al., 2003).

Devido a esta grande divergência taxonômica, estudos citogenéticos neste grupo, além do aumento da documentação cariotípica, podem contribuir com dados que auxiliem a classificação das espécies e, também, para o esclarecimento das relações evolutivas entre espécies e populações deste grupo de peixes.

1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CHARACIDAE - GRUPO INCERTAE SEDIS

Apesar do grande número de gêneros que fazem parte do grupo Incertae Sedis, apenas 18 apresentam algum dado citogenético. Dessa forma, pouco é conhecido sobre a estrutura cariotípica deste grupo, e, além disso, a literatura está praticamente limitada ao gênero *Astyanax*, para o qual uma ampla variabilidade numérica e morfológica é bastante evidente. Além de *Astyanax*, os demais gêneros pertencentes ao grupo Incertae Sedis da família Characidae, que possuem algum estudo citogenéticos são: *Bryconamericus*, *Ctenobrycon*, *Deuterodon*, *Exodon*, *Gymnocorymbus*, *Hasemanina*, *Hemigrammus*, *Hollandichthys*, *Hyphessobrycon*, *Markiana*, *Moenkhausia*, *Nematobrycon*, *Oligosarcus*, *Piabina*, *Prionobrama*, *Salminus* e *Triportheus*. A maioria dos estudos em representantes desses gêneros se limita a descrição do número diplóide.

O número cromossômico diplóide nas espécies desse grupo de peixes varia de 36 em *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983) a 54 em *Bryconamericus* sp E (Wasko e Galetti Jr. 1998), sendo que os números diplóides 50 e 52 são os mais constantes. Portela et al. (1988) sugerem que o cariótipo ancestral da antiga subfamília *Tetragonopterinae*, cuja maioria dos seus representantes pertencem atualmente ao grupo *Incertae Sedis*, é $2n=50$ cromossomos meta e submetacêntricos.

Estudos citogenéticos descrevendo apenas o número cromossômico diplóide foram realizados nas seguintes espécies: *Deuterodon petri* que apresentou $2n=50$ cromossomos (Portela et al., 1988); *Nematobrycon palmeri* também com $2n=50$ e *Prionobrama filifera* com 52 cromossomos (Arefjev, 1990); *Gymnocorymbus ternetzi*, com $2n=48$ e *Markiana nigripinnis*, que apresentou $2n=52$ (Carvalho et al., 2002b). *Exodon paradoxus* também apresentou $2n=52$, e um dado cariotípico relevante para esta espécie é a presença de um grande número de cromossomos com um braço (36 cromossomos acrocêntricos) (Venere et al., 1997).

O número cromossômico diplóide mais freqüente em *Bryconamericus* é 52, e uma característica deste gênero é que as fórmulas cariotípicas são muito variáveis mesmo no nível intraespecífico e intrapopulacional (Paintner-Marques et al., 2002a; Capistano et al., 2008). Wasko e Galetti Jr. (1998) estudaram 5 espécies diferentes de *Bryconamericus*, sendo que 4 (*Bryconamericus* sp. A, sp. B, sp. C e sp. D) apresentaram $2n=52$ cromossomos e 1 espécie (*Bryconamericus* sp. E) apresentou $2n=54$ cromossomos, e cada espécie foi caracterizada com uma fórmula cariotípica distinta. Várias populações de diferentes espécies de *Bryconamericus* já estudadas apresentaram diferentes citótipos (Tabela 1).

A ocorrência de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) múltiplas parece ser uma característica do gênero *Bryconamericus*, pois apenas duas populações de *Bryconamericus aff. iheringii*, do rio Água da Floresta e do córrego Tatupeba, estudada por Paintner-Marques et al. (2003b) e Capistano et al. (2008), respectivamente, apresentaram NOR simples, que foi comprovada com a técnica de hibridação fluorescente *in situ* utilizando a sonda de DNAr 18S. Nas 4 espécies de *Bryconamericus* estudadas por Wasko e Galetti Jr. (1999) as regiões organizadoras nucleolares foram bastante variáveis, tanto intra quanto interindividual em relação ao número e localização das marcações pela prata, sendo evidenciados 9 fenótipos de AgNOR distintos. Paintner-Marques et al. (2002b) estudaram uma população de *Bryconamericus aff. Exodon* e encontraram de 2 a 5 cromossomos AgNORs, também mostrando variabilidade em relação a quantidade e posição dos cístrons ribossomais e, utilizando a técnica de FISH com a sonda de DNAr 18S, foram observados 8

sinais de hibridação. Capistano et al. (2008) também estudaram mais duas populações de *Bryconamericus aff iheringii* do rio Keller e do córrego Maringá que apresentaram NORs múltiplas possuindo, respectivamente, 10 e seis sítios ribossomais evidenciados com a sonda de DNAr 18S.

A *heterocromatina* no gênero *Bryconamericus* pode ser encontrada nas regiões *pericentroméricas*, intersticiais e/ou terminais dos cromossomos (Wasko e Galetti jr., 1998; Paintner-Marques et al., 2003; Portela-Castro et al., 2008) e, dessa forma, este grupo parece não ter uma tendência geral relacionada à sua localização e, cada espécie, poderia ser caracterizada por um padrão de bandamento C específico (Wasko e Galetti Jr., 1998).

Carvalho et al. (2002a) estudaram *Ctenobrycon hauxwellianus*, *Hollandichthys multifasciatus* e *Hyphessobrycon reticulatus*. Essas três espécies possuem características citogenéticas semelhantes, com número diplóide igual a 50 cromossomos, AgNOR simples e *A heterocromatina* distribuída na forma de pequenos blocos heterocromáticos na posição pericentromérica de quase todos os cromossomos do complemento.

Hyphessobrycon é um gênero que possui um alto número de espécies cariotipadas, embora para muitas espécies somente o número haplóide tem sido descrito (Carvalho et al., 2002a). Neste gênero a maioria das espécies possui $2n=50$ ou 52 cromossomos (Klinkhardt et al., 1995 cit. em Carvalho et al., 2002a).

Centofante et al. (2003a) estudando duas populações de *Hyphessobrycon anisitsi*, dos rios Piracuama e Perdizes, encontraram o número cromossômico diplóide igual a 50. A localização da *heterocromatina* foi evidenciada na região pericentromérica de todos os cromossomos e na região terminal de alguns, e as AgNORs foram observadas em até 4 cromossomos em ambas as populações, entretanto, estas apresentaram padrões distintos e característicos em relação ao número e localização dos genes ribossomais. A hibridação fluorescente in situ, utilizando a sonda de DNAr 18S permitiu a identificação de 13 cromossomos portadores dos sítios ribossomais na população do rio Piracuama e 10 sítios na população do rio Perdizes. Com a sonda de DNAr 5S quatro regiões foram positivamente observadas em dois pares cromossômicos na população de Piracuama, e cinco cromossomos foram evidenciados na população de Perdizes (Centofante et al., 2003a).

Arefjev (1990) descreveu o número cromossômico diplóide para três espécies de *Hyphessobrycon*: *H. scholzei*, com 50 cromossomos e *H. herbertaxelrodi* e *H. flammeus* que apresentaram 52 cromossomos. Carvalho et al. (2002a;b) também descreveram o número diplóide para as espécies *Hyphessobrycon griemi* e *H. reticulatus* que apresentaram

$2n=50$ cromossomos. *H. reticulatus* apresentou AgNOR simples, diferente do padrão apresentado pelas populações de *Hyphessobrycon* estudadas por Centofante et al. (2003a), e foram evidenciados, para esta população, pequenos blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos (Carvalho et al. 2002a).

Arefjev (1990) descreveu o número cromossômico diplóide para uma espécie do gênero *Hasemania*, *H. marginata*, que apresentou 50 cromossomos. Peres et al. (2008) estudaram a espécie *Hasemania nana* de uma população do rio São Francisco. Esta espécie apresentou 50 cromossomos, um par AgNOR e cinco cromossomos portadores de cístrons ribossômicos 18S.

No gênero *Hemigrammus* ocorrem diferentes números cromossômicos diplóides, $2n=48$, 50 e 52 (Tabela 1). Fontana et al. (1970, cit. em Oliveira et al. 1988) estudaram a espécie *H. caudovittatus* que apresentou $2n=50$ cromossomos e Arefjev (1990) descreveu o número diplóide para *H. hyanuary* com $2n=52$. Na população de *Hemigrammus marginatus* estudada por Portela-Castro e Júlio Jr. (2002) o número diplóide encontrado também foi de 50 cromossomos, apresentando AgNOR simples e rica em pares de bases GC após a coloração com o fluorocromo CMA₃. A heterocromatina em *H. marginatus* consistiu em pequenos blocos nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos e também no braço curto do cromossomo portador da AgNOR (Portela-Castro e Júlio Jr., 2002).

No gênero *Moenkhausia* três espécies foram analisadas, *M. intermedia*, *M. sanctaefilomenae* e *M. costae*, que se caracterizaram por apresentarem um número diplóide igual a 50 cromossomos e pela presença de cromossomos B nas duas primeiras espécies (Tabela 1). *M. intermedia* apresentou um pequeno cromossomo extra, com frequência variável e morfologia não bem definida (Portela et al., 1988). Foresti et al. (1989) encontraram de um até oito pequenos cromossomos supranumerários em *M. sanctaefilomenae* do rio Capivara, e Portela-Castro et al. (2001) observaram de zero a dois microcromossomos B parcialmente heterocromáticos em machos de *M. sanctaefilomenae* do rio Paraná.

O padrão da AgNOR em *Moenkhausia* pode ser múltiplo ou simples. AgNOR simples foi evidenciada para *M. costae* do Rio São Francisco (Portela et al., 1988), *Moenkhausia sanctaefilomenae* e *M. intermedia* do rio Paraná, sendo que nestas espécies estas regiões se apresentaram CMA₃ positivas (Portela-Castro e Júlio Jr. 2002). *Moenkhausia sanctaefilomenae* do rio Capivara apresentou NORs múltiplas que variaram de dois a sete cromossomos marcados pela prata (Foresti et al., 1989).

A heterocromatina foi detectada nas regiões intersticiais da maioria dos cromossomos e na região centromérica de alguns pares cromossômicos em *M.*

sanctaeofilomenae (Foresti et al., 1989; Portela-Castro e Júlio Jr., 2002). Alguns cromossomos B de *M. sanctaeofilomenae* mostraram-se heterocromáticos (Foresti et al., 1989). Em *M. intermedia* a *heterocromatina* foi detectada na região centromérica de certos pares cromossômicos, sendo que as marcações nos pares da AgNOR foram muito evidentes (Portela-Castro e Júlio Jr., 2002).

Todas as espécies já estudadas do gênero *Oligosarcus* apresentam $2n=50$ cromossomos (Tabela 1), as quais apresentam cariótipo assimétrico e grande variação nas fórmulas cariotípicas e/ou padrões de AgNOR com variação intra e interespecífica (Centofante et al., 2006). NOR simples foi encontrada para *O. cf. paranensis* (Martinez et al., 2004), *O. longirostris* (Rubert e Margarido, 2007) e *O. jenynsii* (Hattori et al., 2007). NORs múltiplas foram observadas para *O. paranensis* (Martinez et al., 2004; Rubert e Margarido, 2007), *O. longirostris* (Martinez et al., 2004), *O. hepsetus* (Kavalco et al., 2005, Centofante et al., 2006) e *O. pintoii* (Rubert e Margarido, 2007; Hattori et al., 2007). A hibridação com a sonda de DNAr 18 S revelou quatro sítios para *O. hepsetus* das populações do Rio Paraitinga, do córrego do Jacuí e do córrego Ribeirão Grande (Kavalco et al., 2005; Centofante et al., 2006) e seis sítios de DNAr para *O. hepsetus* da população do córrego Santo Antônio (Centofante et al., 2006). Em *O. pintoii* foram observados três sítios fluorescentes com a sonda de DNAr 18S (Hattori et al., 2007). A localização do DNAr 5S foi observada em dois pares cromossômicos para *O. hepsetus* (Kavalco et al., 2005) em três cromossomos para *O. pintoii* e em um par de cromossomos em *O. jenynsii* (Hattori et al., 2007).

Oligosarcus paranensis apresenta uma maior quantidade de heterocromatina em relação às demais espécies estudadas, mas não há nenhum padrão em relação a *heterocromatina* neste gênero, sendo evidenciadas regiões heterocromáticas subterminais, pericentroméricas e intersticiais nos cromossomos, e alguns blocos foram coincidentes com a NOR e se mostraram ricos em pares de bases GC (Kavalco et al., 2005; Centofante et al., 2006; Rubert e Margarido, 2007).

Todas as populações de *Piabina argentea* estudadas até o momento apresentaram o número diplóide de $2n=52$ cromossomos. Portela et al. (1988) estudando uma população de *Piabina argentea* do rio Mogi-Guaçu verificaram até quatro marcações AgNOR, caracterizando um sistema de NORs múltiplas que foi confirmado por Peres et al. (2008) em *P. argentea* do rio São Francisco que apresentou dois cromossomos acrocêntricos portadores da AgNOR e seis cromossomos portadores de cístrons de DNAr 18S. Utilizando a técnica de FISH com a sonda de DNAr 5S os mesmos autores encontraram dois pares de cromossomos portadores desse cístron ribossômico.

Estudos citogenéticos no gênero *Salminus* foram realizados por Margarido e Galetti Jr. (1999) em *Salminus hillarii* do rio Mogi-Guaçu e por Souza et al. (2008) que estudaram *S. hillarii* também do rio Mogi-Guaçu, São Francisco e Araguaia e *S. brasiliensis* do rio Mogi-Guaçu e do rio São Francisco. O número diplóide encontrado para ambas as espécies foi igual a 50 cromossomos e praticamente não foram constatadas diferenças nas fórmulas cariotípicas entre elas (Tabela 1). *S. hillarii* apresentou AgNOR simples, rica em pares de bases GC, comprovada pela presença de bandas brilhantes após o tratamento com o fluorocromo mitramicina (Margarido e Galetti Jr., 1999). Através da técnica de FISH, utilizando a sonda de DNAr 18S, Souza et al. (2008) comprovaram a presença de um par de cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo em *S. hillarii* e *S. brasiliensis*. Com a sonda de DNAr 5S, dois loci foram identificados em um par de cromossomos subtelocêntricos, nas duas espécies (Souza et al., 2008). Em *S. hillarii* a banda C apresentou-se na região pericentromérica da maioria dos cromossomos do complemento (Margarido e Galetti Jr., 1999), e alguns blocos de heterocromatina em *S. hillarii* e *S. brasiliensis* se apresentaram ricos em AT, quando corados com o fluorocromo DAPI (Souza et al., 2008).

Os cromossomos sexuais representam uma ocorrência rara entre os representantes da família Characidae (Artoni et al., 2001) e, até o momento, dentro do grupo Incertae Sedis, apenas o gênero *Triportheus* apresenta esses cromossomos. Neste gênero, as seguintes espécies possuem estudos citogenéticos: *Triportheus paranense* (Sánchez e Jorge, 1999; Artoni et al., 2001), *T. cf elongatus*, *T. guentheri* (Artoni et al., 2001), *T. venezuelensis* (Nirchio et al., 2007) e *T. nematurus* (Diniz et al., 2008). Todas as espécies estudadas apresentaram 52 cromossomos com o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. Este gênero apresenta a estrutura cariotípica e marcadores cromossômicos conservados entre as diferentes espécies.

Sánchez e Jorge (1999) estudando *Triportheus paranense* verificaram que o cromossomo Z é o maior metacêntrico do complemento cariotípico e o cromossomo W apresenta um tamanho médio, representando aproximadamente 50% do comprimento total do cromossomo Z, e esta característica também pode ser vista nas demais espécies do gênero (Artoni et al., 2001; Nirchio et al., 2007; Diniz et al., 2008).

A heterocromatina, dentro do gênero *Triportheus*, é distribuída de forma semelhante entre as espécies, estando presente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos autossomos de todas as espécies e na região terminal de alguns cromossomos autossômicos em *T. nematurus* (Sánchez e Jorge, 1999; Artoni et al., 2001; Nirchio et al., 2007; Diniz et al., 2008). No cromossomo Z a heterocromatina encontra-se distribuída em

ambas as regiões terminais, já o cromossomo W é fortemente heterocromático, com pequenas regiões eucromáticas vistas em algumas espécies. Essas características parecem ser conservadas para *Triportheus* (Sánchez e Jorge, 1999; Artoni et al., 2001; Nirchio et al., 2007; Diniz et al., 2008).

Triportheus guentheri, *T. elongatus*, *T. paranense* e *T. nematurus* apresentaram NORs múltiplas, com no máximo três sinais AgNORs positivos nos autossomos, sendo que, o cromossomo W de todas as espécies e, esporadicamente, o cromossomo Z de *T. guentheri* também apresentaram afinidade pela prata (Artoni et al., 2001; Diniz et al., 2008). A hibridação, utilizando a sonda de DNAr 18S, confirmou os sítios de NOR nos autossomos e no cromossomo W para as espécies citadas acima, sendo que estas regiões também se apresentaram ricas em pares de bases GC (Artoni e Bertollo, 2002; Diniz et al., 2008). Em *Triportheus venezuelensis* sítios de DNAr 18S foram observados em nove pares cromossômicos, estando presentes em ambas regiões terminais de alguns pares e no cromossomo W (Nirchio et al., 2007).

