



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA BETTIN PIRES

**“CITOGENÉTICA COMPARATIVA E EVOLUTIVA EM
PEIXES DA FAMÍLIA CICHLIDAE:
ÊNFASE PARA CROMOSSOMOS B E A LOCALIZAÇÃO DE
GENES DE RNAr 18S”**

Londrina
2013



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

LARISSA BETTIN PIRES

**“CITOGENÉTICA COMPARATIVA E EVOLUTIVA EM
PEIXES DA FAMÍLIA CICHLIDAE:
ÊNFASE PARA CROMOSSOMOS B E A LOCALIZAÇÃO DE
GENES DE RNAr 18S”**

LARISSA BETTIN PIRES

**“CITOGENÉTICA COMPARATIVA E EVOLUTIVA EM
PEIXES DA FAMÍLIA CICHLIDAE:
ÊNFASE PARA CROMOSSOMOS B E A LOCALIZAÇÃO DE
GENES DE RNAr 18S”**

Tese 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 Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Lúcia Dias.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P667c Pires, Larissa Bettin.

Citogenética comparativa e evolutiva em peixes da família *Cichlidae* : ênfase para cromossomos B e a localização de genes de RNAr 18S / Larissa Bettin Pires. – Londrina, 2013.
103 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Cromossomos – Teses. 3. Heterocromatina – Teses. 4. Meiose – Teses. 5. Citogenética animal – 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 576.312.32:597

LARISSA BETTIN PIRES

**“CITOGENÉTICA COMPARATIVA E EVOLUTIVA EM PEIXES DA
FAMÍLIA CICHLIDAE:
ÊNFASE PARA CROMOSSOMOS B E A LOCALIZAÇÃO DE GENES
DE RNAr 18S”**

Tese 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 Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Ana Luiza de Brito P. Castro
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a. Luciana Andréia Borin
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Swarça
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2013.

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, minha irmã, meu namorado e aos meus amigos...

AGRADECIMENTOS

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

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

À Profª Drª Ana Lúcia Dias pela orientação. Digo pela orientação durante todo o doutorado, pela confiança quando aceitou me orientar, pelas vezes que discutiu meu projeto comigo e ter esclarecido várias dúvidas, pela compreensão e pela enorme paciência durante esses quatro anos de orientação.

À Profª Drª Lucia Giuliano-Caetano pela ajuda imprescindível nas coletas, principalmente nas do Rio Grande do Sul.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba pelo empréstimo de seu laboratório na UFRGS, que foi indispensável à realização da pesquisa, e pelo auxílio na identificação das espécies.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

À Sueli, secretária do curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela amizade, ajuda e competência. Aos técnicos de laboratório, Dário e Melissa, pela ajuda fornecida nas horas necessárias e de sufoco.

Aos meus queridos pais, Rubens e Maysa, que em todos os momentos estiveram de alguma forma presente, me apoiando, incentivando, auxiliando e, acima de tudo, acreditando na sua filha. Que fizeram de tudo para que o meu sonho se tornasse realidade. Obrigada por tudo !!!

À minha irmã Carla, que sempre me apoiou incondicionalmente, não importando as circunstâncias, por tantas vezes que me ajudou, sendo muitas vezes minha fonte de energia e ânimo para continuar. Sem dúvida, você é tudo para mim !!!

Ao meu querido namorado Bruno, pela paciência, amizade, incentivo, conselhos e amor, que foi muito importante para o término do doutorado e a da minha tese. Apesar de não ter caminhado ao meu lado durante todo o processo, esteve presente no momento crucial... o final. Gostaria de ter te conhecido antes... Obrigada por tudo !!!

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal: Angélica Rossoti, Angeliquinha (Ériquinha), Vivian, Mariana, Juceli, Laura, Mateus, Angélica Tiepo, Larissa Lacerda, Ana Beatriz, pela amizade e convivência prazerosa no ambiente de trabalho.

Às amigas Marceléia, Natália, Renata e Tatiane verdadeiras amigas, pela sincera amizade, incentivo, companheirismo e conselhos nestes anos de convivência de laboratório, que conseguiu amenizar até as horas menos favoráveis. E ao Fábio, que apesar de tudo, foi sempre um 'pouco' compreensivo e paciente, além de ser um ótimo amigo.

Aos meus outros amigos de Londrina que também me ajudaram sem saber, Alexandre, Daniel, Yuldi, Márcio, Paulinho, Armando e Carlos, pelos momentos agradáveis que passamos juntos em Londrina, fora da universidade. E à todos os demais amigos e colegas, que muitas vezes não estavam presentes, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus pela vida, saúde e disposição.

Esta é mais uma conquista, que não haveria conseguido sem vocês.

Muito Obrigada !!!

“Quem nunca cometeu um erro,

nunca tentou algo novo.”

Albert Einstein

PIRES, Larissa Bettin. **Citogenética comparativa e evolutiva em peixes da família Cichlidae**: ênfase para cromossomos B e a localização de genes de RNAr 18S. 2013. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

RESUMO

No presente trabalho foram analisadas doze espécies de peixes, de três gêneros, pertencentes à família Cichlidae, coletadas em bacias hidrográficas distintas. *Crenicichla britskii*, *C. haroldoi*, *C. niederleinii* e *Cichlasoma paranaense* foram coletadas na bacia do rio Paranapanema; *Gymnogeophagus rhabdotus*, *G. lacustris*, *Cichlasoma portalegrense*, *Crenicichla lepidota*, *C. punctata* e *C. maculata* coletadas na bacia do sistema hidrográfico Laguna dos Patos/RS. *Crenicichla lepidota*, *C. semifasciata* e *Cichlasoma dimerus* coletadas na bacia do rio Paraguai/MS. Os dados citogenéticos revelaram que todos os indivíduos apresentaram $2n=48$, mas com diferenças nas fórmulas cariotípicas. As espécies do gênero *Crenicichla* apresentaram: $6m+42st-a$ (NF=54) para *C. lepidota* e *C. maculata*; $6m+4sm+38st-a$ (NF=58) para *C. haroldoi*; $4m+6sm+38st-a$ (NF=58) para *C. britskii*, *C. punctata* e *C. niederleinii* e $4m-sm+44st-a$ (NF=52) para *C. semifasciata*. As espécies do gênero *Cichlasoma* apresentaram fórmula cariotípica de: $14m-sm+34st-a$ (NF=62) para *C. portalegrense* e *C. paranaense* (população do ribeirão Taquari/PR); $12m-sm+36st-a$ (NF=60) para *C. dimerus* e $4m-sm+44st-a$ (NF=52) para *C. paranaense* (população do rio Paranapanema/SP). Para as duas espécies de *Gymnogeophagus* as constituições cromossômicas foram: $4m+4sm+40st-a$ (NF=56) para *G. lacustris* e $4m+2sm+42st-a$ (NF=54) para *G. rhabdotus*. Em *Crenicichla lepidota*, das populações do Saco da Alemoa e Gasômetro, ambas da Laguna dos Patos, foi observada a presença de 1 a 3 cromossomos B de tamanho pequeno, com variação tanto inter quanto intraindividual, sendo totalmente heterocromáticos. Nas análises meióticas dessa espécie, foram detectadas regiões heteropicnóticas, evidentes nas fases iniciais da prófase I, que poderiam ser os cromossomo B; em paquítenos, foram observados 24 bivalentes e um univalente isolado, provavelmente o cromossomo B, assim como em metáfases I e diplóteno. Na fase de diacinese foi evidenciada uma configuração meiótica incomum, onde dois bivalentes do complemento A se mostravam mais próximos ao cromossomo B univalente e, em anáfase I, foram visualizados Bs com migração tardia. Em todas as espécies foram detectadas RONS simples, exceto *Crenicichla britskii* e *Cichlasoma paranaense*, ambas do rio Paranapanema, e *Gymnogeophagus rhabdotus* que apresentaram uma variação de 3 a 4 cromossomos marcados pela prata. As RONS foram coincidentes com as constrições secundárias, exceto em *C. britskii* do rio Paranapanema que apresentou apenas um dos pares (par 5) correspondente com a constrição secundária. *C. britskii* do rio Paranapanema e *C. maculata* apresentaram heteromorfismo de tamanho da RON, também visualizado com a coloração de Giemsa. A heterocromatina mostrou-se distribuída nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos do complemento, em todas as espécies, sendo que as constrições secundárias revelaram-se heterocromáticas, assim como as RONS, com exceção de *C. britskii* do rio Paranapanema. Em *Cichlasoma paranaense* (população do rio Paranapanema), foi visualizada uma banda heterocromática intersticial, CMA₃ positiva, no braço longo de um par st-a (cromossomo 5). As RONS mostraram-se positivas para CMA₃, revelando-se ricas em pares GC, entretanto, em *C. britskii* do rio Paranapanema foi observado que um dos pares da RON (par 6) não se mostrou fluorescente. A coloração pelo DAPI não revelou nenhuma marcação, indicando que nestas espécies não há regiões ricas em AT. Os dados apresentados confirmam o número