Recentemente, Pazza & Kavalco (2007) fizeram uma grande revisão dos dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Astyanax*, que possui cerca de 100 espécies descritas. Apenas 15% das espécies de *Astyanax* possuem algum dado cariotípico e, dessas, *A. scabripinnis*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* compreendem a maioria absoluta dos estudos citogenéticos dentro do gênero. O número cromossômico diplóide em *Astyanax* varia de $2n=36$ em *A. schubarti* até $2n=50$ em *A. altiparanae*, *A. giton*, *A. intermedius*, *A. janeiroensis*, *A. lacustris*, *A. mexicanus*, *Astyanax* sp.B, *Astyanax* sp.C, *Astyanax* sp.D, e algumas populações de *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, como relacionado na tabela 1. Uma grande variação cariotípica ocorre neste gênero e estudos citotaxonômicos sugerem que algumas das espécies descritas formalmente, atualmente representam um complexo de espécies, tais como *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* (Pazza e Kavalco, 2007).

Para *A. altiparanae* o número diplóide permanece sempre constante, mas esta espécie apresenta uma variação inter-populacional bem significativa em relação à fórmula cariotípica, como foi observado por Pacheco et al. (2001) que encontrou três citótipos para uma população desta espécie e, atualmente, vem sendo sugerido que *A. altiparane* representa um terceiro complexo de espécies dentro de *Astyanax* (Domingues et al., 2007; Fernandes e Martins-Santos, 2004, 2006).

Além da grande variação numérica e estrutural que ocorre de forma intra e interespecífica dentro das espécies de *Astyanax*, neste gênero também há a ocorrência de triploidia natural, presença de cromossomos B e casos de polimorfismos. Cromossomos B em

Astyanax foram observados em *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *A. mexicanus* e *A. scabripinnis* (Moreira-Filho et al., 2004; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998a; Fernandes e Martins-Santos, 2005, entre outros) e, no mínimo, 5 espécies apresentaram um ou mais indivíduos triploides, e entre essas estão *A. bockmanni* (citado como *A. eigenmanniorum* por Fauaz et al., 1994), *A. schubarti* (Morelli et al., 1983) e *A. scabripinnis* (Fauaz et al., 1994; Malacrida, 2003; Maistro et al., 1994) sendo que esta última, além da triploidia, também apresentou cromossomos B no mesmo indivíduo (Fauaz et al., 1994; Maistro et al., 1994).

Ocorrência de AgNORs múltiplas é característica dentro de *Astyanax*, e esse padrão de NOR foi confirmado pela técnica de FISH usando sondas de DNAr 18S (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Ferro, et al., 2001; Pazzo et al., 2006). Os sítios de DNAr 5S são encontrados desde um único par cromossômico em *A. altiparanae* e *A. lacustris* (Almeida-Toledo et al., 2002; Fernandes e Martins-Santos, 2006b) até muitos cromossomos portadores desses sítios de DNAr 5S como em *A. giton* e *A. intermedius* (Kavalco et al., 2004).

Alguns trabalhos com DNAs satélites já foram realizados em *Astyanax*. Uma família de DNA satélite, rica em pares de bases AT, As 51, foi isolada de um cromossomo supranumerário de *A. scabripinnis* por Mestriner et al. (2000). Utilizando o As 51 como sonda na técnica de FISH, pode ser observado que esta família de DNA satélite também está presente na *heterocromatina* não centromérica, nas NORs e nos cromossomos supranumerários de *A. scabripinnis*, e também está presente em outras espécies desse gênero, como é o caso de *Astyanax parahybae* (Kavalco et al., 2007) e *Astyanax fasciatus* (Pazzo et al., 2008).

O padrão de banda-C nas espécies de *Astyanax* é altamente variável, incluindo casos de polimorfismos intra-populacional, como o que ocorre em *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2000). A associação entre segmentos heterocromáticos ricos em GC e NOR é muito comum neste gênero (Pacheco et al., 2001; Domingues et al., 2007; Kavalco et al., 2007).

Apesar da grande variabilidade existente entre as diferentes espécies de Characidae pertencentes à Incertae Sedis, uma característica comum entre elas é a presença de um grande par metacêntrico, o primeiro do complemento cromossômico, que apresenta aproximadamente o dobro de tamanho do segundo maior par do cariótipo. Esta é uma característica compartilhada por muitos caracídeos como, por exemplo, *Hyphessobrycon*, *Hollandichthys*, *Ctenobrycon* (Carvalho et al., 2002a), *Astyanax*, *Moenkhausia* e *Hemigrammus* (Portela-Castro e Júlio Jr., 2002), *Deuterodon* (Portela-Castro et al., 1988),

Oligosarcus (Kavalco et al., 2005) e *Salminus* (Margarido e Galetti Jr., 1999). O bandamento R aplicado em muitas espécies desta família revelou similaridade no padrão de bandas nesses cromossomos marcadores (Almeida-Toledo, 2000; Daniel-Silva, 2001). Portela-Castro e Júlio Jr. (2002) colocaram que o primeiro par metacêntrico indica uma característica extremamente conservadora e que deve ser levada em conta nas análises comparativas dentro de um grupo.

Nos gêneros *Piabina*, *Bryconamericus* e *Exodon*, entretanto, este par metacêntrico maior não é observado. Para esses gêneros não há uma grande diferença no tamanho entre o primeiro e o segundo par cromossômico, embora o primeiro par ainda seja o maior do complemento (Portela et al., 1988). No gênero *Exodon* estudado por Venere et al. (1997) o primeiro par metacêntrico apresenta um tamanho de médio a pequeno, também não apresentando esta característica citogenética que é tão comum entre gêneros da família Characidae.

A grande divergência de número cromossômico, estrutura cariotípica e de marcadores cromossômicos entre os diferentes gêneros de Incertae Sedis refletem a natureza artificial do grupo e estudos citogenéticos podem servir de ferramenta, auxiliando nas análises filogenéticas e taxonômicas, visando uma correta classificação desse grupo de peixes dentro de um táxon maior.

Dada a grande variabilidade cariotípica presente neste grupo, nosso estudo buscou compreender se diferentes espécies oriundas de bacias hidrográficas seguramente isoladas mantem ou não o nível elevado de diferenciação cariotípica, quanto ao número e estrutura cromossômica, número e localização de sítios de DNAr 18S, NOR e CMA₃, bem como do padrão de distribuição da heterocromatina.

Na Tabela 1, a seguir, estão relacionados os dados cariotípicos, como número diplóide e fórmula cariotípica, de algumas populações de peixes pertencentes à família Characidae e ao grupo Incertae Sedis.

Tabela 1 – Dados citogenéticos disponíveis para o grupo *Incertae Sedis*, família Characidae (2n=número diplóide; 3n=número triplóide;

Espécie	Local	2n	3n	Bs	Fórmula cariotípica	NF	Referência
<i>Astyanax altiparanae</i>	Rio Mogi-Guaçu – Alto Rio Paraná - Pirassununga/SP	50	-	-	10m+24sm+4st+12a	88	Morelli <i>et al.</i> (1983)
	Rio Claro - Rio Paranapanema - Tamarana/PR	50	-	-	10m+26sm+4st+10a	90	Pacheco <i>et al.</i> (2001)
					10m+24sm+4st+12a	88	
					10m+22sm+4st+14a	86	
	Rio Índios – Rio Ivaí	50	-	-	6m+30sm+4st+10a	90	Fernandes e Martins-Santos (2004)
	Rio Paraná – Alto Rio Paraná – Porto Rico/PR	50	-	-	6m+26sm+6st+12a	88	
	Córrego Tatupeba – Alto Rio Paraná	50	-	-	6m+26sm+6st+12a	88	Fernandes e Martins-Santos (2006b)
	Córrego Keçaba – Alto Rio Paraná	50	-	-	6m+26sm+6st+12a	88	
	Córrego Maringá – Alto Rio Paraná	50	-	-	6m+26sm+6st+12a	88	
	Reservatório Tarumã – Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	50	-	-	6m+28sm+8st+8a	92	Domingues <i>et al.</i> (2007)
Rio Iraí - Rio Iguaçu – Curitiba/PR	50	-	-	6m+30sm+8st+6a	94		
Rio Campo Novo – Rio Tietê – Bauru/SP	50	-	0-1	12m+18sm+12st+8a	92	Hashimoto <i>et al.</i> (2008)	

<i>Astyanax bimaculatus</i>	Rio Paraná – Posadas, Misiones - Argentina	50	-	-	10m+18sm+12st+10a	90	Alberdi e Fenochio (1997)
	Rio Meia Ponte – Rio Paranaíba – Goiania/GO	50	-	-	26sm+24a	76	Jin e Toledo, 1975
<i>Astyanax bimaculatus</i>	aff. Rio das Contas – Açude da Pedra – Jequié/BA	50	-	-	6m+28sm+12st+4a	96	Pamponet <i>et al.</i> (2008)
	Córrego Mineiro – Itamari/BA	50	-	-	6m+28sm+12st+4a	96	Pamponet <i>et al.</i> (2008)
<i>Astyanax bockmanni</i>	Rio Paranapanema – São Miguel Arcanjo	50	-	-	10m+12sm+12st+16a	84	Kavalco <i>et al.</i> , 2008
	Rio Paranapanema – Pilar do Sul	50	-	-	10m+12sm+12st+16a	84	Kavalco <i>et al.</i> , 2008
	Rio Grande – Alto Rio Paraná - Volta Grande/MG	50	-	-	6m+20sm+8st+16a	76	Citado como <i>A. eigenmanniorum</i> por Fauaz <i>et al.</i> (1994)
	Rio Grande – Alto Rio Paraná - Volta Grande/MG	-	75	-	9m+30sm+12st+24a	114	Citado como <i>A. eigenmanniorum</i> por Fauaz <i>et al.</i> (1994)
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	Córrego Caetano – Uberlândia/MG	48	-	0-2	14m+18sm+10st+6a	90	Torres-Mariano e Morelli (2008)
<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Meia Ponte - Rio Paranaíba – Goiânia/GO	46	-	-	28sm+18a	74	Jin e Toledo, 1975
	Rio Mogi-Guaçu – Alto Rio Paraná - Pirassununga/SP	46	-	-	14m+20sm+10st+2a	90	Morelli <i>et al.</i> (1983)
	Rio Juquiá – Registro/SP	48	-	-	10m+24sm+12st+2a	94	
	Córrego Paiol Grande - Rio Grande – São Bento do Sapucaí/SP	48	-	-	8m+22sm+12st+6a	90	Centofante <i>et al.</i> (2003b)
	Rio Mogi-Guaçu – Alto do Rio Paraná – Pirassununga/SP	45	-	-	12m+20sm+10st+3a	87	Pazza <i>et al.</i> (2006)
		46	-	-	12m+20sm+10st+4a	88	

			-	-	12m+20sm+10st+3a	87	
		47	-	-	12m+19sm+10st+6a	94	
			-	-	12m+21sm+10st+4a	90	
			-	-	12m+20sm+10st+5a	89	
		48	-	-	8m+22sm+12st+6a	90	
	Rio Mogi-Guaçu – Alto do Rio Paraná – Ouro Fino/MG	47	-	-	12m+20sm+10st+5a	89	
		48	-	-	8m+22sm+12st+6a	90	
	Rio Mogi-Guaçu – Alto do Rio Paraná – Barrinha/SP	46	-	-	12m+20sm+10st+4a	88	
		48	-	-	8m+22sm+12st+6a	90	
	Rio Araguari – Rio Paranaíba – Uberlândia/MG	46	-	-	14m+16sm+10st+6a	86	Torres-Mariano e Morelli (2006)
	Rio Contas – Jequié/BA	48	-	-	8m+24sm+12st+4a	92	Medrado <i>et al.</i> (2008)
	Rio Preto do Costa – Jequié/BA	48	-	-	8m+24sm+10st+6a	90	Medrado <i>et al.</i> (2008)
	Córrego Mineiro – Bacia do Recôncavo Sul – Itamari/BA	48	-	-	8m+18sm+16st+6a	90	Medrado <i>et al.</i> (2008)
<i>Astyanax giton</i>	Rio Piraitinga – Rio Paraíba do Sul – Cunha/SP	50	-	-	6m+8sm+8st+28a	72	Kavalco e Moreira-Filho (2003)
	Córrego Jacuí - Rio Paraíba do Sul – Cunha/SP	50	-	-	6m+8sm+8st+28a	72	

<i>Astyanax intermedius</i>	Rio Piraitinga – Rio Paraíba do Sul – Cunha/SP	50	-	-	6m+8sm+4st+32a	68	
<i>Astyanax janeiroensis</i>	Rio Betari – Ribeira do Iguape – Apiaí/SP	50	-	-	6m+14sm+14st+16a	84	Carvalho <i>et al.</i> (2002a)
	Rio Sacovão – Castro/PR	50	-	-	6m+14sm+14st+16a	84	Vicari <i>et al.</i> (2008b)
	Rio Açungui – São Luis do Purunã/PR	50	-	-	6m+14sm+14st+16a	84	Vicari <i>et al.</i> (2008b)
<i>Astyanax lacustris</i>	Rio São Francisco - Três Marias/MG	50	-	-	32m/sm+18st/a		Almeida-Toledo <i>et al.</i> (2002)
	Rio São Francisco - Três Marias/MG	50	-	-	8m+20sm+16st+6a	94	Peres <i>et al.</i> (2008)
<i>Astyanax mexicanus</i>	Indeterminado	50	-	-	40m/sm+10st/a		Kirby <i>et al.</i> , (1997)
	Comércio – aquário	50	-	1-2	8m+18sm+12st+12a	88	Kavalco e Almeida-Toledo (2007)
<i>Astyanax paraguayae</i>	Rio Paraibuna – Rio Paraíba do Sul	48	-	-	8m+18sm+12st+10a	86	Centofante <i>et al.</i> (2003b)
	Rio Paraitinga – Rio Paraíba do Sul	48	-	-	8m+18sm+12st+10a	96	Kavalco e Moreira-Filho (2003)
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Rio Água do Rancho – Alto Rio Paraná – Maringá/PR	50	-	0-2	6m+28sm+16a	84	Mestriner <i>et al.</i> (2000); Mizoguchi e Martins-Santos (1998a/b)
	Rio Ligeiro – Alto Rio Paraná– Maringá/PR	48	-	-	10m+22sm+2st+14a	82	Mizoguchi e Martins-Santos (1998 ^a /b)
	Rio Yucatán – Rio Ivaí – Maringá/PR	50	-	0-1	6m+30sm+4st+10a	90	Mestriner <i>et al.</i> (2000); Mizoguchi e Martins-Santos (1998a)
	Rio Sarandi – Alto Rio Paraná– Maringá/PR	50	-	-	6m+26sm+4st+14a	86	Mizoguchi e Martins-Santos (1998aeb)
	Córrego Centenário - Alto Rio Paraná– Maringá/PR	50	-	-	6m+20sm+8st+16a	84	Moreira-Filho e Bertollo (1991); Mantovani <i>et al.</i> (2000);

Córrego São Domingos – Rio Ivaí – Maringá/PR	48	-	-	10m+20sm+8st+10a	86	Alves e Martins-Santos (2002)
Córrego Tamboara – Rio Ivaí – Paranavai/PR	48	-	-	10m+24sm+6st+8a	88	
Córrego Tatupeba – Rio Ivaí	50	-	1	6m+22sm+6st+16a	84	Fernandes e Martins- Santos (2005)
	48	-	1	8m+26sm+6st+8a	88	
	46	-	2	8m+22sm+6st+10a	82	
Córrego Amores – Rio Ivaí	48	-	-	8m+24sm+4st+12a	84	Fernandes e Martins-Santos (2003);
Rio Índios – Rio Ivaí	48	-	-	8m+20sm+6st+14a	82	
Córrego Marrecas – Alto Rio Paraná – Londrina/PR	48	-	-	6m+20sm+12st+10a	86	Moreira-Filho e Bertollo (1991); Mantovani <i>et al.</i> (2000);
Córrego Apertados – Rio Tibagi – Londrina/PR	48	-	-	6m+22sm+4st+16a	80	Malacrida <i>et al.</i> (2003)
	-	72	-	9m+33sm+6st+24a	120	
Córrego Tamanduá- Alto Rio Paraná – Itatinga/SP	50	-	-	6m+26sm+4st+14a	86	Maistro <i>et al.</i> (2000)
	48	-	-	6m+28sm+4st+10a	86	
Córrego Grande – Alto Rio Paraná – Pardinho – SP	50	-	-	6m+26sm+8st+10a	90	Vicente <i>et al.</i> (1996)
Rio Pardo - Alto Rio Paraná – Pardinho – SP	50	-	-	6m+26sm+6st+12a	88	
Rio Claro – Alto Rio Paraná – Botucatu/SP	50	-	-	6m+28sm+6st+10a	90	

Rio Claro – Alto Rio Paraná – Salesópolis/SP	50	-	-	6m+24sm+8st+12a	88	Moreira-Filho e Bertollo (1991);
Rio Araquá - Alto Rio Paraná – Botucatu/SP	50	-	0-1	4m+30sm+4st+12a	88	Maistro <i>et al.</i> (1992)
	-	75	2	6m+30sm+6st+18a	132	Maistro <i>et al.</i> (1994)
Córrego Canta-Galo – Alto Rio Paraná – Itirapina/SP	50	-	-	4m+26sm+4st+16a	84	Souza e Moreira-Filho (1995)
	48	-	-	6m+22sm+8st+12a	84	Souza <i>et al.</i> (1996)
Córrego Monjolinho – Alto Rio Paraná – São Carlos/SP	50	-	-	6m+24sm+8st+12a	88	Moreira-Filho e Bertollo (1991);
Córrego Perdizes – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-2	6m+22sm+10st+12a	88	Vicente <i>et al.</i> (1996)
Córrego Pedras – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-2	6m+22sm+10st+12a	88	Salvador e Moreira-Filho (1991); Fauaz <i>et al.</i> (1994); Vicente <i>et al.</i> (1996);
	-	75	2	9m+33sm+15st+18a	132	Fauaz <i>et al.</i> (1994)
Córrego Casquilho – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-1	6m+22sm+10st+12a	88	Vicente <i>et al.</i> (1996)
Rio Capivari – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-1	6m+22sm+10st+12a	88	Ferro <i>et al.</i> (2001; 2003)
Córrego Fojo – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-2	6m+22sm+10st+12a	88	
Lago Carpas – Alto Rio Paraná – Campos do Jordão/SP	50	-	0-1	6m+22sm+10st+12a	88	
Córrego Cruz da Retirada Bonita – Rio Paranaíba – Campina Verde/MG	50	-	-	8m+22sm+12st+8a	92	Santos e Morelli (2006)
Córrego Manga – Rio Grande – Campina Verde/MG	50	-	-	6m+26sm+10st+8a	92	

Córrego Jataí – Rio Paranaíba – Uberlândia/MG	50	-	1	6m+24sm+6st+14a	86	Araújo e Morelli (2002)
Rio Piracuama – Rio Paraíba do Sul – Tremembé/SP (780m alt.)	50	-	-	4m+10sm+6st+30a	70	Souza e Moreira-Filho (1995)
Rio Piracuama – Rio Paraíba do Sul – Tremembé/SP (1800m alt.)	50	-	0-1	6m+24sm+6st+14a	86	
Córrego Ribeirão Grande – Paraíba do Sul – Pindamonhangaba/SP (1800m alt.)	50	-	0-2	6m+22sm+10st+12a	88	Neo <i>et al.</i> (2000*)
Córrego Fazenda Lavrinha – Rio Paraíba do Sul – Campos do Jordão/SP	50	-	0-1	6m+22sm+10st+12a	88	Ferro <i>et al.</i> (2001; 2003)
Rio Macacos – Rio Paraíba do Sul – Cunha/SP	50	-	-	8m+20sm+8st+14a	86	Kavalco e Moreira-Filho (2003)
Córrego Barreiro Grande – Rio São Francisco – Três Marias/MG	50	-	-	6m+30sm+8st+6a	94	Moreira-Filho e Bertollo (1991);
Córrego Viveiro de Mudas - Rio São Francisco – Três Marias/MG	50	-	-	6m+30sm+8st+6a	94	Moreira-Filho e Bertollo (1991);
Córrego Curral das Éguas – Rio São Francisco – São Gonçalo do Abate/MG	46	-	-	6m+22sm+8st+10a		Moreira-Filho e Bertollo (1991);
Rio Jacu – Vitor Hugo/ES	50	-	0-4	6m+8sm+36a	64	Rocon-Stange e Almeida Toledo (1993)
Córrego Cambeba – Rio São Francisco – Arcos/MG	50	-	-	8m+20sm+6st+16a	84	Biavati e Maistro, 2007
Rio Machado – Rio Grande – São João da Mata/MG	50	-	-	6m+28sm+6st+10a	90	Biavati e Maistro, 2007
Córrego Pedra Branca – Alfenas/MG	50	-	-	6m+24sm+8st+12a	88	Biavati e Maistro, 2007
Rio Verde – Rio Tibagi – Castro/PR	50	-	-	8m+18sm+10st+14a	86	Vicari <i>et al.</i> (2008a)
Rio Açungui – Rio Ribeira do Iguape	50	-	-	8m+18sm+10st+14a	86	Vicari <i>et al.</i> (2008a)

<i>Astyanax schubarti</i>	Rio Jaguariaíva – Parque Estadual do Cerrado	48	-	-	10m+16sm+10st+12a	84	Vicari <i>et al.</i> (2008a)
	Rio Santo Antônio – Parque Estadual do Cerrado	50	-	-	8m+18sm+10st+14a	86	Vicari <i>et al.</i> (2008a)
		48	-	-	10m+16sm+10st+12a	84	Vicari <i>et al.</i> (2008a)
	Rio Mogi-Guaçu – Alto Rio Paraná – Pirassununga/SP	36	-	-	14m+14sm+6st+2a	70	Morelli <i>et al.</i> (1983a)
		-	54	-	21m+21sm+9st+3a	105	
<i>Astyanax</i> sp. Aff <i>fasciatus</i>		36	-	-	14m+14sm+6st+2a	70	Moreira-Filho <i>et al.</i> (2001)
	Rio Paraná – Posadas, Misiones - Argentina	36	-	-	14m+14sm+6st+2a	70	Alberdi e Fenocchio (1997)
	Furna 1 – Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	48	-	-	6m+18sm+14st+10a	86	Matoso <i>et al.</i> (2002)
	Furna 2 - Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	48	-	-	6m+18sm+14st+10a	86	Gross <i>et al.</i> (2004)
	Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	48	-	-	6m+18sm+14st+10a	86	Artoni <i>et al.</i> (2006)
		50	-	-	8m+18sm+14st+10a	90	
	Lagoa Dourada – Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	48	-	-	6m+18sm+14st+10a	86	
		50	-	-	8m+18sm+14st+10a	90	
	Rio Cará-Cará - Rio Tibagi – Ponta Grossa/PR	48	-	-	6m+18sm+14st+10a	86	
		49	-	-	7m+18sm+14st+10a	88	

		50	-	-	8m+18sm+14st+10a	90	
<i>Astyanax</i> sp. B	Salto Caxias – Rio Iguaçu	50	-	0-2	6m+24sm+6st+14a	86	Fazoli <i>et al.</i> (2003)
	Rio Iguaçu – Piraquara/PR	50	-	-	4m+22sm+8st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2008a)
<i>Astyanax</i> sp. C	Rio Iguaçu – São José dos Pinhais/PR	50	-	-	4m+22sm+8st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2003)
	Rio Iguaçu – Piraquara/PR	50	-	-	4m+22sm+8st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2003); Kantek <i>et al.</i> (2008a)
<i>Astyanax</i> sp. D	Rio Iguaçu – Piraquara/PR	50	-	-	4m+24sm+6st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2007)
	Rio Bicudo – Balsa Nova/PR	50	-	-	4m+24sm+6st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2008a); Kantek <i>et al.</i> (2008b)
	Poço Rio Claro – Alto Rio Iguaçu	50	-	-	4m+24sm+6st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2008b)
	Córrego a esquerda do Alto Rio Iguaçu	50	-	-	4m+24sm+6st+16a	84	Kantek <i>et al.</i> (2008b)
<i>Bryconamericus</i> aff <i>exodon</i>	Córrego Três Bocas – Rio Tibagi/PR	52	-	-	16m+12sm+6st+18a	86	Paintner-Marques <i>et al.</i> (2002a)
		52	-	-	10m+24sm+6st+12a	92	
<i>Bryconamericus</i> aff <i>ilheringii</i>	Rio Água da Floresta – Rio Tibagi/PR	52	-	-	8m+22sm+10st+12a	92	Paintner-Marques <i>et al.</i> (2003)
	Córrego Maringá – Rio Paranapanema/PR	52	-	-	12m+18sm+8st+14a	90	Capistano <i>et al.</i> (2008)
	Rio Keller – Rio Ivaí/PR	52	-	-	8m+28sm+6st+10a	94	Capistano <i>et al.</i> (2008); Portela-Castro <i>et al.</i> (2008)
		52	-	-	12m+18sm+8st+14a	90	Portela-Castro <i>et al.</i> (2008)

	Córrego Tatupeba– Rio Ivaí/PR	52	-	-	8m+20sm+8st+16a	88	Capistano <i>et al.</i> (2008)
<i>Bryconamericus</i> sp. A	Rio Piracicaba - Piracicaba/SP	52	-	-	6m+30sm+6st+10a	94	Wasko <i>et al.</i> (1996); Wasko e Galetti (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Rio Piracicaba - Piracicaba/SP	52	-	-	6m+10sm+20st+16a	88	Wasko e Galetti (1998)
		52	-	-	16m/sm+18st+18a	86	Wasko <i>et al.</i> (1996)
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Ribeirão Três Bocas – Rio Tibagi - Sertãoópolis/PR	52	-	-	6m+18sm+14st+14a	90	Wasko e Galetti (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Córrego Avoadeira – Rio Garças – Barra do Garças/MT	52	-	-	8m+14sm+16st+14a	90	Wasko e Galetti (1998)
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Córrego Avoadeira – Rio Garças – Barra do Garças /MT	54	-	-	10m+16sm+22st+6a	102	Wasko e Galetti (1998)
<i>Bryconamericus stramineus</i>	Rio Mogi-Guaçu – Pirassununga/SP	52	-	-	26m/sm+26st/a		Portela <i>et al.</i> (1988)
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	Córrego São Francisco – Rio Branco/AC	50	-	-	10m+6sm+34st	100	Carvalho <i>et al.</i> (2002a)
<i>Deuterodon pedri</i>	Rio Ipiranga – Registro/SP	50	-	-	14m/sm+36st/a		Portela <i>et al.</i> (1988)
<i>Exodon paradoxus</i>	Rio Araguaia – Barra do Garças/MT	52	-	-	2m+4sm+10st+36a	68	Venere <i>et al.</i> (1997)
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Rio Miranda – Corumbá/MS	48	-	-			Carvalho <i>et al.</i> (2002b)
	Rio Paraná – Posadas, Misiones - Argentina	50	-	-	14m+12sm+6st+18a	82	Alberdi e Fenocchio (1997)
<i>Hasemania nana</i>	Rio São Francisco – Três Marias, MG	50	-	-	8m+42sm	100	Peres <i>et al.</i> (2008)
<i>Hasemania marginata</i>		50	-	-	12m+18sm+10st+10a	90	Arefjev (1990)

<i>Hemigrammus marginatus</i>	Rio Paraná – Porto Rico/PR	50	-	-	10m+34sm+6a	94	Portela-Castro e Júlio Jr. (2002)
<i>Hemigrammus hyanuary</i>		52	-	-	22m/sm+30st/a		Arefjev (1990)
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	Rio Grande – Paranapiacaba/SP	50	-	-	10m+12sm+28st	100	Carvalho <i>et al.</i> (2002a)
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	Rio Piracuama – Rio Paraíba do Sul	50	-	-	6m+16sm+12st+16a	84	Centofante <i>et al.</i> (2003a)
	Córrego Perdizes – Rio Sapucaí	50	-	-	6m+16sm+12st+16a	84	Centofante <i>et al.</i> (2003a)
<i>Hyphessobrycon griemi</i>	Rio Itimirim – Iguape/SP	48	-	-			Carvalho <i>et al.</i> (2002b)
<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>		52	-	-	10m/sm+42st/a		Arefjev (1990)
<i>Hyphessobrycon flammeus</i>		52	-	-	18m/sm+32st+2a	102	Arefjev (1990)
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	Rio Juquiá – São Lourenço da Serra/SP	50	-	-	14m+20sm+16st	100	Carvalho <i>et al.</i> (2002a)
	Rio Itimirim – Iguape/SP	50	-	-			Carvalho <i>et al.</i> (2002b)
<i>Hyphessobrycon scholzei</i>		50			8m+20sm+8st+14a	84	Arefjev (1990)
<i>Markiana nigripinnis</i>	Rio Miranda – Corumbá/MS	52	-	-			Carvalho <i>et al.</i> (2002b)
<i>Moenkhausia costae</i>	Rio São Francisco – Três Marias/MG	50	-	-	50m/sm	100	Portela <i>et al.</i> (1988)
<i>Moenkhausia intermedia</i>	Rio Paraná – Porto Rico/PR	50	-	-	16m+34sm	100	Portela-Castro e Júlio Jr. (2002)
	Lagoa do Mato – Luis Antonio, SP	50	-	0-1	50m/sm	100	Portela <i>et al.</i> (1988)

<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Rio Paraná –Porto Rico /PR	50	-	1-2	12m+36sm+2st	100	Portela-Castro e Júlio Jr (2002)
	Rio Capivara – Rio Tietê – Botucatu/SP	50	-	1-8	48m/sm+2a	98	Foresti <i>et al.</i> (1989)
	Rio Paraná – Posadas, Misiones - Argentina	50	-	0-3	48m/sm+2st/a		Alberdi e Fenocchio (1997)
<i>Nematobrycon palmeri</i>		50	-	-	8m/sm+10st+32a	68	Arefjev (1990)
<i>Oligosarcus cf. paranensis</i>	Rio Keller – Maringá/PR	50	-	-	2m+26sm+8st+14a	86	Martinez <i>et al.</i> (2004)
	Rio Mourão – Maringá/PR	50	-	-	2m+26sm+8st+14a	86	Martinez <i>et al.</i> (2004)
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Rio Paraitinga – Rio Paraíba do Sul	50	-	-	6m+10sm+16st+18a	82	Kavalco <i>et al.</i> (2005)
	Córrego de Jacuí – Rio Paraíba do Sul	50	-	-	6m+10sm+16st+18a	82	Kavalco <i>et al.</i> (2005)
	Córrego Grande – Rio Paraíba do Sul	50	-	-	6m+12sm+14st+18a	82	Centofante <i>et al.</i> (2006)
	Córrego Santo Antônio – Rio Paraíba do Sul	50	-	-	4m+12sm+16st+18a	82	Centofante <i>et al.</i> (2006)
	Rio Paraíba do Sul/SP	50	-	-	2m+16sm+16st+16a	84	Hattori <i>et al.</i> (2007)
	Rio Itimirim – Iguape/SP	50	-	-			Carvalho <i>et al.</i> (2002b)
	Riu Juquiá ; Rio Ipiranga/SP	50	-	-	28m/sm+22st/a		Falcão e Bertollo (1985)
<i>Oligosarcus jemynsii</i>	Rio Uruguay/SC	50	-	-	2m+24sm+10st+14a	86	Hattori <i>et al.</i> (2007)
	Rio Ipiranga/SP; Vale do Rio Doce/MG	50	-	-	28m/sm+22st/a		Falcão e Bertollo (1985)

<i>Oligosarcus longirostris</i>	Rio Iguaçu – Três Barras/PR	50	-	-	2m+20sm+10st+18a	82	Martinez <i>et al.</i> (2004)
	Rio Iguaçu – Quedas do Iguaçu/PR	50	-	-	4m+10sm+16st+20a	80	Rubert e Margarido (2007)
<i>Oligosarcus macrolepis</i>	Rio Turvo/MG	50	-	-	28m/sm+22st/a		Falcão e Bertollo (1985)
<i>Oligosarcus paranensis</i>	Rio Tunas – Nova Laranjeiras/PR	50	-	-	4m+10sm+16st+20a	80	Rubert e Margarido (2007)
<i>Oligosarcus pintoii</i>	Rio Tunas – Nova Laranjeiras/PR	50	-	-	4m+10sm+16st+20a	80	Rubert e Margarido (2007)
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	-	-	2m+20sm+12st+16a	84	Hattori <i>et al.</i> (2007)
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	-	-	24m/sm+26st/a		Falcão e Bertollo (1985)
<i>Piabina argentea</i>	Rio Mogi-Guaçu – Pirassununga/SP	52	-	-	26m/sm+26st/a		Portela <i>et al.</i> (1988)
	Rio São Francisco – Três Marias/ MG	52	-	-	8m+14sm+16st+14a	90	Peres <i>et al.</i> (2008)
<i>Prionobrama filigera</i>		52	-	-	12m/sm+40st/a		Arefjev (1990)
<i>Salmimus brasiliensis</i>	Rio Mogi-Guaçu – Pirassununga/SP; Rio São Francisco – Três Marias/MG	50	-	-	10m+20sm+20st/a		Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>Salmimus hilarii</i>	Rio Mogi-Guaçu – Pirassununga/SP	50	-	-	12m+18sm+20st	100	Margarido e Galetti-Jr (1999)
	Rio Mogi-Guaçu – Pirassununga/SP; Rio São Francisco – Três Marias/MG; Rio Araguaia Barra do Garças/MT	50	-	-	10m+20sm+20st/a		Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>Triportheus elongatus</i> cf	Rio Araguaia – Barra do Garças/MT	52	-	-	52m/sm, ZZ/ZW	104	Artoni <i>et al.</i> (2001)
<i>Triportheus guentheri</i>	Rio São Francisco – Três Marias/MG	52	-	-	52m/sm, ZZ/ZW	104	Artoni <i>et al.</i> (2001)

<i>Triportheus nematurus</i>	Rio Piracicaba – Serra de Santa Maria/SP	52	-	-	14m+22sm+16st, ZW (machos)	104	Diniz <i>et al.</i> (2008)
<i>Triportheus paranaensis</i>	Rio Paraná – Corrientes – Argentina	52	-	-	13m+23sm+16st, ZZ (fêmeas) 24m+22sm+4st+ZZ/ZW	104	Sánchez e Jorge (1999)
	Rio Cuiabá – Cuiabá/MT	52	-	-	52m/sm, ZZ/ZW	104	Artoni <i>et al.</i> (2001)
	Rio Paraguai – Corumbá/MS	52	-	-	52m/sm, ZZ/ZW	104	Artoni <i>et al.</i> (2001)
<i>Triportheus venezuelensis</i>	Lago Castillero – Caicara del Orinoco – Venezuela	52	-	-	20m+16sm+16st, ZW (fêmeas) 20m+16sm+16st, ZZ (machos)	104	Nirchio <i>et al.</i> (2007)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo geral caracterizar citogeneticamente quatro espécies da família Characidae, do grupo Incertae Sedis, visando contribuir com mais informações a respeito desse grupo de peixes e, dessa forma, auxiliar os estudos filogenéticos e a classificação taxonômica das espécies que se encontram dentro do grupo Incertae sedis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o cariótipo de quatro espécies de peixes da família Characidae, grupo incertae sedis, pertencentes ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS, da bacia do Tramandaí/RS e da bacia do rio Tibagi/PR.
- Detectar a localização das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação por nitrato de prata e da hibridação fluorescente in situ com sonda de DNAr 18S.
- Analisar o padrão de distribuição da heterocromatina.
- Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e AT.
- Interpretar os dados obtidos visando uma maior compreensão da evolução cariotípica do grupo em estudo.