diplóide conservativo na família Cichlidae entretanto, também revelam uma diversidade cariotípica entre diferentes espécies e populações revelando que rearranjos cromossômicos estruturais fazem parte do processo evolutivo deste grupo de peixes.

Palavras-chave: *Cichlasoma*. *Crenicichla*. banda C. Cromossomos supranumerários. FISH. Fluorocromos. *Gymnogeophagus*. Meiose. RON.

PIRES, Larissa Bettin. **Citogenética comparativa e evolutiva em peixes da família Cichlidae: ênfase para cromossomos B e a localização de genes de RNAr 18S.** 2013. 103p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

ABSTRACT

In the present study, we analyzed twelve fish species from three genera belonging to the Cichlidae family, collected in different hydrographic basins. *Crenicichla britskii*, *C. haroldoi*, *C. niederleinii* and *Cichlasoma paranaense* were collected in the Paranapanema river basin; *Gymnogeophagus rhabdotus*, *G. lacustris*, *Cichlasoma portalegrense*, *Crenicichla lepidota*, *C. punctata* and *C. maculata* were collected in the basin comprising the Laguna dos Patos/RS hydrographic system. *Crenicichla lepidota*, *C. semifasciata* and *Cichlasoma dimerus* were collected in the Paraguay/MS river basin. The cytogenetic data revealed that all individuals had $2n = 48$, but with differences in karyotypic formulas. Species from the genus *Crenicichla* presented: $6m+42st-a$ (FN=54) for *C. lepidota* and *C. maculata*; $6m+4sm+38st-a$ (NF=58) for *C. haroldoi*; $4m+6sm+38st-a$ (FN=58) for *C. britskii*, *C. punctata* and *C. niederleinii* and $4m-sm+44st-a$ (FN=52) for *C. semifasciata*. The species from the *Cichlasoma* genus exhibited a karyotype formula of: $14m-sm+34st-a$ (FN=62) for *C. portalegrense* and *C. paranaense* (Taquari stream/PR population); $12m-sm+36st-a$ (FN=60) for *C. dimerus* and $4m-sm+44st-a$ (FN=52) for *C. paranaense* (Paranapanema river/SP population). In the *Gymnogeophagus* species, the chromosomal constitutions were: $4m+4sm+40st-a$ (FN=56) for *G. lacustris* and $4m+2sm+42st-a$ (FN=54) for *G. rhabdotus*. In *Crenicichla lepidota* from the Saco da Alemoa and Gasometro populations, both belonging to Laguna dos Patos, we observed 1 to 3 B chromosomes of a small size (totally heterochromatic), with inter and intraindividual variation. Meiotic analyzes in this species detected some heteropycnotic regions, evidenced in the early stages of prophase I, which could be the B chromosomes; in the pachytene stage, as in metaphase I and diplotene, 24 bivalents and one isolated univalent were observed, probably the B chromosome. In diakinesis stage an unusual meiotic configuration was evidenced, where two bivalents from the A complement were closer to the univalent B chromosome and, in anaphase I, Bs with late migration were visualized. Simple NORs were detected in all species, except for *Crenicichla britskii* and *Cichlasoma paranaense*, both from Paranapanema river, and *Gymnogeophagus rhabdotus* which showed a variation of 3-4 chromosomes stained by silver. The NORs were coincident with the secondary constrictions, except for *C. britskii* from the Paranapanema river, which showed only one pair (pair 5) corresponding to the secondary constriction. *C. britskii* from the Paranapanema river and *C. maculata* showed a NOR-size heteromorphism also visualized through Giemsa staining. In all species, the heterochromatin was distributed in the pericentromeric regions of most chromosomes from the complement, and the secondary constrictions revealed a heterochromatic pattern, as well as NORs, except in *C. britskii* from the Paranapanema river. In *Cichlasoma paranaense* (Paranapanema river population), a single heterochromatic interstitial band was visualized on the long arm of a st-a pair (chromosome 5). The NORs were positive for CMA₃, revealing rich in GC pairs, however, in *C. britskii* (Paranapanema river population) we observed that one of the NOR pairs (pair 6) was not fluorescent. The DAPI staining showed no marking, indicating that there are no AT-rich regions in the species analyzed herein. The data presented confirm the conservative diploid number of the Cichlidae family, however, also reveal a karyotypic diversity among different species and populations indicating that structural

chromosomal rearrangements must play a role in the evolutionary process of this group of fish.