3 ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA

Para o presente trabalho foram estudadas 4 espécies de peixes pertencentes ao grupo Incertae Sedis da família Characidae: *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Hyphessobrycon luetkenni* (Figura 1). Essas espécies foram coletadas em distintas bacias hidrográficas:

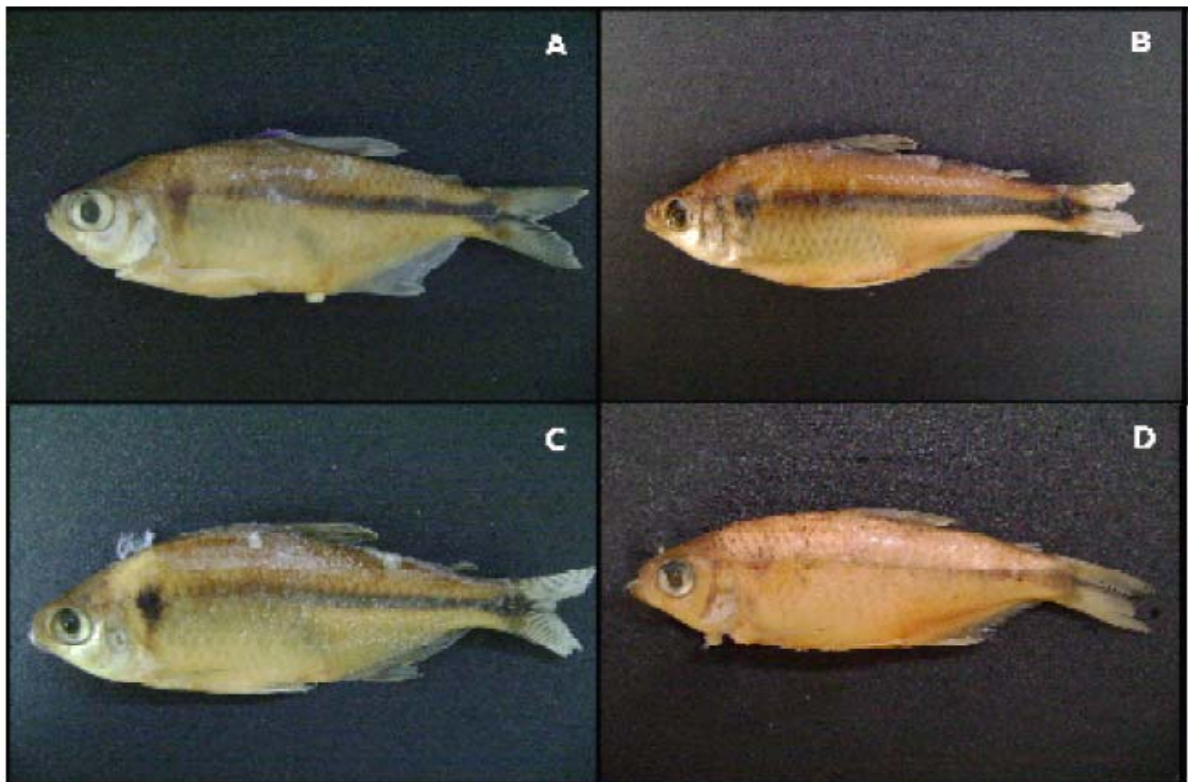


Figura 1 – Foto das espécies coletadas: (A) *Astyanax eigenmanniorum*, (B) *Deuterodon stigmaturus*, (C) *Hyphessobrycon luetkenni* e (D) *Hyphessobrycon anisitsi*.

3.1 SISTEMA HIDROGRÁFICO DA LAGUNA DOS PATOS/RS

- Saco da Alemoa (Figura 2): *Astyanax eigenmanniorum*,
Hyphessobrycon luetkenni
- Rio Forquetinho/Pinheirinho (Figura 2): *Hyphessobrycon luetkenni*

3.2 BACIA DO TRAMANDAÍ/RS

- Rio Maquiné (Figura 2): *Deuterodon stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni*.



Figura 2 – Imagens de Satélite da Bacia da Lagoa dos Patos e do Tramandaí/RS, indicando os locais de coleta. Fonte: Google Earth.

3.2.1 Bacia do Rio Tibagi/PR

Nesta bacia foi coletada a espécie *Hyphessobrycon anisitsi*, no Ribeirão Cambé, Londrina, PR (Figura 3).

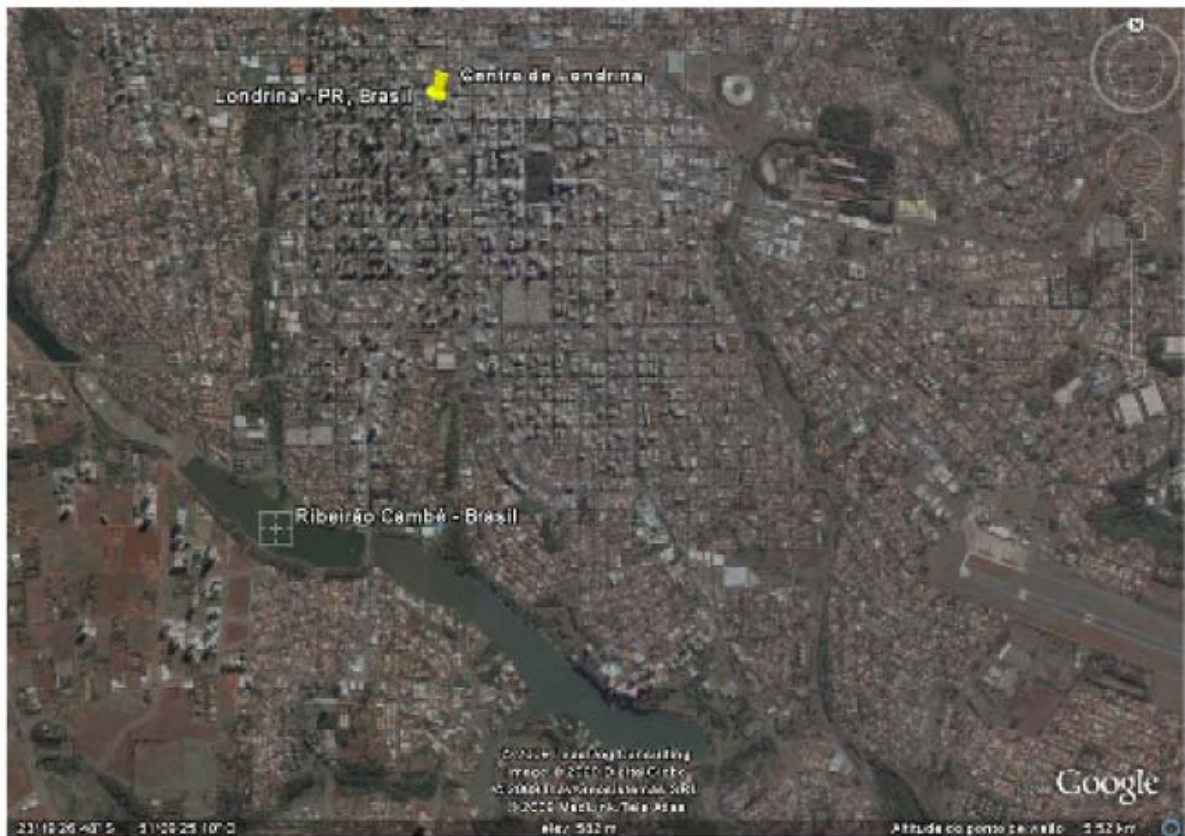


Figura 3 – Imagens de satélite do local de coleta Ribeirão Cambé, pertencente à Bacia do Rio Tibagi. Fonte: Google Earth.

CAPÍTULO I

1.1 ANÁLISE DO CARIÓTIPO E DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA *HETEROCROMATINA* DE QUATRO ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS

Este artigo será enviado para a revista Neotropical ichthyology.

ANÁLISE DO CARIÓTIPO E DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA *HETEROCROMATINA* DE QUATRO
ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS

**Michelli Maria Mendes¹, Lúcia Giuliano-Caetano², Ana Lúcia Dias¹, Luiz Roberto
Malabarba¹**

Resumo

Foram realizadas análises citogenéticas de quatro espécies de peixes da família Characidae, do grupo Incertae Sedis: *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon luetkenni* e *Hyphessobrycon anisitsi*, coletadas em diferentes bacias hidrográficas, sendo que as duas primeiras espécies foram coletadas em sua localidade tipo. Este trabalho também apresentou os primeiros dados citogenéticos para *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*. O número cromossômico diplóide 48 foi observado apenas em *A. eigenmanniorum* e as demais espécies apresentaram $2n=50$ cromossomos. Todas mostraram diferentes fórmulas cariotípicas. A *heterocromatina* foi observada distribuída fracamente pela região pericentromérica das espécies *A. eigenmanniorum*, *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*. Em *H. anisitsi* a *heterocromatina* se apresentou mais abundante distribuída pela região pericentromérica e terminal dos cromossomos, sendo que três pares cromossômicos apresentaram blocos heterocromáticos mais evidentes. Os resultados obtidos confirmam a variabilidade cariotípica tão comum neste grupo de peixes e mostram que, diferentes espécies oriundas de bacias hidrográficas seguramente isoladas, mantêm um nível elevado de diferenciação cariotípica principalmente quanto à estrutura cromossômica e ao padrão de distribuição da heterocromatina.

Palavras-chaves: Banda C. Incertae sedis. Localidade tipo. Variabilidade cariotípica.

Introdução

A família Characidae contém a maior diversidade da ordem Characiformes, com cerca de 950 espécies de peixes descritas (Reis et al., 2003). Seus representantes encontram-se distribuídos desde os Estados Unidos até o sul da Argentina, sendo encontrados também no continente africano (Lucena, 1993). Além da ampla distribuição geográfica e da grande quantidade de espécies, existe uma grande diversidade biológica e morfológica entre os representantes desta família (Graça & Pavanelli, 2007).

A família Characidae era constituída por 13 subfamílias, sendo que a maioria dos gêneros desta família estavam incluídos na subfamília *Tetragonopterinae*. Entretanto, a ausência de evidências que esta subfamília constituía um grupo monofilético, fez

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil

² Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

com que esses gêneros fossem recentemente colocados dentro de um grupo Incertae Sedis por Lima et al. (2003), com base em trabalhos de sistemática filogenética.

Dos 88 gêneros da família Characidae pertencentes ao grupo Incertae Sedis, apenas 18, ou seja, 20,45% possuem algum estudo citogenético. Dessa forma, pouco é conhecido sobre a estrutura cariotípica deste grupo, e a literatura está praticamente limitada ao gênero *Astyanax*, para o qual uma ampla variabilidade numérica e morfológica é bastante evidente (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Malacrida et al. 2003; Pazza et al., 2006; Hashimoto et al., 2008, entre outros).

Além de *Astyanax*, os demais gêneros pertencentes ao grupo Incertae Sedis, Characidae, que possuem estudos citogenéticos são: *Bryconamericus*, *Ctenobrycon*, *Deuterodon*, *Exodon*, *Gymnocorymbus*, *Hasemania*, *Hemigrammus*, *Hollandichthys*, *Hyphessobrycon*, *Markiana*, *Moenkhausia*, *Nematobrycon*, *Oligosarcus*, *Piabina*, *Prionobrama*, *Salminus* e *Triportheus*. A maioria desses estudos só se refere ao número diplóide, mas já demonstram uma variabilidade cariotípica, como a ocorrência de diferentes citótipos no gênero *Bryconamericus* (Paintner-Marques et al., 2002; Capistano et al., 2008), presença de cromossomos B no gênero *Moenkhausia* (Foresti et al., 1989; Portela Castro et al., 2001), ocorrência de cromossomos sexuais no gênero *Triportheus* (Artoni & Bertollo, 2001; Nirchio et al., 2007; Diniz et al., 2008), diferentes padrões de distribuição da *heterocromatina* em *Oligosarcus* (Rubert & Margarido, 2007; Hattori et al. 2007), entre outros exemplos.

O número cromossômico diplóide nas espécies desses gêneros varia de 36 em *Astyanax schubarti* (Morelli et al., 1983) a 54 em *Bryconamericus* sp E (Wasko & Galetti Jr. 1998), sendo que os números diplóides 50 e 52 são os mais constantes. Portela et al. (1988) sugeriram que o cariótipo ancestral da antiga subfamília *Tetragonopterinae*, cuja maioria dos seus representantes pertencem atualmente ao grupo Incertae Sedis, é $2n=50$ cromossomos meta e submetacêntricos.

Dada a grande variabilidade cariotípica entre os gêneros da família Characidae, do grupo Incertae Sedis, nosso trabalho teve por objetivo caracterizar o cariótipo e determinar o padrão de distribuição da *heterocromatina* de quatro espécies deste grupo de peixes, de diferentes bacias hidrográficas.

Material e Métodos

Para o presente trabalho foram estudadas 4 espécies de peixes pertencentes a família Characidae, do grupo Incertae Sedis: 11 indivíduos (9 fêmeas e 2 machos) de *Astyanax eigenmanniorum* coletados na localidade tipo Saco da Alemoa/Sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS; 8 indivíduos (5 fêmeas e 3 machos) de *Deuterodon stigmaturus* coletados na localidade tipo Rio Maquiné/Sistema litorâneo Bacia do Tramandaí/RS; 18 exemplares de *Hyphessobrycon luetkenni*, sendo 3 machos coletados no Saco da Alemoa, Rio Forquetinho/Pinheirinho/Sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS e 7 fêmeas e 8 de sexo indefinido coletados no Rio Maquiné/Sistema litorâneo Bacia do Tramandaí/RS, e 13 indivíduos (6 machos e 7 fêmeas) de *Hyphessobrycon anisitsi* coletados no Ribeirão Cambé/bacia do rio Tibagi/PR.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional de Bertollo et al. (1978). A estimulação de mitoses foi realizada através da técnica de injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico, descrita por Lee & Elder (1980). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a), segundo Levan et al. (1964), com modificações. Para a determinação do padrão de distribuição da heterocromatina, foi utilizada a técnica de banda C, de acordo com Sumner (1972).

Resultados

Hyphessobrycon anisitsi *H. anisitsi* apresentou $2n=50$, sendo a fórmula cariotípica constituída por $18m+10sm+6st+16a$ e número fundamental igual a 84 (Fig. 1A). Pela técnica de banda C a heterocromatina apresentou-se distribuída pela região pericentromérica de todos os cromossomos, na região terminal do braço longo de alguns cromossomos e também como blocos mais evidentes na região terminal do braço curto de dois pares cromossômicos metacêntricos, (3 e 6) e no braço longo de um par cromossômico acrocêntrico, o par 23 (Fig. 1B).

Hyphessobrycon luetkenni

H. luetkenii apresentou $2n=50$, sendo a fórmula cariotípica constituída por $6m+8sm+36a$, com um número fundamental igual a 64 (Fig. 2A). A heterocromatina mostrou-se distribuída na região pericentromérica na maioria dos cromossomos do complemento cariotípico (Fig. 3A).

Deuterodon stigmaturus

D. stigmaturus apresentou $2n=50$ cromossomos sendo a fórmula cariotípica constituída por $8m+6sm+2st+34a$, com número fundamental igual a 66 (Fig. 2B). A heterocromatina apresentou-se fracamente distribuída pela região pericentromérica de todo o complemento cariotípico (Fig. 3B).

Astyanax eigenmanniorum

A. eigenmanniorum apresentou $2n=48$, distribuídos em $10m+16sm+10st+12a$, com número fundamental (NF) igual a 84 (Fig. 2C). Pela técnica de banda C esta espécie apresentou heterocromatina fracamente distribuída na região pericentromérica de todos os cromossomos (Fig. 3C).

Na tabela abaixo estão sumarizados os resultados obtidos para as 4 espécies.

Tabela1 – Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho ($2n$ =número diplóide; NF=número fundamental).