Keywords: *Cichlasoma*. *Crenicichla*. C banding. Supernumerary chromosomes. FISH. Fluorochrome. *Gymnogeophagus*. Meiosis. NOR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotos das espécies coletadas: *Crenicichla britskii* (a), *Crenicichla haroldoi* (b), *Crenicichla lepidota* (c), *Crenicichla maculata* (d), *Crenicichla niederleini* (e) *Crenicichla punctata* (f), *Crenicichla semifasciata* (g), *Cichlasoma dimerus* (h), *Cichlasoma paranaense* (i), *Cichlasoma portalegrense* (j), *Gymnogeophagus gymnogenys* (k) e *Gymngeophagus labiatus* (l). 40
- Figura 2** – Mapa representando os locais de coleta: bacia do rio Paranapanema (a), bacia do rio Paraguai (b) e o sistema hidrográfico Laguna dos Patos (c). Os pontos indicam os locais de coletas..... 41

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Cariótipo (a), exemplar (b), metáfase parcial mitótica após bandamento C (c) e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI em *Crenicichla lepidota* (d, e, f; respectivamente). A seta indica o cromossomo B. Em a, observar a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico 53
- Figura 2** – Células meióticas de *Crenicichla lepidota* corada com Giemsa. a Espermatogônias com 49 cromossomos. b-c Leptóteno e Zigóteno, respectivamente, mostrando regiões heteropicnóticas (cabeças de seta). d-e Paquítenos, com o cromossomo B (seta) isolado dos demais bivalentes e esquema interpretando essa fase e indicando o B (e'). f Diplóteno, com 24 bivalentes e dois cromossomos Bs (setas). g Diacinese, mostrando uma configuração diferenciada entre os bivalentes e o B (asterisco). h-i Metáfases I, com o cromossomo B (seta) isolado da placa central de orientação. j-k Anáfases I, com a ausência e a presença de cromossomos B (setas), respectivamente 54
- Figura 3** – Células meióticas de *Crenicichla lepidota* com impregnação pelo nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI, respectivamente a, e, i Espermatogônias. b, f, j Paquítenos, com o cromossomo B (seta) isolado dos demais bivalentes e paquíteno iniciais destacados no box. c, k Diplótenos. g Diacinese, mostrando uma

configuração diferenciada entre os bivalentes e o B (asterisco). d, h, l Metáfases I, com o cromossomo B (seta) isolado da placa central de orientação. As cabeças de seta indicam as regiões organizadoras de nucléolo 55

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI em *Crenicichla haroldoi* (a), *C. britskii*, das populações A (b) e B (c) e *C. niederleinii* (d), respectivamente. O box evidencia a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico 70
- Figura 2** - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI em *Crenicichla maculata* (a), *C. lepidota* (b), *C. punctata* (c) e *C. semifasciata* (d), respectivamente. O box evidencia a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico 71
- Figura 3** - Metáfases somáticas após o bandamento C de *Crenicichla haroldoi* (a), *C. britskii*, das populações A (b) e B (c); *C. niederleinii* (d), *C. maculata* (e), *C. lepidota* (f), *C. punctata* (g) e *C. semifasciata* (h), respectivamente. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolos e as cabeças de seta as constrições secundárias adicionais em *C. britskii* 72

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI de: *Cichlasoma dimerus* (a), *C. portalegrense* (b) e *C. paranaense*, populações A (c) e B (d), respectivamente 87
- Figura 2** - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI de: *Gymnogeophagus rhabdotus* (a) e *G. lacustris* (b), respectivamente 88
- Figura 3** - Metáfases somáticas após o bandamento C de *Cichlasoma dimerus* (a), *C. portalegrense* (b), *C. paranaense*, populações A (c) e B (d), *Gymnogeophagus rhabdotus* (e) e *G. lacustris* (f), respectivamente. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolos 89

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Dados cariotípicos da família Cichlidae ($2n$ = número diploide, NF = número fundamental, Ref. = referências)..... | 21 |
|---|----|

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Frequência de cromossomos B em células somáticas de <i>Crenicichla lepidota</i> (M – macho; F fêmea)..... | 52 |
| Tabela 2 - Cromossomos B na família Cichlidae ($2n$ – número diplóide; B_{micro} – microcromossomo; BM – metacêntrico grande; Bm – metacêntrico médio; Ref - referências)..... | 52 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultados cariotípicos para as espécies de <i>Crenicichla</i> analisadas no presente estudo: $2n$ = número diplóide, NF = número fundamental, CS = constrição secundária, $RONs$ = regiões organizadoras de nucléolos e $CMA3$ = cromomicina A3..... | 69 |
|---|----|

CAPÍTULO 3

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultados cariotípicos para as espécies de <i>Cichlasoma</i> e <i>Gymnogeophagus</i> analisadas no presente estudo: $2n$ = número diplóide, NF = número fundamental, CS = constrição secundária, $RONs$ = regiões organizadoras de nucléolos e $CMA3$ = cromomicina A3 | 86 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | | |
|---|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CICHLIDAE | 17 |
| 1.2 | ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CICHLIDAE | 19 |
| 1.3 | OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS B NA FAMÍLIA CICHLIDAE | 35 |
| 2 | OBJETIVO | 38 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 38 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 38 |
| 3 | ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA | 39 |
| 3.1 | BACIA DO RIO PARANAPANEMA..... | 39 |
| 3.2 | BACIA DO RIO PARAGUAI..... | 39 |
| 3.3 | BACIA DO SISTEMA HIDROGRÁFICO LAGUNA DOS PATOS | 43 |
| | | |
| CAPÍTULO 1 - COMPORTAMENTO MITÓTICO E MEIÓTICO DO CROMOSSOMO B DE CRENICICHLA LEPIDOTA (CICHLIDAE)* | | |
| | | 42 |
| | RESUMO | 43 |
| | Introdução | 43 |
| | Materiais e Métodos | 45 |
| | Resultados e Discussão | 46 |
| | Referências | 55 |
| | | |
| CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE CARIOTÍPICA ENTRE ESPÉCIES DE CRENICICHLA (PERCIFORMES, CICHLIDAE) DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS DO CENTRO-OESTE E SUDESTE BRASILEIRO* | | |
| | | 59 |
| | RESUMO | 60 |
| | Introdução | 60 |
| | Material e Métodos | 61 |
| | Resultados | 63 |
| | Discussão | 64 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| Referências | 73 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 3 - COMPARAÇÃO CROMOSSÔMICA ENTRE CINCO ESPÉCIES DE CICLÍDEOS NEOTROPICAIS DOS GÊNEROS CICHLASOMA E GYMNOGEOPHAGUS (PERCIFORMES)*..... | 77 |
|--|-----------|

| | |
|--------------------|-----------|
| RESUMO..... | 78 |
|--------------------|-----------|

| | |
|------------------------|-----------|
| Introdução..... | 78 |
|------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Material e Métodos..... | 79 |
|--------------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------|-----------|
| Resultados | 81 |
|-------------------------|-----------|

| | |
|------------------------|-----------|
| Discussão | 82 |
|------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------|-----------|
| Referências..... | 89 |
|-------------------------|-----------|

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 93 |
|------------------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS | 95 |
|--------------------------|-----------|

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CICHLIDAE

A ordem Perciformes é a maior dentre os Teleostei, sendo considerada a mais diversificada, compreendendo entre as suas 20 subordens, cerca de 160 famílias, com aproximadamente 1.540 gêneros e 10.033 espécies (NELSON, 2006). As espécies que compõem esta ordem estão amplamente distribuídas e dominam a vida oceânica entre os vertebrados, além de formarem o maior componente da ictiofauna em muitos ambientes dulcícolas tropicais e subtropicais. No entanto, cerca de 60% das espécies descritas habitam a região neotropical e se encontram em apenas oito famílias: Gobiidae, Cichlidae, Labridae, Serranidae, Blenniidae, Pomacentridae, Sciaenidae e Apogonidae. E, devido à sensibilidade a baixas temperaturas, raramente ocorre espécies no extremo sul da América do Sul e extremo Norte da América do Norte (BURGESS, 1991).

Do ponto de vista filogenético, a maioria das famílias dessa ordem não apresenta caracteres morfológicos derivados e compartilhados ou uma combinação de caracteres, que possam definir os Perciformes como um grupo monofilético não podendo, assim, ser definido cladisticamente, sendo claramente um grupo polifilético e, portanto, não natural (BRUM, 1994; NELSON, 2006). Lauder e Liem (1983) acreditam que os peixes da ordem Perciformes sejam um grupo evolutivo basal e que vários outros grupos são derivados deste. Quando comparados aos teleósteos inferiores, este grupo alcançou um nível evolutivo significativo, apesar de ser um grupo diverso ecológica e morfologicamente (NELSON, 2006).

A família Cichlidae representa o maior e mais diversificado grupo de peixes entre os Perciformes Neotropicais, sendo considerado um dos maiores grupos de teleósteos, com cerca de 1600 válidas espécies distribuídas em, aproximadamente, 227 gêneros, apesar de serem estimadas mais de 2.000 espécies, e a grande maioria habita a África e América do Sul, com algumas espécies encontradas na América Central e do Norte e em partes da Ásia (KULLANDER, 1998, MOYLE e CECH JUNIOR, 2000). As outras famílias de Perciformes ricas em espécies são: a Percidae, na Europa e América do Norte com 175 espécies, e a Osphronemidae, no sul da Ásia, com 60 espécies (NELSON, 2006).

Características morfológicas marcantes nos representantes da família Cichlidae, assim como nos Scianidae, são os raios anteriores da dorsal e anal e o primeiro raio da ventral transformados em espinhos, entretanto, somente os ciclídeos apresentam a linha

lateral interrompida, uma anterior, que corre mais dorsalmente e outra posterior que corre sobre o meio do pedúnculo caudal (BRITSKI et al., 1986).

Os ciclídeos são um importante grupo de peixes da região neotropical e, em sua maioria, são peixes adaptados a ambientes lênticos, ocorrendo em uma grande diversidade de ambientes aquáticos, sendo comumente encontrados em lagoas marginais, lagos e mesmo em rios e riachos de todas as regiões do Brasil (BUCKUP, 1999; MOYLE e CECH JUNIOR, 2000). O principal fator que facilita a especiação nos ciclídeos é o fato de adaptarem-se a ambientes com certas condições extremas e, a maior parte deles, terem adaptações em relação à alimentação. Talvez, a riqueza e diversidade de espécies quanto a adaptações tróficas estejam diretamente relacionadas à larga exploração de habitats e nichos (MOYLE e CECH JUNIOR, 2000). Uma característica marcante é a sua tendência de formar grupos extremamente especializados nos grandes lagos, especialmente na África, nos lagos Victoria, Malawi e Tanganika (FRYER e ILES, 1972; RIBBINK, 1990). Nestes lagos, estima-se que ocorram cerca de 500 ou mais espécies no lago Victoria (SEEHAUSEN, 1996), cerca de 500-700 (alguns estimam cerca de 1.000) espécies no lago Malawi (TURNER et al., 2001), enquanto que o Lago Tanganika possui aproximadamente 200-250 espécies de ciclídeos (SNOEKS et al., 1994).

A reprodução nos ciclídeos não apresenta uma época bem definida, como ocorre em outras famílias de peixes, podendo se reproduzir por um período mais longo entretanto, são necessários mais estudos sobre comportamento reprodutivo dos ciclídeos na natureza. Esses peixes não apresentam dimorfismo sexual, diferindo somente no tamanho corpóreo, onde os maiores são os machos, a não ser na época de reprodução quando, então, algumas características podem diferenciar os sexos. O cuidado parental é marcante entre os indivíduos desta família, sendo que este papel é desempenhado principalmente pelas fêmeas, com exceção dos poucos casos onde o cuidado é biparental. Outro traço característico é o cuidado com os ovos e guarda das larvas, onde muitas espécies incubam e desenvolvem seus embriões oralmente (MOYLE e CECH JUNIOR, 2000).

No Brasil, os ciclídeos representam apenas 6% da fauna de peixes de água doce (FELDBERG et al., 2003), e esses peixes representam 2% do total de peixes exportados do Brasil como ornamentais, além de terem um papel muito importante na pescaria, tanto como fonte de alimento, quanto como nas atividades de recreação e comércio para o ecoturismo, já que sua distribuição pelo território nacional é ampla (BRITSKI et al., 1986).

A família Cichlidae tem sido considerada um grupo monofilético, sendo extensivamente estudada porque constitui um exemplo de irradiação adaptativa. Kullander

(1998) propôs uma árvore filogenética para a família Cichlidae baseada em caracteres morfológicos, onde organizou os ciclídeos compreendendo as seguintes subfamílias: Etroplinae, Pseudocrenilabrinae, Retroculinae, Cichlinae (tribos: Crenicichlini e Cichlini), Heterochromidinae, Astronotinae (tribos: Astronotini e Chaetobranchini), Geophaginae (tribos: Geophagini, Acarichthyini e Crenicaratini) e Cichlasomatinae (tribos: Acaroninii, Cichlasomatini e Heroini). Neste mesmo estudo, Kullander propôs que o gênero *Retroculus* é considerado o mais basal dos ciclídeos neotropicais, seguido por *Cichla* e *Crenicichla*, que são considerados grupos irmãos.

Farias et al. (2000), utilizando dados morfológicos e moleculares disponíveis, propuseram uma nova árvore filogenética para os Cichlidae, sendo esta análise considerada a mais completa para os ciclídeos sulamericanos. Esta nova filogenia mostrou-se bastante semelhante à anteriormente proposta por Kullander (1998), corroborando os dados que os ciclídeos africanos e neotropicais pertencem claramente a diferentes cladogramas monofiléticos. Entretanto, algumas diferenças foram observadas como em relação à localização do gênero *Crenicichla*, o qual Farias et al. (2000) não consideram como sendo basal e sim localizado junto à subfamília Geophaginae; segundo estes autores os gêneros basais são: *Retroculus*, *Cichla* e *Astronotus*. Outras diferenças foram em relação à *Acaronia* que não pertence mais a tribo Acaroninii, sendo incluída agora na tribo Cichlasomatini, dentro da subfamília Cichlasomatinae; e ao gênero *Heterochromis*, que Kullander (1998) o considera um ciclídeo neotropical e na nova árvore filogenética, proposta por Farias et al. (2000), este gênero pertence ao clado dos ciclídeos africanos.

Apesar das diferenças observadas, Kullander (1998; 2003) e Farias et al. (2000) concordam que a família Cichlidae é subdividida em oito subfamílias, sendo três consideradas do “velho mundo” (Etroplinae, Pseudocrenilabrinae e Heterochromidinae) e cinco do “novo mundo” (Retroculinae, Cichlinae, Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae).

1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CICHLIDAE

Os estudos citogenéticos em peixes têm crescido de forma expansiva ao longo dos anos, mas continuam sendo poucos os dados obtidos, quando comparados a outras classes de vertebrados. Um levantamento realizado por Brum (1995), relatou a existência de informações cromossômicas sobre peixes para somente 14% das espécies conhecidas.