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	NF	Padrão de Banda C
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	50	$18m+10sm+6st+16a$	84	Pericentromérica, terminal, com alguns blocos mais evidentes
<i>Hyphessobrycon luetkenii</i>	50	$6m+8sm+36a$	64	Pericentromérica
<i>Deuterodon stigmaturus</i>	50	$8m+6sm+2st+34a$	66	Pericentromérica
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	48	$10m+16sm+10st+12a$	84	Pericentromérica

Discussão

No presente trabalho foram analisados representantes de *Deuterodon stigmaturus* e *Astyanax eigenmanniorum* coletados na localidade tipo, e apresentados os primeiros dados citogenéticos para *D. stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni*.

O número cromossômico diplóide igual a 50 foi observado para *Hyphessobrycon anisitsi*, *H. luetkenni* e *Deuterodon stigmaturus*, e corresponde ao valor mais frequente na família Characidae, estando presente, por exemplo, em outras populações e espécies já estudadas do gênero *Hyphessobrycon*, como *H. anisitsi* das populações dos rios Piracuama e Perdizes (Centofante et al., 2003a), *H. herbertaxelrodi* e *H. flammeus* (Arefjev, 1990) e também em outras espécies do grupo, como por exemplo, dos gêneros *Moenkhausia* (Portela et al., 1988; Foresti et al., 1989; Portela-Castro & Júlio Jr., 2002), *Oligosarcus* (Martinez et al., 2004; Kavalco et al., 2005; Rubert & Margarido, 2007), *Salminus* (Margarido & Galetti-Jr, 1999; Souza et al., 2008), *Astyanax* (Pacheco et al., 2001; Kavalco & Moreira-Filho, 2003; Pamponet et al., 2008), entre outros. Entre as espécies do gênero *Deuterodon*, somente *D. pedri* possui algum estudo citogenético, e o número cromossômico diplóide observado também foi igual 50 (Portela et al., 1988).

Uma observação interessante em *D. stigmaturus* e *H. luetkenni* foi a presença da grande quantidade de cromossomos acrocêntricos, uma característica pouco comum entre os representantes deste grupo de peixes, mas que também já foi observada em *Ctenobrycon hauxwellianus* (Carvalho et al., 2002), *Deuterodon pedri* (Portela et al., 1988) e *Exodon paradoxus* (Venere et al., 1997). Portela et al. (1988) sugeriram que o cariótipo ancestral da antiga subfamília *Tetragonopterinae* seria de $2n=50$ cromossomos meta e submetacêntricos. Portanto, estas espécies com maior número de cromossomos acrocêntricos poderiam ser consideradas mais derivadas, devido ao acúmulo de rearranjos cromossômicos ao longo do processo de diferenciação cariotípica para estas populações.

Hyphessobrycon anisitsi do Ribeirão Cambé mostrou $18m+10sm+6st+16a$, constituição bem diferente de *H. luetkenni* e das populações analisadas por Centofante et al. (2003a), que encontraram $6m+16sm+12st+16a$ para *H. anisitsi* do rio Piracuama e do rio Perdizes, entretanto, o número fundamental (NF) igual a 84 é o mesmo, pois a quantidade de cromossomos com um e dois braços é idêntica. A variação observada entre os tipos cromossômicos das populações do Ribeirão Cambé e as analisadas por Centofante et al. (2003a), sem alteração do NF, pode ser devida a ocorrência de inversões pericêntricas em

cromossomos metacêntricos, originando cromossomos submetacentrô e submetelocêntricos, sugerindo uma evolução cariotípica divergente neste grupo de peixes.

Astyanax eigenmanniorum apresentou $2n=48$ cromossomos, assim como *A. fasciatus* (Pazza et al., 2006), *A. parahybae* (Centofante et al., 2003b; Kavalco & Moreira-Filho, 2003), algumas populações de *A. scabripinnis* (Fernandes & Martins-Santos, 2003; Malacrida et al., 2003; Vicari et al., 2008) e uma outra população desta mesma espécie, do córrego Caetano, Uberlândia/MG, analisada por Torres Mariano & Morelli (2008), porém com fórmula cariotípica diferente da encontrada neste trabalho. A população de *Astyanax eigenmanniorum* de Minas Gerais apresentou $14m+18sm+10st+6a$, constituída por um número maior de cromossomos meta e submetacentrô (32), comparando com os resultados obtidos neste trabalho (26 cromossomos). Torres Mariano e Morelli (2008) também evidenciaram de 0 a 2 cromossomos B que não foram observados na população aqui analisada. Em *Astyanax eigenmanniorum* da Laguna dos Patos, o primeiro par metacêntrico não apresentou um tamanho muito maior do que os outros cromossomos do complemento cariotípico, a qual é uma característica que é compartilhada por muitos caracídeos e que foi observada na população dessa espécie estudada por Torres-Mariano & Morelli (2008).

Em relação à heterocromatina a população de *Astyanax eigenmanniorum* da Laguna dos Patos apresentou heterocromatina fracamente distribuída pela região pericentromérica de todos os cromossomos, enquanto que *A. eigenmanniorum* estudada por Torres-Mariano & Morelli (2008) apresentou a heterocromatina distribuída pelas regiões terminais e/ ou centroméricas. Observando as diferenças cariotípicas encontradas entre a população de *Astyanax eigenmanniorum* do presente trabalho e da população do Córrego Caetano/MG pode-se sugerir que esta última, provavelmente, pertença a uma espécie diferente, pois as grandes diferenças cariotípicas encontradas entre essas duas populações corroboram com o que foi descrito por Lima et al. (2003), restringindo a ocorrência de *A. eigenmanniorum* à região sul do Brasil.

Deuterodon stigmaturus e *Hyphessobrycon luetkenni* também apresentaram heterocromatina fracamente distribuída pela região pericentromérica de todos os cromossomos. *Hyphessobrycon anisitsi* mostrou um padrão de distribuição da heterocromatina completamente diferente das 3 outras espécies analisadas. Em *H. anisitsi* a heterocromatina é mais abundante e, além da sua presença nas regiões pericentromérica e terminal da maioria dos cromossomos do cariótipo, também está presente na forma de blocos terminais mais evidentes em 3 pares cromossômicos.

De acordo com Margarido & Galetti Jr. (1999) o padrão de distribuição da *heterocromatina* é útil na caracterização e diferenciação de algumas espécies. No presente estudo, pode ser observado que as 3 espécies que possuem o mesmo padrão heterocromático pertencem às mesmas bacias hidrográficas, enquanto que *H. anisitsi*, que pertence à bacia do rio Tibagi/PR, possui uma distribuição de heterocromatina totalmente diferente das demais, inclusive da outra espécie de mesmo gênero, *H. luetkenni*. Centofante et al. (2003a) encontraram características semelhantes para a distribuição da *heterocromatina* nas populações de *H. anisitsi* dos rios Perdizes e Piracuama entretanto, estes autores encontraram um maior número de pares cromossômicos com fortes blocos terminais heterocromáticos do que a população do Ribeirão Cambé, sendo 11 para a população de Piracuama e 12 para a população de Perdizes. Portanto, a *heterocromatina* pode estar diferenciando as espécies e as populações analisadas, podendo ser considerada um marcador citogenético.

A análise cariotípica realizada para *Hyphessobrycon luetkenni* das bacias da Laguna dos Patos e do Tramandaí apresentou dados idênticos, mostrando que esta espécie possui um cariótipo estável e, taxonomicamente, ela é uma espécie bem definida. Ao contrário de *H. anisitsi*, que não é bem delimitada taxonomicamente e apresenta diferenças cariotípicas entre as populações já estudadas e a do presente estudo, podendo estar ocorrendo mais de uma espécie, sendo, portanto necessária uma revisão taxonômica deste grupo de peixes.

O presente estudo contribui com mais informações para a citogenética da família Characidae, confirmando uma variabilidade cariotípica neste grupo de peixes e mostra que, diferentes espécies oriundas de bacias hidrográficas seguramente isoladas, mantêm um nível de diferenciação cariotípica quanto à estrutura cromossômica e ao padrão de distribuição da heterocromatina.

Referências

- Arefjev, V. A. 1990. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. *Caryologia*, 43 (3-4): 305-319.
- Artoni, R. F., J. D. N. Falcão, O. Moreira & L. A. C. Bertollo. 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Research*, 9: 449-456.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet*, 1: 103-120.

- Capistano, T. G., A. L. B. Portela-Castro & H. F. Julio-Jr. 2008. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivai Rivers, Paraná Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 203-207.
- Carvalho, M. L., C. Oliveira & F. Foresti. 2002. Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia* 55: 181-188.
- Centofante, L., L. A. C. Bertollo, C. S. Miyazawa & O. Moreira-Filho. (2003a) Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae). *Cytologia* 68: 283-288.
- Centofante, L.; L. A. C. Bertollo, A. J. Justi & O. Moreira-Filho. (2003b) Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). *Ichthyological Exploration Freshwaters*, 14: 361-368.
- Diniz, D., O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2008. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica*, 133: 85-91.
- Fernandes, C. A. & I. C. Martins-Santos. 2003 Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basin PR Brazil. *Cytologia*, 68: 289-293.
- Foresti, F., L. F. Almeida-Toledo & S. A. Toledo. 1989. Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79: 107-114.
- Graça, W. J. & C. S. Pavanelli. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. 1º edição: Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 241p.
- Hashimoto, D. T., V. R. Gonçalves, J. Bortolozzi, F. Foresti, F. Porto-Foresti. 2008 First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl): 275-278.
- Hattori, R. S., M. F. Z. Daniel-Silva & L. F. Almeida-Toledo. 2007 Karyotype characterization and gene mapping of 5S and 18 S rDNA in three species of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae). *Caryologia* 60: 372-378.
- Kavalco, K. F. & O. Moreira-Filho. 2003 Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia* 56: 453-461.

- Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2005. Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* 124: 85-91.
- Lee, M. R. & F. F. B. Elder. 1980. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenet. Cell. Genet.* 52: 36-40.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. P. Silva, R. P. Vari, H. Harold, R. Benine, O. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Cassati, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda, 2003. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R.E., S. O. Kullander, J. R. C. J. Ferraris, (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, 1st edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS.
- Lucena, C. A. S. 1993 Estudos filogenéticos da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osttahrarophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências – USP, São Paulo, 158p.
- Malacrida, A.C.P.; A. L. Dias & L. Giuliano-Caetano. 2003. Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay – PR. *Cytologia* 68: 267-270.
- Margarido, V. P. & P. M. Galetti Jr. 1999. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera Brycon and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 22: 357-361.
- Martinez, E.R.M., C. Oliveira & H. F. Júlio-Jr. 2004. Cytogenetic analysis of species of the genera *Acestrorhynchus*, *Oligosarcus* and *Rhaphiodon* (Teleostei: Characiformes). *Caryologia*, 57: 294-299.
- Morelli S., L. A. C. Bertollo, F. Foresti, O. Moreira-Filho & S. A. Toledo-Filho, S.A. 1983 Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I – Karyotypic variability. *Caryologia* 36: 235-244.
- Nirchio, M., C. Oliveira, I. A. Ferreira, A. Granado & E. Ron. 2007. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triporthus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 25-30.
- Pacheco, R.B., L. Giuliano-Caetano & A. L. Dias. 2001 Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chromosome Science* 5: 109-114

- Paintner-Marques, T.R., L. Giuliano-Caetano & A. L. Dias. 2002 Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus aff. Exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 67: 397- 402.
- Pamponet, V. C. C., P. L. S. Carneiro, P. R. A. M. Affonso, V. S. Miranda, J. C. Silva Jr., C. G. Oliveira & F. A. Gaiotto. 2008. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern. *Neotropical Ichthyology* 6(4): 621-630.
- Pazza, R., K. F. Kavalco & L. A. C Bertollo. 2006. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome Res* 112: 313-319.
- Portela, A.L.B.S., P. M. Galetti Jr., L. A. C. Bertollo. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, 11: 307-316.
- Portela-Castro, A. L. B., H. F. Júlio Jr. & P. B. Nishiyama. 2001. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110: 277-283.
- Portela-Castro, A.L.B. & H. F. Júlio Jr. 2002. Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. *Cytologia* 67: 329-336.
- Reis, R.E., S. O & Kullander, J. R. C. J. Ferraris (eds). 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, 1st edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS.
- Rubert, M. & V. P. Margarido. 2007. Cytogenetic studies in three species of the genus *Oligosarcus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 127-135.
- Salvador, L.B. & O. Moreira-Filho. 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69: 50-56.
- Souza, I. L., L. K. Santos-Silva, P. C. Venere & O. Moreira-Filho. 2008 Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* 39: 1036-1041.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

- Venere, P. C., S. C. Pfister, O. Moreira-Filho & P. M. Galetti Jr. 1997. Chromosomal characterization in Characinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). *Cytobios* 92: 123-131.
- Vicari, M. R., R. B. Noleto, R. F. Artoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (supp 1): 173-179.
- Torres-Mariano, A.R., S. Morelli, S. 2008. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology* 31: 246-249.
- Wasko, A. P., P. M. Galetti Jr. 1998. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios* 94: 185-193.

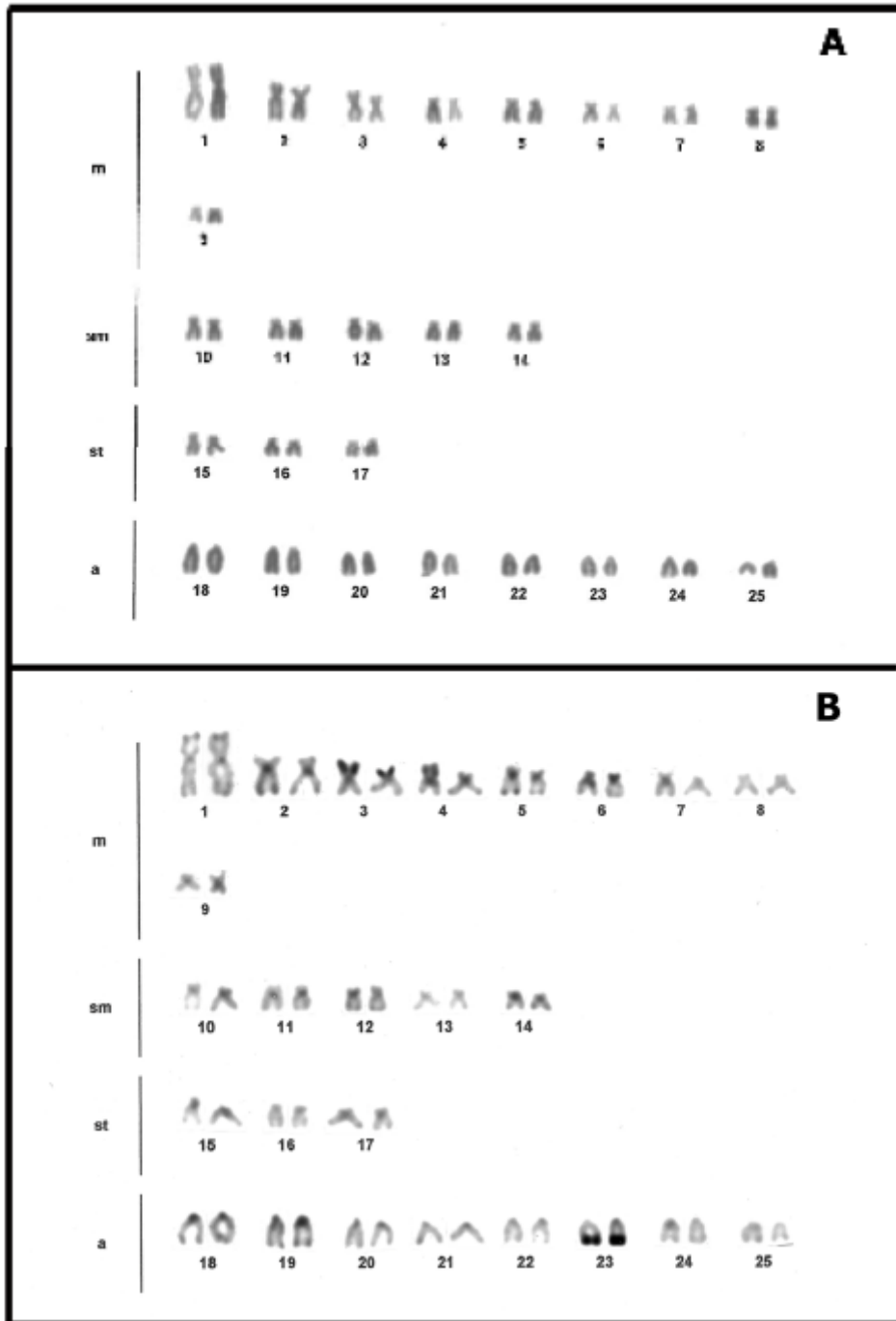


Figura 1 – Cariótipos de *Hyphessobrycon anisitsi*: (A) com coloração convencional com Giemsa e (B) com banda C.

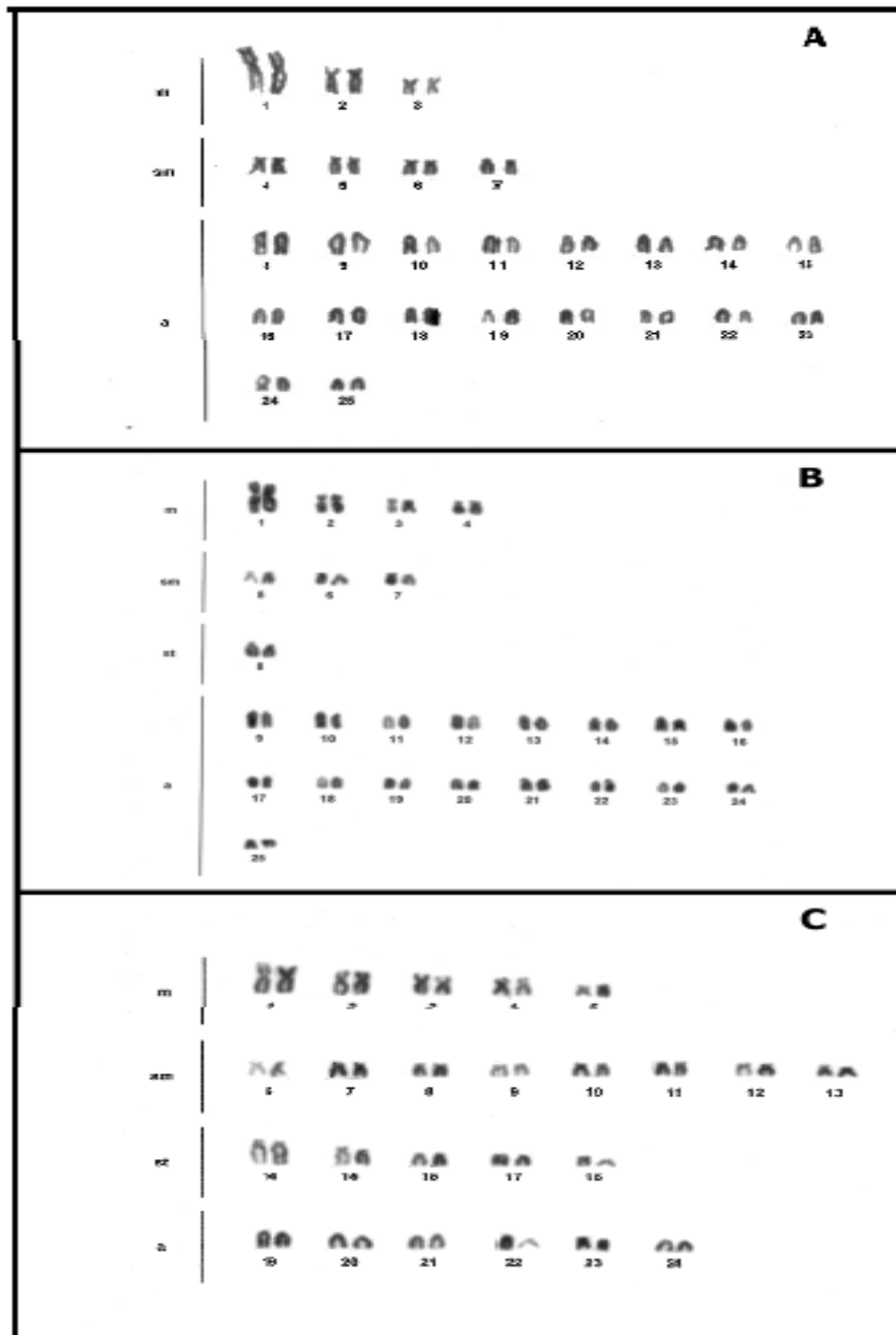


Figura 2 – Cariótipos com coloração convencional de Giemsa: (A) *Hyphessobrycon luetkenni*, (B) *Deuterodon stigmaturus* e (C) *Astyanax eigenmanniorum*.

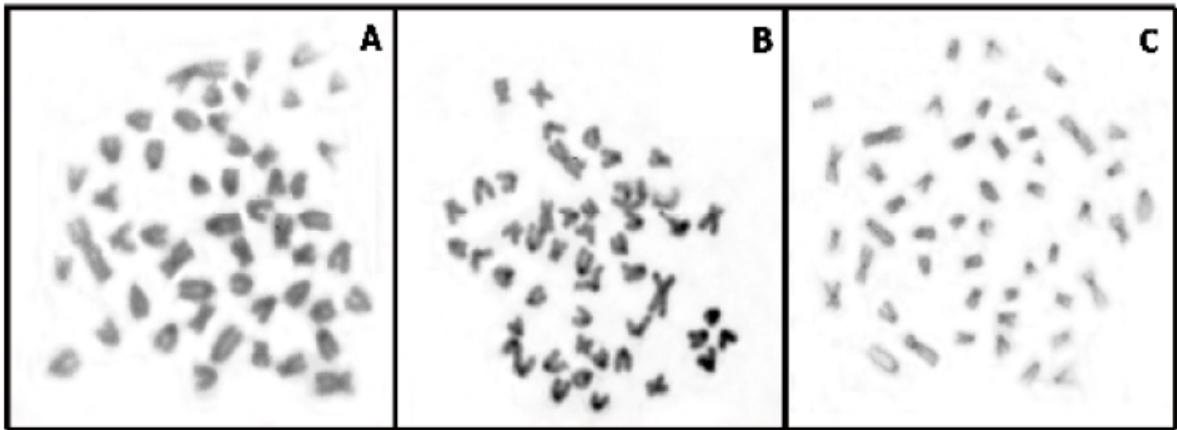


Figura 3 – Metáfases somáticas submetidas à técnica de banda C: (A) *Hyphessobrycon luetkenni*, (B) *Deuterodon stigmaturus* e (C) *Astyanax eigenmanniorum*, mostrando a heterocromatina pericentromérica.

CAPÍTULO II

2.1 VARIABILIDADE DE SÍTIOS AGNOR, CMA₃ E DNAR18S EM QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE

**Michelli Maria Mendes, Lúcia Giuliano-Caetano, Ana Lúcia Dias, Luiz Roberto
Malabarba**

Este artigo será enviado para a revista genetica.

VARIABILIDADE DE SÍTIOS AgNOR, CMA₃ E DNAr18S EM QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DA
FAMÍLIA CHARACIDAE

**Michelli Maria Mendes¹, Lúcia Giuliano-Caetano², Ana Lúcia Dias¹, Luiz Roberto
Malabarba¹**

Resumo

No presente estudo foram realizadas análises citogenéticas de quatro espécies de peixes da família Characidae: *Astyanax eigenmanniorum*, *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon luetkenni* e *Hyphessobrycon anisitsi*, coletadas em diferentes bacias hidrográficas, sendo que as duas primeiras espécies foram coletadas em sua localidade tipo. A impregnação pelo nitrato de prata mostrou que as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram múltiplas nas quatro espécies estudadas. *Deuterodon stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni* mostraram uma grande quantidade de sítios AgNOR sempre localizados no braço curto de cromossomos acrocêntricos, variando tanto inter quanto intraindividualmente. Em *D. stigmaturus* o FISH com a sonda de DNAr 18S evidenciou 8 sítios ribossômicos. A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI para *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*, mostrou pequenos sinais CMA₃ positivos coincidentes com as AgNORs. *A. eigenmanniorum* e *H. anisitsi* apresentaram sempre três cromossomos com AgNORs, que foram também correspondentes aos sítios 18S e CMA₃, entretanto, pode ser observada uma variação inter e intraindividual dos sítios CMA₃ positivos em ambas espécies e uma variação interindividual dos sítios de DNAr 18S em *A. eigenmanniorum*. Os dados apresentados indicam uma diversidade cariotípica quanto ao número e localização de sítios de DNAr 18S, NOR e CMA₃ entre as 4 espécies estudadas, confirmando uma variabilidade tão característica da família Characidae e mostram que, diferentes espécies oriundas de bacias hidrográficas seguramente isoladas, mantem um nível elevado de diferenciação cariotípica.

Palavras-chave: AgNOR. Characidae. CMA₃. FISH. Variabilidade cariotípica.

Introdução

O bandamento cromossômico tem sido útil para comparar diferentes espécies e/ou populações na família Characidae. A detecção de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por impregnação por nitrato de prata é uma técnica simples e amplamente utilizada para verificar a quantidade de NORs ativas em células de peixes. Na família Characidae as AgNORs podem ser simples, como por exemplo, nas espécies *Oligosarcus*

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil

² Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

logirostris (Rubert e Margarido, 2007), *Salminus brasiliensis* e *S. hilarii* (Souza et al., 2008), *Hyphessobrycon reticulatus* e *Hollandichthys multifasciatus* (Carvalho et al., 2002) quanto múltiplas, como, por exemplo, em *Astyanax altiparanae* (Pacheco et al., 2001), *A. scabripinnis* (Ferro et al. 2001) e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al., 1989), e em muitos casos ocorre variabilidade intra e interindividual, como, por exemplo, em *Bryconamericus aff iheringii* (Capistano et al., 2008) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2000; Malacrida et al., 2003; Souza et al., 2007; Vicari et al., 2008).

O fluorocromo cromomicina A₃ também é muito utilizado para analisar a quantidade e composição da *heterocromatina* em pares de bases GC. Em vários casos os sítios CMA₃ em Characidae são encontrados associados à AgNOR, como em *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. intermedia*, *Hemigrammus marginatus* (Portela-Castro e Júlio Jr., 2002), *Bryconamericus aff Exodon* (Paintner-Marques et al., 2002, *Salminus brasiliensis* e *S. hilarii* (Margarido e Galetti Jr., 1999; Souza et al., 2008).

A hibridação fluorescente in situ (FISH) utilizando sondas ribossomais também tem sido realizada neste grupo de peixes, principalmente no gênero *Astyanax*. Esta técnica também comprova a variabilidade inter e intra-específica dos sítios de DNAr que pode ser encontrada neste grupo de peixes, como por exemplo, em *Hyphessobrycon anisitsi* (Centofante et al., 2003), *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2005) e entre espécies do gênero *Oligosarcus* (Hattori et al., 2007).

Dada a grande variabilidade cariotípica entre os diferentes gêneros de Incertae Sedis, da família Characidae, este trabalho teve por objetivo caracterizar citogeneticamente 4 espécies de peixes da família Characidae, do grupo Incertae Sedis, de diferentes bacias hidrográficas, através de diferentes técnicas de bandamento cromossômico, tais como: AgNOR, CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

Material e Métodos

Para o presente trabalho foram estudadas 4 espécies de peixes pertencentes a família Characidae, do grupo Incertae Sedis: 11 indivíduos (9 fêmeas e 2 machos) de *Astyanax eigenmanniorum* coletados na localidade tipo Saco da Alemoa/Sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS; 8 indivíduos (5 fêmeas e 3 machos) de *Deuterodon stigmaturus* coletados na localidade tipo Rio Maquiné/Sistema litorâneo Bacia do Tramandaí/RS; 18 exemplares de *Hyphessobrycon luetkenni*, sendo 3 machos coletados no Saco da Alemoa, Rio Forquetinho/Pinheirinho/Sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS e 7 fêmeas e 8 de sexo

indefinido coletados no Rio Maquiné/Sistema litorâneo Bacia do Tramandaí/RS, e 13 indivíduos (6 machos e 7 fêmeas) de *Hyphessobrycon anisitsi* coletados no Ribeirão Cambé/bacia do rio Tibagi/PR.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica convencional de Bertollo et al. (1978). A estimulação de mitoses foi realizada através da técnica de injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico, descrita por Lee e Elder (1980). A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada pela impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980) e pela técnica de hibridação in situ, utilizando a sonda de DNAr 18S, obtida do peixe *Oreochromis niloticus*, realizada segundo Swarça et al. (2001). Para a determinação dos sítios ricos em pares de bases GC e AT foram utilizadas as técnicas de coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI (Schweizer, 1980), com modificações.

Resultados

Deuterodon stigmaturus

Em *D. stigmaturus* as regiões organizadoras de nucléolos mostrou variações intra e interindividuais, sendo observadas como pequenos sítios no braço curto de 4 a 7 cromossomos acrocêntricos (Figura 1a). Utilizando a técnica de FISH com a sonda de DNAr 18S, foram observados 8 cromossomos acrocêntricos com sinais fluorescentes na região terminal do braço curto (Figura 1c). A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI evidenciou pequenos sinais CMA₃ positivos nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos que se mostraram negativos para o fluorocromo DAPI (Figura 1b).

Hyphessobrycon luetkenni

Em *H. luetkenni* as regiões organizadoras de nucléolo variaram tanto inter quanto intraindividualmente, sendo observadas marcações nos braços curtos de 2 a 9 cromossomos acrocêntricos (Figura 1d). Após o tratamento com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, foram observados pequenos sítios CMA₃ positivos no braço curto de cromossomos acrocêntricos, que se mostraram DAPI negativos (Figura 1e).

Astyanax eigenmanniorum

Em *A. eigenmanniorum* foram visualizados sempre 3 cromossomos subtelocêntricos médios portadores da AgNOR no braço curto (Figura 2a).

A técnica de hibridação fluorescente in situ (FISH) mostrou uma variação interindividual em relação à posição desses sítios ribossômicos: em um indivíduo de *A. eigenmanniorum* foram observados quatro sinais fluorescentes, sendo 3 nos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos médios e um no braço longo de um cromossomo metacêntrico grande (Figura 3a). Em outro indivíduo dessa espécie foi observada a presença de três sítios para o DNAr 18S, sendo um na extremidade do braço curto de um cromossomo subtelocêntrico médio, um na extremidade do braço curto de um pequeno subtelocêntrico e o outro na extremidade do braço longo de um submetacêntrico médio. (Figura 3c).

Utilizando a coloração com os fluorocromo cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI também pode ser observado uma variação interindividual em relação aos sinais CMA₃ positivos. Em um indivíduo foram observados sempre quatro cromossomos com marcações CMA₃ positivas, nos braços curtos de 3 cromossomos subtelocêntricos médios e no braço longo de um cromossomo metacêntrico grande (Figura 3b), e nos demais espécimes analisados foi observada uma grande quantidade de cromossomos CMA₃ positivos, marcados na região terminal de braços longos e/ou curtos (Figura 3d).

Hyphessobrycon anisitsi

Em *H. anisitsi* as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram observadas nos braços curtos de 3 cromossomos: o par metacêntrico 6 e em um cromossomo subtelocêntrico do par 10 (Figura 2b). Utilizando a coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI foi encontrado uma variação intra e interindividual de 2 a 8 cromossomos apresentando sinais CMA₃ positivos e DAPI negativos (Figura 4).

Discussão

Neste trabalho foram analisados representantes de *Hyphessobrycon anisitsi*, *H. luetkenni*, *Deuterodon stigmaturus* e *Astyanax eigenmanniorum*, sendo que as duas últimas espécies foram coletadas em sua localidade tipo. *H. luetkenni* mostrou dados idênticos para as duas bacias hidrográficas em que foi coletada, da Laguna dos Patos e do Tramandaí.

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram múltiplas nas quatro espécies estudadas. *Deuterodon stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni* possuem pequenos

sítios AgNORs, geralmente presentes em grande quantidade e sempre localizados nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos, variando tanto inter quanto intraindividualmente. Em *D. stigmaturus* o FISH com a sonda de DNAr 18S comprovou a grande quantidade e a localização das AgNORs, sendo encontrados 8 cromossomos portadores desses sítios ribossômicos.

A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI também evidenciaram marcações semelhantes em *D. stigmaturus* e *H.luetkenni*, sendo observados pequenos sinais CMA₃ positivos nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos coincidentes com as AgNORs em ambas as espécies, mostrando que essas regiões são ricas em pares de bases GC que, com o DAPI, mostraram-se negativas, isto é, pobres em bases AT.

Não há dados de bandamento cromossômico para o gênero *Deuterodon* e para *Hyphessobryconluetkenni*, entretanto, a presença de NORs múltiplas é muito comum na família Characidae, por exemplo, ocorre em espécies dos gêneros: *Astyanax* (Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Kavalco e Moreira-Filho, 2003; Pazza et al., 2006), *Hyphessobrycon* (Centofante et al., 2003), *Piabina* (Portela et al., 1988; Peres et al., 2008), entre outros.

AgNORs ricas em pares de bases GC também é comum nos representantes da família Characidae e está presente em *Salminus hilarii* e *S. brasiliensis* (Margarido e Galetti Jr., 1999), *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. intermedia*, *Hemigrammus marginatus* (Portela-Castro e Júlio Jr., 2002), entre outros.

Enquanto *D. stigmaturus* e *H.luetkenni* apresentam um padrão semelhante de AgNORs e CMA₃, as duas outras espécies mostram uma variação intra e interindividual de sítios CMA₃, além de *A. eigenmanniorum* também apresentar uma variabilidade de sítios de DNAr 18S.

A. eigenmanniorum apresentou sempre 3 cromossomos com AgNORs, que foram também correspondentes aos sítios 18S e CMA₃ nesta espécie entretanto, pode ser observada uma variação interindividual desses últimos sítios, caracterizando esta população como polimórfica em relação ao número e distribuição cromossômica dos sítios ribossômicos e de CMA₃. Em um indivíduo de *A. eigenmanniorum* foram observados 4 cromossomos com sinais 18S e CMA₃ e em outro indivíduo 3 cromossomos com sinais 18S e vários sítios terminais CMA₃ positivos, sendo que em ambos os indivíduos alguns sinais não foram observados nos cromossomos homólogos.