Na ordem Perciformes, caracterizada como a maior e a mais diversificada dentre os Teleósteos, os dados citogenéticos podem ser considerados escassos, particularmente em espécies marinhas, apesar da grande maioria dos representantes desta ordem habitarem este ambiente. Segundo Affonso (2000), foram descritos cariótipos de cerca de 600 espécies de Perciformes correspondendo, aproximadamente, a 7% do número de espécies descritas para esta ordem, de modo que 80% das espécies descritas citogeneticamente são de populações dulcícolas. Segundo Feldberg et al. (2003), das 150 famílias de Perciformes, em 50 delas são encontradas, no mínimo, uma espécie cariotipada.

O número diplóide ($2n$) mais frequente encontrado nos Perciformes é o de 48, com predominância de cromossomos acrocêntricos, sendo uma característica altamente conservativa no grupo. No entanto, o número fundamental (NF) e, conseqüentemente, as fórmulas cariotípicas, apresentam uma grande variação, com a maioria das espécies apresentando um NF igual ou superior a 48 (FELDBERG et al., 2003; POLETTI et al., 2010a; entre outros).

Os padrões divergentes de cariótipos em Perciformes são encontrados, preferencialmente, nas espécies dulcícolas, representadas na sua maioria pela família Cichlidae, que é a mais estudada citogeneticamente, ou em outras famílias como os Gobiidae e Bleniidae, que apresentam hábitos mais sedentários. No entanto, dados cromossômicos de ciclídeos são conhecidos para apenas 25% de suas espécies (OLIVEIRA et al., 2007). Essa constatação parece corroborar a importância do isolamento geográfico, vagilidade e tamanho populacional na formação e fixação de rearranjos cromossômicos durante a evolução das espécies e contribuindo para maior grau de variação entre as populações (BRUM, 1996; BRUM e GALETTI JUNIOR, 1997; GALETTI JUNIOR et al., 2000).

Os primeiros estudos citogenéticos realizados na família Cichlidae iniciaram-se com Post, em 1965, nas espécies *Hemichromis bimaculatus*, *Neolamprolous leleupi*, *Oreochromis alcalicus*, *Pseudocrenilabrus multicolor* e *Pseudocrenilabrus multicolor*. Entre as 1600 espécies conhecidas apenas 149 têm sido analisadas cariotipicamente em estudos onde, na maioria das vezes, estão limitados à determinação do número diplóide ($2n$), o qual foi encontrado variando de 32 a 60 cromossomos, conforme pode ser visto na tabela abaixo, que compila os dados citogenéticos da família Cichidae, segundo a filogenia, baseada em caracteres morfológicos, proposta por Kullander (1998).

Tabela 1 - Dados cariotípicos da família Cichlidae (2n = número diploide, NF = número fundamental, Ref. = referências).

| Subfamília | Espécies | Localidade | 2n | Fórmula Cariotípica | NF | Ref. |
|---------------------|---------------------------------|--|--------------|-----------------------|-----------|--------------|
| Etroplinae | <i>Etroplus maculatus</i> | | 46 | - | - | 8 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 46 | 18m,sm+18st,a+10 micr | | 83 |
| | <i>E. suratensis</i> | | 48 | - | - | 8 |
| Pseudocrenilabrinae | <i>Astatotilapia burtoni</i> | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 14m,sm+30st,a | | 79 |
| | | | 40 | 14m,s,+26st,a | | 83 |
| | <i>A. latifasciata</i> | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | | 12ms,m+32st,a | | 83 |
| | <i>Haplochromis burtoni</i> | África | 40 | 14m,sm+26st,a | 54 | 21 |
| | <i>H. flavijosephi</i> | Mar da Galiléia | 44 | 10m,sm+34st,a | 54 | 16 |
| | <i>H. obliquidens</i> | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 12m,sm+32st,a | - | 76;80 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 14m,sm+30st,a | | 77 |
| | <i>Hemichromis bimaculatus</i> | | 44 | - | - | 3 |
| | | | 44 | - | 88 | 15 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 8m,sm+36st,a | | 79 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 4m,sm+40st,a | | 80;83 |
| | <i>Labeotropheus trewavasae</i> | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 12m,sm+32st,a | | 79 |
| | | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 14m,sm+30st,a | | 83 |
| | <i>Lithochromis rubripinnis</i> | ilha Matumbi (África) | 44 | 14m,sm+30st,a | | 82 |
| | <i>Melanochromis auratus</i> | África | 46 | 12m,sm+34st,a | 58 | 21 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 12m,sm+32st,a | | 79 |
| | | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 44 | 10m,sm+34st,a | | 80 |
| | <i>Metriaclima lombardoi</i> | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 14m,sm+30st,a | | 83 |
| | <i>Neolamprolous leleupi</i> | | 48 | - | - | 3 |
| | <i>Oreochromis alcalicus</i> | | 48 | - | - | 3 |
| | <i>O. andersonii</i> | | 44 | 4m,sm+40st,a | 48 | 20 |
| | | | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 20 |
| | <i>O. aureus</i> | Mar da Galiléia | 44 | 10m,sm+34st,a | 54 | 16 |
| | | | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 21 |
| | | Fonte Comercial, Stirling (Escócia) | 44 | 12m,sm+32st,a | | 79 |
| | <i>O. macrochir</i> | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 2m,sm+42st,a | | 83 |
| | | Zaire (África) | 44 | - | - | 6 |
| | | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 20 | |

| | | | | | | |
|--------------|-------------------------------------|---|----|---------------|----|-----------------------------------|
| | <i>O. mossambicus</i> | | 44 | - | - | 9;11 |
| | | | 44 | 44m,sm | 88 | 5 |
| | | Fonte Comercial, Stirling (Escócia) | 44 | 8m,sm+36st,a | | 79 |
| | | Fonte Comercial Guangdong (China) | 44 | 6m,sm+42st,a | | 81 |
| | | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 4m,sm+44st,a | | 83 |
| | <i>O. niloticus</i> | Piscicultura | 40 | - | - | 11 |
| | | | 44 | 4m,sm+40st,a | 48 | 2;6;18; 27;32;62 |
| | | Fonte Comercial, Stirling (Escócia) | 44 | 6m,sm+38st,a | | 79 |
| | | rio Tietê/SP (Brasil); Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 44 | 2m,sm+42st,a | | 80;83 |
| | <i>O. urolepis</i> | Fonte Comercial Guangdong (China) | 44 | 6m,sm+38st,a | | 81 |
| | <i>Pelvicachromis pulcher</i> | | 48 | - | - | 3 |
| | <i>Pseudocrenilabrus multicolor</i> | | 44 | - | - | 3 |
| | <i>Sarotherodon galilaeus</i> | | 44 | - | - | 11; 13; 16 |
| | | | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 20 |
| | <i>S. mossambica</i> | África | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 21 |
| | <i>S. multifasciatus</i> | | 44 | - | - | 22 |
| | <i>Tilapia busumana</i> | | 44 | - | - | 22 |
| | <i>T. congica</i> | Zaire (África) | 44 | 10m,sm+34st,a | 54 | 20 |
| | <i>T. guineensis</i> | | 44 | 8m,sm+36st,a | 52 | 20 |
| | <i>T. macrocephala</i> | | 32 | - | - | 1 |
| | <i>T. mariae</i> | África | 40 | 4m,sm+36st,a | 44 | 20 |
| | | | 40 | 8m,sm+32st,a | 48 | 21 |
| | | Fonte Comercial, Maryland (Estados Unidos) | 40 | 10m,sm+30st,a | | 79 |
| | <i>T. rendalli</i> | Ribeirão Preto/SP (Brasil) | 44 | 16m,sm+28st,a | 60 | 14 |
| | | rio Iguaçu/PR (Brasil); Fonte Comercial, Stirling (Escócia) | 44 | 10m,sm+34st,a | 54 | 52;79 |
| | <i>T. sparrmanii</i> | Zaire (África) | 42 | 8m,sm+34st,a | 50 | 20; 21 |
| | <i>T. zillii</i> | | 38 | - | - | 13 |
| | | Mar da Galiléia | 44 | 10m,sm+34st,a | 54 | 16 |
| | <i>Tristramella sacra</i> | Mar da Galiléia | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 16 |
| | <i>T. simonies</i> | Mar da Galiléia | 44 | 6m,sm+38st,a | 50 | 16 |
| Retroculinae | <i>Retroculus lapidifer</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 48st,a | | 77;84 |
| Cichlinae | <i>Cichla</i> sp. | rio Tucuruí/PA; rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 29;43 |