Paintner-Marques et al. (2002) que estudaram *Bryconamericus aff. Exodon* e Pacheco et al. (2001) que trabalharam com *Astyanax altiparanae* também encontraram variabilidade nos sítios de CMA₃ e, segundo essas autoras, esta variabilidade correspondeu a

mesma variação identificada com a AgNOR. Souza et al. (2007) também encontraram uma variabilidade para os sítios CMA₃ positivos, que na maioria dos casos estavam localizados adjacentes aos sítios AgNOR, e os autores atribuem esta variação a um polimorfismo da heterocromatina.

Variabilidade interindividual de sítios de DNA ribossômico já foi observada em outras espécies e populações de peixes estudadas, como por exemplo, *Astyanax scabripinnis* de diferentes populações estudadas por Mantovani et al. (2005) e Ferro et al. (2001), diferentes espécies de *Serrasalmus* analisadas por Nakayama (2007), *Squalius alburnoides* e *S. pyrenaicus* analisadas por Gromicho et al. (2005) e *Leporinus friderici*, estudada por Galetti Jr. et al. (1995, cit. em Ferro et al., 2001).

Ferro et al. (2001) e Gromicho et al. (2005) colocam que um tamanho muito reduzido dos sítios de DNA ribossômico poderia dificultar a detecção dos sinais de hibridação correspondente nos cromossomos, e os primeiros autores também não descartam a idéia de que diferenças reais entre os indivíduos e populações estudadas possam estar ocorrendo em relação aos sítios ribossômicos. Estas duas hipóteses podem também explicar o polimorfismo observado em *A. eigenmanniorum* do presente estudo.

Peres et al. (2008) não encontraram variabilidade, mas evidenciaram a falta de sítios ribossômicos em alguns cromossomos homólogos das espécies *Astyanax scabripinnis*, *Hasemanina nana*, *Serrapinus piaba* e *Myleus micans*, assim como observado no presente trabalho.

Torres-Mariano e Morelli (2008) também observaram NORs múltiplas em *A. eigenmanniorum*, com até seis cromossomos marcados com a prata, mas esses autores não realizaram a técnica de hibridação para confirmar o número e a posição dos cístrons ribossômicos e nem utilizaram o fluorocromo CMA₃.

H. anisitsi também apresentou três cromossomos AgNORs, não sendo possível realizar a técnica de FISH para verificar a quantidade e localização exata de cístrons ribossômicos. Utilizando a coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI também puderam ser observadas variações intraindividuais e interindividuais em relação às regiões CMA₃ positivas assim como também não foram visualizadas marcações positivas em alguns homólogos, como ocorreu com *A. eigenmanniorum*. Em *H. anisitsi* provavelmente, algumas das regiões CMA₃ positivas devem corresponder aos sítios AgNORs, sendo estes ricos em bases GC e pobre em AT, pois o DAPI mostrou-se negativo, e também podem estar relacionadas à heterocromatina que, nesta espécie, é bem abundante e apresenta-se distribuída

pela região pericentromérica e terminal dos cromossomos e na forma de blocos mais evidentes em três pares cromossômicos (Mendes et al., em preparação).

Centofante et al. (2003) também verificaram a ocorrência de até 3 cromossomos marcados com a prata para a população de *Hyphessobrycon anisitsi* da população do rio Perdizes e de até 4 cromossomos AgNORs para a população do rio Piracuama. Entretanto, realizando a hibridação com a sonda de DNAr 18S, verificaram a presença de 10 e 13 cromossomos portadores dos cístrons ribossômicos, respectivamente. Os autores não utilizaram fluorocromos em suas análises.

A variabilidade encontrada nos sítios de CMA₃ de *H. anisitsi* do presente estudo também pode ser devida ao pequeno tamanho desses sítios ou diferenças reais podem estar ocorrendo entre os indivíduos, assim como observado em *A. eigenmanniorum*. Interessante notar que essas duas espécies pertencem a distintas bacias hidrográficas, mas possuem uma variabilidade cariotípica, apresentando características bem diferentes das duas outras do presente estudo que, sendo da mesma bacia hidrográfica, mostram sítios CMA₃ e de 18S invariáveis.

Os dados apresentados indicam uma diversidade cariotípica quanto ao número e localização de sítios de DNAr 18S, NOR e CMA₃ entre as 4 espécies estudadas, confirmando uma variabilidade tão característica da família Characidae e mostram que, diferentes espécies oriundas de bacias hidrográficas seguramente isoladas, mantem um nível elevado de diferenciação cariotípica.

Referências

- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet**, 1: 103-120.
- Capistano, T. G., A. L. B. Portela-Castro & H. F. Julio-Jr. (2008) Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivai Rivers, Paraná Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 203-207.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C; Foresti, F. (2002). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia** 55: 181-188.

- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Miyazawa, C.S.; Moreira-Filho O. (2003) Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia** 68: 283-288.
- Ferro, D.A.M., Neo, D.M., Moreira-Filho, O. Bertollo, L.A.C. (2001) Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62.
- Foresti, F. Almeida-Toledo, L. F.; Toledo, S. A. (1989) Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 79: 107-114.
- Gromicho, M.; Ozouf-Costaz, C.; Collares-Pereira, M.J. (2005) Lack of correspondence between CMA₃, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. *Cytogenet Genome Res*, 109: 507-511.
- Hattori, R.S.; Daniel-Silva, M.F.Z. and Almeida-Toledo, L.F. (2007) Karyotype characterization and gene mapping of 5S and 18 S rDNA in three species of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae). **Caryologia** 60: 372-378.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36: 1014-1015.
- 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** 56: 453-461.
- Lee, M.R.; Elder, F.F.B. (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. **Cytogenet. Cell. Genect.** 52: 36-40.
- Malacrida, A.C.P.; Dias, A.L.; Giuliano-Caetano, L. (2003) Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay – PR. **Cytologia** 68: 267-270.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109: 161-168.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O. (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 123: 211-216.

- Margarido, V.P.; Galetti Jr., P.M. (1999) Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** 22: 357-361.
- Mizoguchi, S.M.H.N.; Martins-Santos, I.C. (1998) Activation patterns of the nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia** 63:259-265.
- Nakayama, C.M. (2007) **Citogenética molecular comparative de D□Ar 18S e 5S em piranhas (Serrasalminae, Characidae) da Amazônia central**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
- Pacheco, R.B.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2001) Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science** 5: 109-114
- Paintner-Marques, T.R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2002) Multiple NORs in *Bryconamericus aff. Exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas** 137: 107-112.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F., Bertollo, L.A.C. (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I – Karyotypic analysis, AgNORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenet Genome Res** 112: 313-319.
- Peres, W.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31: 222-226.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr., H.F. (2002) Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. **Cytologia**, 67: 329-336.
- Portela, A.L.B.S.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética** 11: 307-316.
- Rubert, M. and Margarido, V.P., (2007) Cytogenetic studies in three species of the genus *Oligosarcus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50: 127-135.
- Souza, L.S.; Venere, P.C.; Moreira-Filho, O. (2007) Constitutive heterochromatin and AgNOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). **Cytologia** 72 (1): 63-69.

- Souza, I.L.; Santos-Silva, L.K.; Venere, P.C.; Moreira-Filho, O. (2008) Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron** 39: 1036-1041.
- Schweizer D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in humans chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, 27: 190-193.
- Swarça, A.C.; Cestari, M.M. Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2001) Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro*. **Chromosome Science** 5: 51-55.
- Torres-Mariano, A.R.; Morelli, S. (2008) B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). **Genetics and Molecular Biology** 31: 246-249.
- Vicari, M.R.; Noletto, R.B.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (supp 1): 173-179.

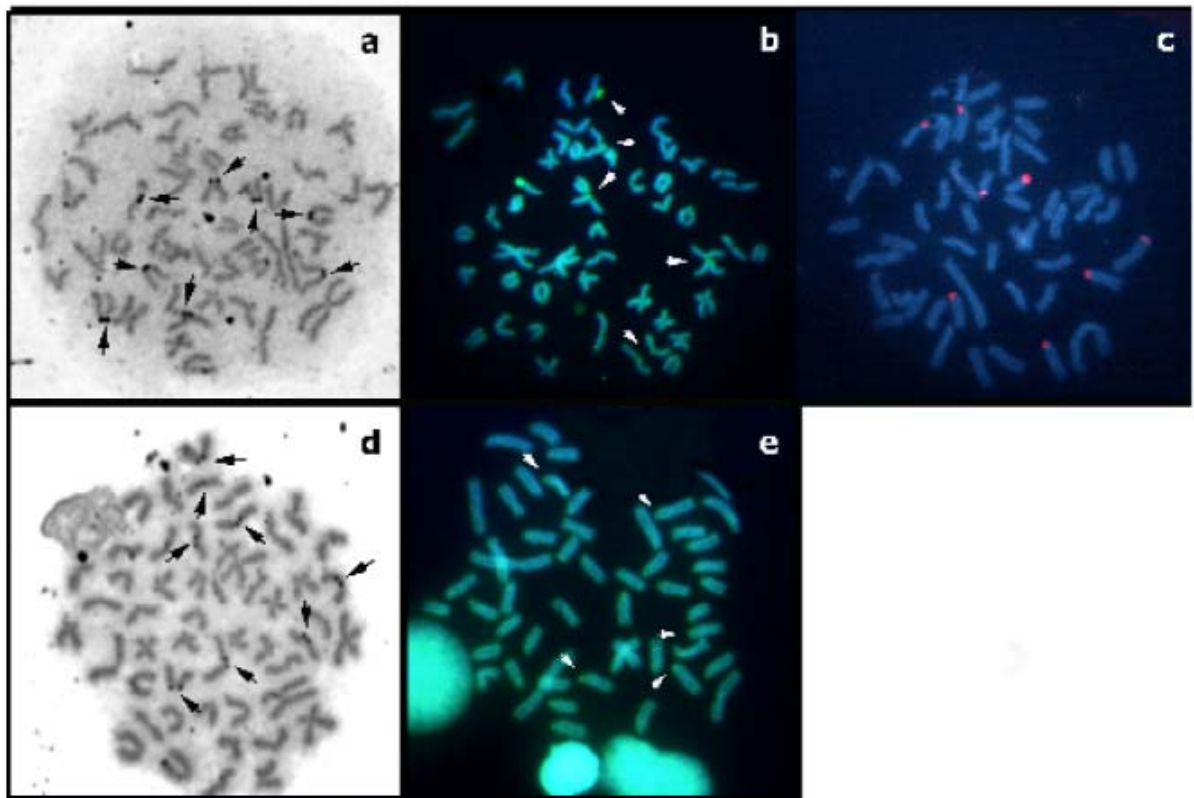


Figura 1 – Metáfases de *Deuterodon stigmaturos*: (a) AgNOR, (b) sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃, (c) FISH com a sonda de DNAr 18S; e de *Hyphessobrycon luetkenni*: (d) AgNOR; (e) sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃

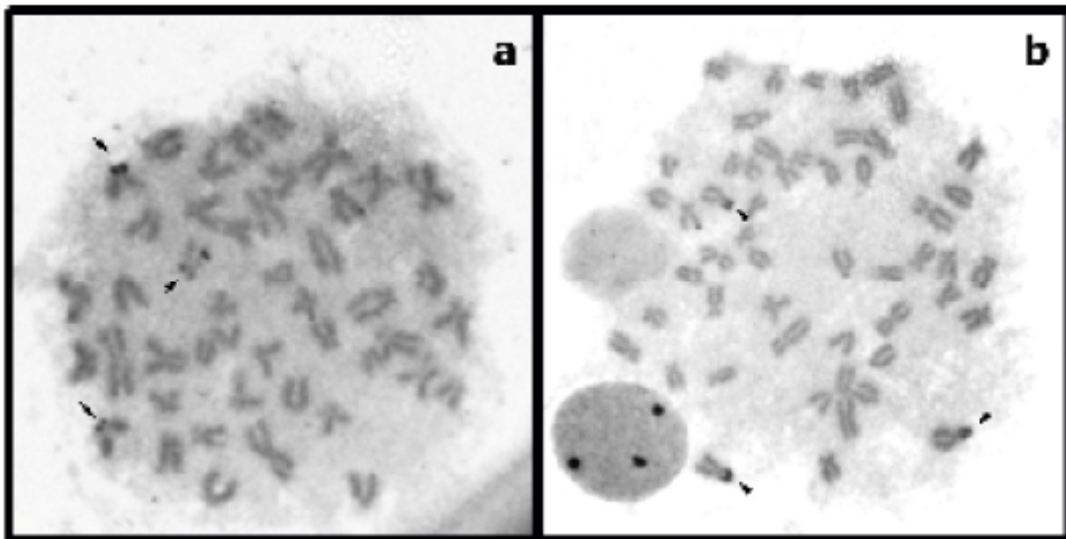


Figura 2 – Metáfases somáticas de: (a) *Astyanax eigenmanniorum* e (b) *Hyphessobrycon anisitsi* submetidas à técnica de impregnação por nitrato de prata. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolo (RONs).

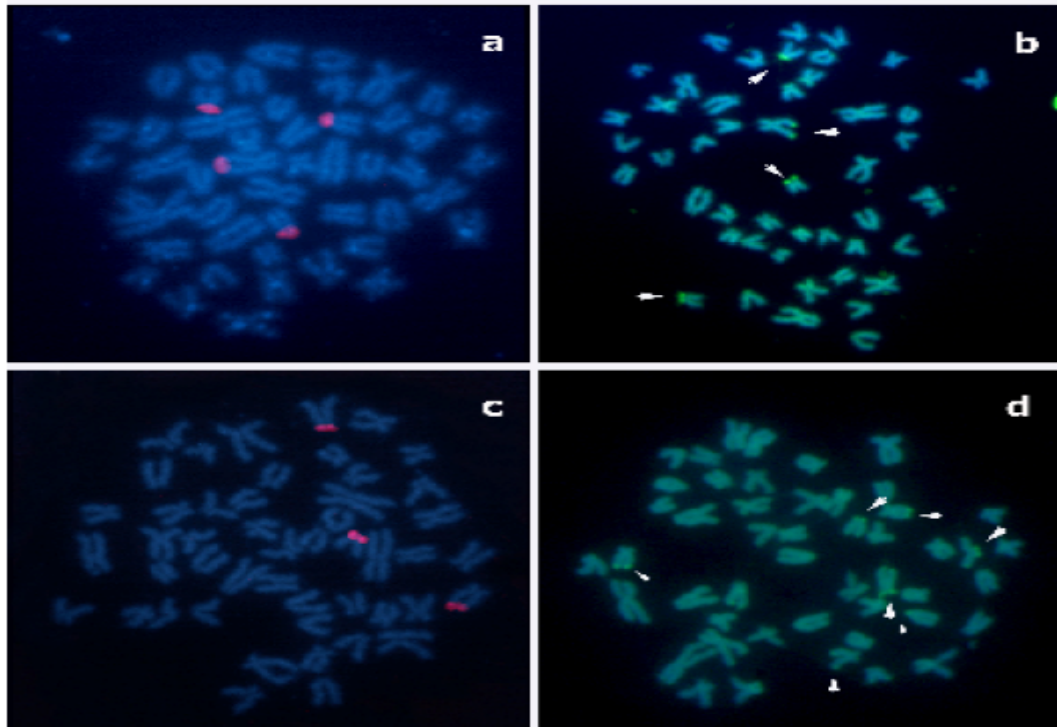


Figura 3 – Metáfases somáticas de *Astyanax eigenmanniorum*: (a) e (c) FISH com a sonda de DNAr 18S; (b) e (d) sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃. As setas indicam as regiões cromossômicas CMA₃ positivas.

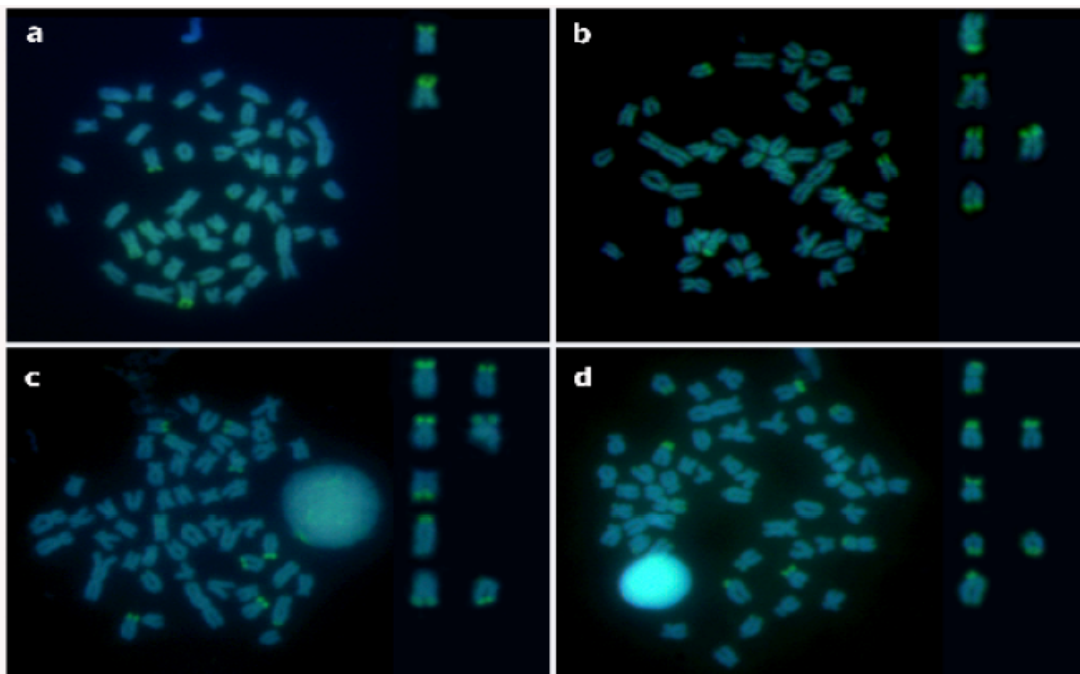


Figura 4 – Sobreposição de metáfases com os fluorocromos DAPI e CMA₃ de diferentes indivíduos de *Hyphessobrycon anisitsi*. Em destaque os cromossomos com sítios CMA₃ positivos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 No presente trabalho foram analisados representantes de *Deuterodon stigmaturus* e *Astyanax eigenmanniorum* coletados na localidade tipo, sendo apresentados os primeiros dados citogenéticos para as espécies *D. stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni*.

2 *Astyanax eigenmanniorum* apresentou o número cromossômico diplóide igual a 48 e *Deuterodon stigmaturus*, *Hyphessobrycon luetkenni* e *H. anisitsi* apresentaram $2n=50$ cromossomos, que é um número cromossômico diplóide muito comum entre os representantes da família Characidae.

3 As espécies analisadas mostraram diferentes fórmulas cariotípicas. *D. stigmaturus* apresentou $8m+6sm+2st+34a$ e $NF=66$; *H. luetkenni* apresentou $6m+8sm+36a$ e $NF=64$; *H. anisitsi* mostrou $18m+10sm+6st+16a$ com $NF=84$ e *A. eigenmanniorum* apresentou $10m+16sm+10st+12a$ com $NF=84$.

4 *D. stigmaturus* e *H. luetkenni* apresentaram uma grande quantidade de cromossomos acrocêntricos, característica pouco comum entre os representantes da família Characidae.

5 A análise da *heterocromatina* mostrou um padrão de distribuição semelhante nas espécies *A. eigenmanniorum*, *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*, sendo observada fracamente distribuída pela região pericentromérica

6 Em *H. anisitsi* a *heterocromatina* apresentou-se distribuída pela região pericentromérica e terminal dos cromossomos, sendo que alguns cromossomos apresentaram blocos heterocromáticos conspícuos.

7 As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram múltiplas nas quatro espécies estudadas.

8 *Deuterodon stigmaturus* e *Hyphessobrycon luetkenni* possuem um padrão semelhante de sítios AgNORs, que são muito pequenos, estando presentes, na maioria das vezes, em grande quantidade e sempre localizados no braço curto de cromossomos acrocêntricos, variando tanto inter quanto intraindividualmente.

9 Em *D. stigmaturus* o FISH com a sonda de DNAr 18S evidenciou 8 sítios ribossômicos, confirmando a grande quantidade destes sítios nesta espécie.

10 A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI também evidenciaram marcações semelhantes em *D. stigmaturus* e *H. luetkenni*, sendo observados pequenos sinais

CMA₃ positivos nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos, correspondentes aos sítios AgNORs.

11 *A. eigenmanniorum* e *H. anisitsi* apresentaram sempre 3 cromossomos com AgNORs, correspondentes a alguns sítios CMA₃, os quais mostraram variação tanto inter quanto intraindividual em ambas as espécies, não sendo visualizadas marcações positivas em alguns cromossomos homólogos.

12 Em *A. eigenmanniorum* pode ser observada uma variação interindividual dos sítios de DNAr 18S, caracterizando esta população como polimórfica em relação ao número e distribuição cromossômica desses cístrons ribossômicos.

13 O fluorocromo DAPI não evidenciou marcações fluorescentes em nenhuma das espécies.

14 Os dados apresentados indicam uma diversidade cariotípica entre as 4 espécies estudadas, confirmando uma variabilidade tão característica da família Characidae

REFERÊNCIAS

- Alberdi, A.J.; Fenocchio, A.S. (1997) Karyotypes of five Tetragonopterinae Species (Pisces, Characidae) from Argentina. **Cytologia**, 62: 171-176.
- Almeida-Toledo, L.F. 2000 Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. **Chromosome Today** 13: 169-181.
- Almeida-Toledo L.F.; Ozouf-Costaz C.; Foresti, F.; Bonilo, C.; Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M.F.Z. (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 97:229-233.
- Alves, A.A., Martins-Santos I.C (2002) Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 Chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia** 67: 117-122.
- Araújo, A.C.S.; Morelli, S. (2002) Estudo cariotípico da população de *Astyanax scabripinnis* (Pisces – Characidae) da nascente do córrego Jataí, Uberlândia – MG. **Horizonte científico**, 1: 1-16.
- Arefjev, V. A. 1990. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. **Caryologia**, 43 (3-4): 305-319.
- Artoni, R.F.; Falcão, J.D.N.; Moreira, O.; Bertollo, L.A.C. (2001) An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research** 9: 449-456.
- 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 W chromosome **Heredity** 89: 15-19.
- Artoni, R.F.; Shibatta, O.A.; Gross, M.C.; Schneider, C.H., Almeida, M.C.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C. (2006) *Astyanax aff. Fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, 4: 197-202.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.** 1: 103-120.
- Biavati, S.H.; Maistro, E.L. (2007) Cytogenetical analyses in three *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae) from Minas Gerais state, Brazil. **Cytologia**, 72 (3): 357-361.

- Capistano, T. G., A. L. B. Portela-Castro & H. F. Julio-Jr. (2008) Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivai Rivers, Paraná Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 31: 203-207.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C; Foresti, F. (2002a). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia** 55: 181-188.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C.; Navarrete, M.C.; Froehlich, O.; Foresti, F. (2002b) Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysi) from the Neotropical region: **Genetics and Molecular Biology** 25: 49-55.
- Centofante, L; Bertollo, L.A.C.; Miyazawa, C.S.; Moreira-Filho, O. (2003a) Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia** 68: 283-288.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Justi, A.J., Moreira-Filho, O. (2003b) Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). **Ichthyological Exploration Freshwaters**, 14: 361-368.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2006) Chromosomal differentiation between populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from small tributaries at opposite margins of the Paraíba do Sul river (Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49: 981-987.
- Daniel-Silva, M.F.Z.; Almeida Toledo, L.F. (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, 54: 209-215.
- Diniz, D.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008) Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica**, 133: 85-91.
- Domingues, M.S.; Vicari, M.V.; Abilhoa, V.; Wamser, J.P.; Cestari, M.M., Bertollo, L.A.C., Almeida, M.C.; Artoni, R.F. (2007) Cytogenetic and comparative morphology at two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garuti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology** 5: 37-44.
- 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). **Rev. Bras. Genet.**, 17: 107-114.

- Fazoli, L.C.; Silva, V.A.B.; Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr. H.F. (2003) Chromosome characterization of *Astyanax* sp. B (Characidae, Tetragonopterinae), an endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil. **Cytologia**, 68: 289-293.
- Fernandes, C.A.; Martins-Santos, I.C. (2003) Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basin PR Brazil. **Cytologia**, 68: 289-293.
- Fernandes C.A.; Martins-Santos I.C. (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae). **Hereditas** 141: 328-332
- Fernandes C.A.; Martins-Santos I.C. (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B-chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica** 124: 301-306.
- Fernandes C.A.; Martins-Santos I.C. (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genet Mol Biol** 29: 464-468.
- Ferro, D.A.M., Neo, D.M., Moreira-Filho, O. Bertollo, L.A.C. (2001) Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110: 55-62.
- Ferro, D.A.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2003) B-chromosome polymorphism in the fish *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, 119: 147-153.
- Foresti, F. Almeida-Toledo, L. F.; Toledo, S. A. (1989) Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 79: 107-114.
- Graça, W. J. ; Pavanelli, C. S. (2007) **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. 1º edição: Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 241p.
- Gromicho, M.; Ozouf-Costaz, C.; Collares-Pereira, M.J. (2005) Lack of correspondence between CMA₃, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. **Cytogenet Genome Res**, 109: 507-511.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Matiello, M.C.A.; Leite, M.L.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2004) Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae), **Genet Mol Biol**, 27: 529-535.
- Hashimoto, D.T.; Gonçalves, V.R.; Bortolozzi, J.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2008) First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae*

- (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (suppl): 275-278.
- Hattori, R.S.; Daniel-Silva, M.F.Z. and Almeida-Toledo, L.F. (2007) Karyotype characterization and gene mapping of 5S and 18 S rDNA in three species of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae). **Caryologia** 60: 372-378.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36: 1014-1015.
- Jin, S.N.; Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae) **Ciência e Cultura**, 27: 1122-1124.
- Kantek, D.L.Z.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M. (2003) Cytogenetic characterization and NOR polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from the First Plateau of the Iguaçu River (Paraná State, Brazil). **Cytologia** 68: 19-24.
- Kantek, D.L.Z., Noleto, R.B.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M. (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin. **Brazilian Arch Biol Technol** 50: 67-74.
- Kantek, D.L.Z.; Noleto, R.B.; Maurutto, F.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Cestari, M.M. (2008a) Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the upper Igraçu river basin: conformation of the occurrence of distinct evolutionary units. **Journal of Fish Biology**, 73, 2012-2020.
- Kantek, D.L.Z.; Cipriano, R.R.; Noleto, R.B.; Fenocchio, A.S.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M. (2008b) Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguaçu River. **Genetics and Molecular Biology**, 31 (1): 239-242.
- 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** 56: 453-461.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2004) Gene mapping of rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenet Genome Res** 106: 107-110.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. **Genetica** 124: 85-91.

- Kavalco, K.F.; Almeida-Toledo, L.F. (2007) Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, 4 (2): 103-111.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2007) Satélite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genet Mol Biol** 30: 329-335.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Almeida-Toledo, L.F. (2008) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica*.
- Kirby, R.F.; Thompson, K.W.; Hubbs C.L. (1977) Karyotypic similarities between the mexican and blind tetras. **Copeia**, 1977 (3): 578-580.
- Lee, M.R.; Elder, F.F.B. (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. **Cytogenet. Cell. Genet.** 52: 36-40.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- Lima, F. C. T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, H.; Benine, R.; Oyakawa, O.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F. (2003). Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J.R.C.J. (eds) **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS.
- Lucena, C. A. S. (1993) **Estudos filogenéticos da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osttazarophysi, Characiformes)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências – USP, São Paulo, 158p.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1992) Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* paranae (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genética** 87: 101-106.
- Maistro, E. L.; Dias, A. L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (1994) Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia**, vol. 47, n. 3-4: 233-239.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) **Genet Mol Biol**, 23: 365-369.

- Malacrida, A.C.P.; Dias, A.L.; Giuliano-Caetano, L. (2003) Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay – PR. **Cytologia** 68: 267-270.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica** 109: 161-168.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O. (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 123: 211-216.
- Margarido, V.P.; Galetti Jr., P.M. (1999) Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** 22: 357-361.
- Martinez, E.R.M.; Oliveira, C.; Júlio-Jr., H.F. (2004) Cytogenetic analysis of species of the genera *Acestrorhynchus*, *Oligosarcus* and *Rhaphiodon* (Teleostei: Characiformes). **Caryologia**, 57: 294-299.
- Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Shibatta, O.A.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2002) Karyotypic studies in the Characidae fish, genus *Astyanax*. An endemic and highly isolated population of *Astyanax* sp. **Cytologia**, 67: 123-128.
- Medrado, A.S.; Figueiredo, A.V.A.; Waldschmidt, A.M.; Affonso, P.R.A.M.; Carneiro, P.L.S.; (2008) Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, 31 (1): 208-214.
- Menezes, N. A.; Weitzman, S.H.; Oyakawa, O.T.; Lima, F.C.T.; Castro, R.M.C.; Weitzman, M.J. (2007) **Peixes de água doce da Mata Atlântica – Lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo: Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo. 408 p.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr., P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S., Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that B-chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, 85: 1-9.
- Mizoguchi, S.M.H.N., Martins-Santos, I.C. (1997) Macro- and micro-chromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas** 127: 249-253.
- Mizoguchi, S.M.H.N.; Martins-Santos, I.C. (1998a) Activation patterns of the nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia** 63:259-265.

- Mizoguchi, S.M.H.N.; Martins-Santos, I.C. (1998b) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax* “scabripinnis” (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genet Mol Biol** 21: 55-61.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian J Genet**, 14: 331-357.
- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Bertollo, L.A.C. (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome-B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, 66: 59-64
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr. P.M., Bertollo, L.A.C. (2004) B-chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae). An overview in natural populations. **Cytogenetic Genome Res.** 106: 230-234.
- Morelli S.; Bertollo L.A.C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Toledo-Filho, S.A. (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I – Karyotypic variability. **Caryologia** 36: 235-244.
- Nakayama, C.M. (2007) **Citogenética molecular comparativa de DNAr 18S e 5S em piranhas (Serrasalminae, Characidae) da Amazônia central**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
- Neo, D.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002a) Morphological differentiation and possible origin of B Chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) **Genética**, 108: 211-215.
- Nirchio, M.; Oliveira, C.; Ferreira, I.A.; Granado, A.; Ron, E. (2007) Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 30, 1: 25-30.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Britski, H. A.; Toledo-Filho, S. A. (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Rev. Bras. Genet.**, 11 (3): 577-624.
- Pacheco, R.B. (2001) **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Tetragonopterinae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 97p.
- Paintner-Marques, T.R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2002a) Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus* aff. *Exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia** 67: 397-402.

- Paintner-Marques, T.R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2002b) Multiple NORs in *Bryconamericus aff. Exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas** 137: 107-112.
- Paintner-Marques, T.R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2003) Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus aff. Iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology** 26: 145-149.
- Pamponet, V.C.C.; Carneiro, P.L.S.; Affonso, P.R.A.M.; Miranda, V.S.; Silva Jr., J.C.; Oliveira, C.G.; Gaiotto, F.A. (2008) A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus Linnaeus*, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern. **Neotropical Ichthyology** 6(4): 621-630.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F., Bertollo, L.A.C. (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I – Karyotypic analysis, AgNORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenet Genome Res** 112: 313-319.
- Pazza, R.; Kavalco, K. F. (2007) Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The nucleus** 50 (3): 519-543.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C. (2008) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 – Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenet Genome Res**, 122: 61-66.
- Peres, W.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes) **Genetics and Molecular Biology** 31: 222-226.
- Portela, A.L.B.S.; Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética** 11: 307-316.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr., H. F.; Nishiyama, P.B. (2001) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica** 110: 277-283.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr., H.F. (2002) Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. **Cytologia** 67: 329-336.
- Portela-Castro, A.L.B.; Julio, H.F.; Martins-Santos, I.C.; Pavanelli, C.S. (2008) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus aff. iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica** 133: 113-118.

- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J.R.C.J. (eds) (2003) **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, 1st edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS.
- Rocon-Stange, E.A.; Almeida-Toledo, L.F. (1993) Supernumerary B-Chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian J Genet**, 16: 601-615.
- Rubert, M. and Margarido, V.P. (2007) Cytogenetic studies in three species of the genus *Oligosarcus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50: 127-135.
- Salvador, L.B.; Moreira-Filho, O. (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity** 69: 50-56.
- Sánchez, S.; Jorge, L.C. A New report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus *Triportheus* (Pisces, Triporthinae). **Cytologia** 64: 395-400, 1999.
- Santos, A.C.; Morelli, S. (2006). Comparação Citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do triangulo mineiro. **Bioscience Journal**, 22: 145-150.
- Schweizer D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in humans chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, 27: 190-193.
- Souza I.L.; Moreira-Filho, O. (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae) I – Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia** 60: 1-11.
- Souza I.L.; Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M. (1996) Heterochromatin differentiations in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian J. Genet** 19: 405-410.
- Souza, L.S.; Venere, P.C.; Moreira-Filho, O. (2007) Constitutive heterochromatin and AgNOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). **Cytologia** 72 (1): 63-69.
- Souza, I.L.; Santos-Silva, L.K.; Venere, P.C.; Moreira-Filho, O (2008) Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, 39: 1036-1041.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-306.

- Swarça, A.C.; Cestari, M.M. Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. (2001) Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro*. **Chromosome Science** 5: 51-55.
- Torres-Mariano, A.R.; Morelli, S. (2008) B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). **Genetics and Molecular Biology** 31: 246-249.
- Venere, P.C.; Pfister, S.C.; Moreira-Filho, O.; Galetti Jr. P.M. (1997) Chromosomal characterization in Characinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **Cytobios** 92: 123-131.
- Vicari, M.R.; Noleto, R.B.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008a) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (supp 1): 173-179.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeensis*. **Cytogenet Genome Res**, 122: 67-72
- Vicente, V.E.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet**, 74: 70-75.
- Wasko, A.P.; Galetti Jr., P.M. (1998) Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios** 94: 185-193.
- Wasko, A.P.; Galetti, Jr., P.M. (1999) Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). **Cytologia**, 64: 63-67.
- Wasko, A.P.; Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M. (1996) Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. **Brazilian Journal of Genetics** 19: 225-230.

http://pt.wikipedia.org/wiki/Incertae_sedis, acessado no dia 20 de outubro de 2008.