| | | | | | |
|---|---|----|-----------------|----|-----------------------------|
| <i>C. kelberi</i> | rio Araguaia/MT; rio Tietê/SP (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 77;83 |
| <i>C. monoculus</i> | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 43 |
| <i>C. piquiti</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 77;84 |
| <i>C. temensis</i> | Fonte comercial; Amazonas/AM; rio Tocantins/TO (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 17;43;77 |
| <i>C. orinocensis</i> | rio Orinoco (Venezuela) | 48 | 48st,a | 48 | 77 |
| <i>Crenicichla</i> sp. | | 46 | - | - | 40 |
| | rio Paraná (Argentina) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 34;41 |
| | rio Itajaí-Açu /SC (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 56 |
| <i>Crenicichla</i> sp. 1 | rio Iguaçu/PR (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 68 |
| <i>Crenicichla</i> sp. 2 | rio Iguaçu/PR (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 68 |
| <i>Crenicichla</i> sp. A | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 36 |
| <i>Crenicichla</i> sp. B | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 36 |
| <i>C. britskii</i> | rio Jupia/PR (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 60 |
| | rio Olaria/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>Crenicichla</i> aff. <i>britskii</i> | rio Olaria/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>C. cincta</i> | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 60 |
| <i>Crenicichla</i> aff. <i>haroldoi</i> | rio Olaria/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>C. iguassuensis</i> | rio Iguaçu/PR (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 63 |
| | rio Iguaçu/PR (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 68 |
| <i>C. inpa</i> | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 60 |
| <i>Crenicichla</i> cf. <i>johanna</i> | rio Catalão/AM (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 60 |
| <i>C. jupiaensis</i> | | 48 | 2m+4sm+10st+32a | 64 | 72 |
| <i>C. lacustris</i> | Registro (SP) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 25;26 |
| | rio Cação/RJ (Brasil) | 48 | 10m,sm+38st,a | 58 | 61 |
| <i>C. lepidota</i> | Miranda/MS; Rio Paraná/PR; rio São Gonçalo/RS; lagoa Comprida/MT (Brasil); Misiones (Argentina) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17;25;26;37;58;75;77 |
| <i>C. lucius</i> | Fonte comercial | 48 | - | - | 17 |
| <i>C. lugubris</i> | rio Catalão/AM (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 60 |
| <i>C. niederleinii</i> | Misiones (Argentina) | 48 | - | | 58 |
| | rio Piquiri/PR (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 63 |
| | rio Tibagi/PR (Brasil) | 48 | 10m,sm+38st,a | 58 | 56 |
| | rio Paraná/PR (Brasil) | 48 | 14m,sm+34st,a | 62 | 37 |
| <i>C. notophthalmus</i> | Fonte comercial | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>C. reticulata</i> | rio Uatumã/AM; rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 50; 60 |
| <i>C. "saxatilis"</i> | Uruguai | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 10 |
| <i>Crenicichla</i> cf. <i>saxatilis</i> | rio Peixe-boi/PA (Brasil) | 48 | - | - | 51 |

| | | | | | | |
|--------------|------------------------------------|--|----|---------------|----|-----------------------|
| | <i>C. semifasciata</i> | Misiones (Argentina) | 48 | - | - | 58 |
| | | rio Miranda/MS (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 25; 26 |
| | <i>C. strigata</i> | Fonte comercial; rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17;77;84 |
| | <i>C. vittata</i> | rio Miranda/MS (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 25; 26 |
| | <i>Petenia splendida</i> | lagoas, Tabasco (México) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 70 |
| Astronotinae | <i>Astronotus</i> sp. | rio Paraguai/MT (Brasil) | 48 | - | | 40 |
| | <i>A. crassipinnis</i> | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 18m,sm+30st,a | 66 | 39 |
| | <i>A. ocellatus</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | | Fonte comercial | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| | | rio Miranda/MS; Manaus/AM; rio Tietê/SP (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | 60 | 25;26;77; 83 |
| | | rio Tietê/SP (Brasil) | 48 | 16m,sm+32st,a | | 80 |
| | <i>Chaetobranchopsis australis</i> | rio Miranda/MS (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 25;26 |
| | <i>Chaetobranchus flavescens</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77;80 |
| Geophaginae | <i>Acarichthys heckelli</i> | Fonte comercial | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| | <i>Apistogramma agassizii</i> | Fonte comercial | 46 | 24m,sm+22st,a | 70 | 17 |
| | <i>A. borellii</i> | Fonte comercial | 38 | 22m,sm+16st,a | 60 | 17 |
| | | Lagoa Comprida/MS (Brasil) | 46 | 16m,sm+30st,a | | 77 |
| | <i>A. ortmanni</i> | Fonte comercial | 46 | 24m,sm+22st,a | 70 | 17 |
| | <i>A. steindachneri</i> | | 46 | - | 92 | 15 |
| | <i>A. trifasciata</i> | Misiones (Argentina) | 46 | - | | 58 |
| | <i>Biotodoma cupido</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | | 77;84 |
| | <i>Dicrossus filamentosus</i> | Fonte comercial | 46 | 12m,sm+34st,a | 58 | 17 |
| | <i>Geophagus</i> sp. | rio Paraná (Argentina) | 48 | - | 50 | 41 |
| | <i>G. altifrons</i> | rio Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 38 |
| | <i>G. brasiliensis</i> | Rio Claro/SP (Brasil) | 48 | - | 90 | 45 |
| | | rio Paranapanema/SP (Brasil) | 48 | - | 92 | 15 |
| | | Brotas/SP; São Carlos/SP; Pirassununga/SP; Registro/SP; rio Olaria/SP; rio Bonito/SP; ribeirão Araquá/SP; rio Paraitinguinha/SP (Brasil) | 48 | 2m,sm+46st,a | 50 | 25; 26; 77;83 |
| | | Ribeirão Preto/SP (Brasil) | 48 | 3m,sm+45st,a | 51 | 14 |
| | <i>G. brasiliensis</i> | Fonte comercial; Amazônia; rio Tibagi/PR e rio Iguaçu/PR; Saco da Alemoa e rio Forqueta/RS (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 17; 53; 69;74 |
| | | Maricá/RJ; rio Iguaçu/PR /SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 44; 47; 67 |
| | | lagoa Rodrigo de Freitas/RJ; rio Paranapanema /SP; rio Sapucaí/MG (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 35; 37; 44; 46 |

| | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|--|----|--------------------|----|-----------------------|
| | <i>G. proximus</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | | 77;84 |
| | | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 5m,sm+42st,a+1micr | | 84 |
| | <i>Geophagus aff. proximus</i> | rio Tietê/SP (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | | 77 |
| | <i>Geophagus cf. proximus</i> | lago Água Preta/PA (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | 60 | 85 |
| | <i>G. surinamensis</i> | Fonte comercial, rio Amazonas/AM (Brasil); rio Orinoco (Venezuela) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 17;25;26;77 |
| | <i>Guianacara</i> sp. | rio Trombetas/PA (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 30 |
| | <i>Gymnogeophagus</i> sp. | rio Paraná (Argentina) | 48 | - | | 58 |
| | <i>G. gymnogenys</i> | bacia Jacuí/Tramandaí/RS (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 28;74 |
| | | Gasômetro/RS (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 74 |
| | <i>G. balzanii</i> | rio Miranda/MS (Brasil); rio Paraná (Argentina) | 48 | 2m,sm+46st,a | 50 | 24;26;41 |
| | <i>G. labiatus</i> | bacia Jacuí/Tramandaí/RS (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 28 |
| | | Saco da Alemoa e rio Forqueta/RS (Brasil) | 48 | 4m+4sm+40st,a | 56 | 74 |
| | <i>G. lacustris</i> | bacia Jacuí/Tramandaí/RS (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 28 |
| | <i>G. rhabdotus</i> | bacia Jacuí/Tramandaí/RS (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 28 |
| | <i>Satanoperca acuticeps</i> | rio Peixe-boi/PA (Brasil) | 48 | - | | 55 |
| | <i>S. jurupari</i> | rio Amazônia/AM (Brasil) | 48 | - | | 19 |
| | | Fonte comercial; Catalão/AM; rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 17;52;77;80;84 |
| | | Catalão/AM (Brasil) | 48 | 5m,sm+43st,a | 53 | 52 |
| | | Catalão/AM (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 36;52 |
| | <i>S. pappaterra</i> | rio Paraná/PR (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 37 |
| Cichlasomatinae | <i>Acaronia nassa</i> | Marchantaria e Catalão/AM (Brasil) | 50 | 50st,a | 50 | 36 |
| | <i>Aequidens</i> sp. | Amazônia/AM (Brasil) | 48 | 48st,a | 48 | 38 |
| | <i>A. metae</i> | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17; 64 |
| | <i>A. plagiozonatus</i> | rio Paraná/PR (Brasil) | 48 | - | - | 31 |
| | | lagoa Comprida/MS (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | | 77 |
| | <i>A. pulcher</i> | | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 64 |
| | <i>A. rivalatus</i> | | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 64 |
| | <i>A. tetramerus</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | | 77;84 |
| | <i>Amphilophus citrinellus</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | | | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 17 |
| | | | 48 | 36m,sm+12st,a | 84 | 7 |
| | <i>A. macracanthus</i> | | 48 | | 96 | 15 |
| | | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| | <i>Archocentrus centrarchus</i> | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |

| | | | | | |
|---------------------------------|---|----|---------------|-----|-----------------------|
| <i>A. nigrofasciatus</i> | rio Cuarto (Costa Rica) | 48 | - | 96 | 15 |
| | | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 17 |
| <i>A. septemfasciatus</i> | rio Cuarto (Costa Rica) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>Australoheros facetus</i> | lago Polegar/RS (Brasil) | 48 | 22sm+26st,a | 70 | 75 |
| <i>Bujurquina</i> sp. | ilha Mindú/AM (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 66 |
| <i>B. vittata</i> | Misiones (Argentina) | 44 | - | | 58 |
| | | 44 | 26m,sm+18st,a | 70 | 17; 64 |
| <i>Caquetaia kraussii</i> | | 50 | 6m,sm+44st,a | 56 | 17 |
| <i>C. spectabilis</i> | Amazonas/AM (Brasil) | 50 | 50st,a | 50 | 38 |
| <i>Cichlasoma</i> sp. C | rio Paraguai/MT (Brasil) | 46 | - | | 40 |
| <i>C. amazonarum</i> | ilha Mindú/AM (Brasil) | 48 | 2m,sm+46st,a | 50 | 38 |
| <i>C. beani</i> | México | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>C. bimaculatum</i> | | 44 | 44st,a | 44 | 49 |
| | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>C. dimerus</i> | Misiones (Argentina) | 48 | - | | 58 |
| <i>C. facetum</i> | Uruguai | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 10 |
| | Registro/SP; Rio Claro/SP; São Mateus do Sul/PR; rio Tibagi/PR (Brasil) | 48 | 10m,sm+38st,a | 58 | 25; 26; 47; 67 |
| | ribeirão Campo Novo/SP; rio Paraitiguinha/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>C. istlanum</i> | rio Amacuzar e rio Huámito (México) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 54 |
| <i>C. nigrofasciatum</i> | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | | 77 |
| <i>C. octofasciatus</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>C. paranaense</i> | Guaravera, Londrina/PR (Brasil) | 48 | 14m,sm+34st,a | 62 | 48 |
| | rio Paraná/PR (Brasil) | 48 | 20m,sm+28st,a | 68 | 37 |
| | ribeirão Carrapato/SP; ribeirão Batata/SP; ribeirão Taú/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>C. salvini</i> | | 52 | - | 104 | 15 |
| | Belize | 52 | 28m,sm+24st,a | 80 | 17 |
| <i>C. trimaculatus</i> | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>Cleithracara maronii</i> | | 50 | - | 100 | 15 |
| | | 50 | 12m,sm+38st,a | 62 | 64 |
| <i>Herichthys cyanoguttatus</i> | | 48 | - | 94 | 15 |
| | México | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>H. labridens</i> | rio verde (México) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----|--------------------|-----|-----------------|
| <i>H. minckleyi</i> | México | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>Heros</i> sp. | Marchantaria e Catalão/AM (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 36 |
| <i>H. efasciatus</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 8m,sm+40st,a | | 77;80;84 |
| <i>Herotilapia multispinosa</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | Fonte comercial | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>Hypselecara coryphaenoides</i> | | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17 |
| <i>Laetacara araguaiaie</i> | rio Araguaia/MT (Brasil) | 44 | 4m,sm+40st,a | | 84 |
| <i>L. dorsigera</i> | rio Bahia/SP (Brasil) | 44 | 4m,sm+40st,a | | 77 |
| <i>Laetacara</i> cf. <i>dorsigera</i> | rio Paraná/PR (Brasil) | 46 | 2m,sm+46st,a | 48 | 65 |
| | | 45 | 3m,sm+46st,a | 48 | 65 |
| | | 44 | 4m,sm+44st,a | 48 | 65 |
| | | 43 | 5m,sm+44st,a | 48 | 65 |
| <i>Mesonauta festivus</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 17 |
| | rio Negro/AM (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | 60 | 59 |
| | rio Araguaia/MT (Brasil) | 48 | 14m,sm+34st,a | | 77;84 |
| <i>M. insignis</i> | rio Negro/AM (Brasil) | 48 | 12m,sm+36st,a | 60 | 59 |
| <i>Nandopsis tetracanthus</i> | rio San Juan (Cuba) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 23 |
| <i>Nannacara anomala</i> | | 44 | 18m,sm+26st,a | 62 | 17 |
| <i>Neetroplus nematopus</i> | | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 17 |
| <i>Parachromis dovii</i> | rio Cuarto (Costa Rica) | 48 | 8m,sm+40st,a | 56 | 17 |
| <i>P. managuensis</i> | | 48 | - | 96 | 15 |
| | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | 54 | 17;77 |
| <i>Pterophyllum scalare</i> | Fonte comercial; Amazonas/AM (Brasil) | 48 | 4m,sm+44st,a | 52 | 17;39 |
| | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 48 | 6m,sm+42st,a | | 77 |
| <i>Symphysodon aequifasciatus</i> | | 60 | 42m,sm+18micr | 102 | 57 |
| | | 60 | 42m,sm+18micr | 102 | 42 |
| | Amazônia (Brasil) | 60 | citótipos A e B | | |
| | | 60 | 44m,sm+16st,a | 104 | 4 |
| | rio Amazonas, Tefé/AM (Brasil) | 60 | 44m,sm+16micr | 104 | 38 |
| | | | 58m,sm+2st,a | 118 | 17 |
| | Fonte Comercial, Botucatu/SP (Brasil) | 60 | 46m,sm+4st,a+4micr | | 77;83 |
| | lago Bauana, rio Tefé/AM (Brasil) | 60 | 48m,sm+8st,a+4micr | 108 | 71 |
| | | 60 | 50m,sm+6st,a+4micr | 110 | 71;73;78 |
| <i>S. haraldi</i> | rio Manacapuru/AM (Brasil) | 60 | 52m,sm+4st,a+4micr | 112 | 71;73;78 |

| | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----|-------------------|-----|-----------------|
| <i>S. discus</i> | rio Manacapuru/AM (Brasil) | 60 | 42m,sm+18micr | 102 | 36 |
| | | 60 | C1: 46m,sm+14micr | 106 | 42 |
| | | 60 | C2: 48m,sm+12micr | 108 | 42 |
| | rio Negro/AM (Brasil) | 60 | C1: 50m,sm+10st,a | 110 | 71;73;78 |
| | | 60 | C2: 54m,sm+6st,a | 114 | 71 |
| | | 46 | 8m,sm+38st,a | 54 | 17 |
| <i>Uaru amphiacanthoides</i> | | | | | |

Referências: 1- Jakowska (1950); 2- Chervinski (1964); 3- Post (1965); 4- Ohno e Atkin (1966); 5- Natarajan e Subrahmanyam (1968); 6- Jalabert et al. (1971); 7- Nishikawa et al. (1973); 8- Natarajan e Subrahmanyam (1974); 9- Fukuoka e Muramoto (1975); 10- Oyhenart-Perera et al. (1975); 11- Badr e El Dir (1976); 12- Prasad e Manna (1976); 13- Badr e El Dir (1977); 14- Michele e Takahaski (1977); 15- Zahner (1977); 16- Kornfield et al. (1979); 17- Thompson (1979); 18- Arai e Koike (1980); 19- Moreira-Filho et al. (1980); 20- Vervoort (1980); 21- Thompson (1981); 22- Nijjhae et al. (1983); 23- Ráb et al. (1983); 24- Feldberg e Bertollo (1984); 25- Feldberg e Bertollo (1985a); 26- Feldberg e Bertollo (1985b); 27- Majumbar e McAndrews (1986); 28- Peixoto e Erdtmann (1988); 29- Vênera (1988); 30- Feldberg et al. (1990); 31- Martins-Santos et al. (1990); 32- Foresti et al. (1993); 33- Fenocchio et al. (1994); 35- Oliveira et al. (1994); 36- Salgado et al. (1994); 37- Martins et al. (1995); 38- Salgado et al. (1995); 39- Krichanã et al. (1996); 40- Rezende et al. (1996); 41- Roncati et al. (1996); 42- Salgado et al. (1996); 43- Alves (1998); 44- Brum et al. (1998); 45- Corazza et al. (1998); 46- Couto et al. (1998); 47- Quijada e Cestari (1998); 48- Loureiro e Dias (1998); 49- Santos et al. (1998); 50- Alves et al. (1999); 51- Farias et al. (1999); 52- Mendonça et al. (1999); 53- Mizoguchi e Martins-Santos (1999); 54- Uribe-Alcocer et al. (1999); 55- Farias et al. (2000); 56- Loureiro et al. (2000); 57- Mesquita et al. (2000); 58- Roncati et al. (2000); 59- Santos et al. (2001); 60- Benzaquem et al. (2008); 61- Brum et al. (2002); 62- Torres e Leão (2002); 63- Lorscheider (2004); 64- Marescalchi (2005); 65- Martins-Santos et al. (2005); 66- Mendonça (pers. comm.) *apud*. Feldberg et al., 2003; 67- Vicari et al. (2006); 68- Mizoguchi et al. (2007); 69- Pires et al. (2008); 70- Arias-Rodriguez et al. (2008) 71- Mesquita et al. (2008); 72- Graça et al. (2009); 73- Gross et al. (2009); 74- Pires et al. (2010); 75- Perazzo et al. (2010); 76- Poletto et al. (2010a); 77- Poletto et al. (2010b); 78- Gross et al. (2010); 79- Ferreira et al. (2010); 80- Valente et al. (2011); 81- Zhu et al. (2011); 82- Yoshida et al. (2011); 83- Mazzuchelli et al. (2012); 84- Valente et al. (2012) e 85-Rocha et al. (2013).

Fonte: Atualizada e modificada a partir de Thompson (1979), Affonso (2000) e Feldberg et al. (2003).

De acordo com Thompson (1979) o número diplóide igual 48 cromossomos é o mais basal em Cichlidae, o que pode explicar a sua alta frequência dentro da família, já que o número diplóide $2n = 48$ é encontrado em 98 das 149 espécies de ciclídeos analisadas até o momento (65,77%), como demonstrado na tabela anterior. Neste mesmo estudo, Thompson (1979) analisou 41 espécies de ciclídeos neotropicais, e forneceu o primeiro cenário para o entendimento da evolução cariotípica desta família. Dentre as espécies estudadas, 31 apresentaram $2n$ igual a 48 cromossomos, sendo que, entre as demais, foram encontradas 7 espécies com $2n$ abaixo ($2n = 38, 44$ e 46) e 3 espécies com $2n$ acima daquele valor ($2n = 50, 52$ e 60). Posteriormente, vários outros pesquisadores contribuíram com dados citogenéticos, como Kornfield (1984) que apresentou informações cromossômicas para 70 espécies de ciclídeos.

Segundo Feldberg e Bertollo (1985a), a evolução dos cromossomos dos Cichlidae ocorre de modo conservativo mantendo o número diplóide de 48 para muitas espécies e rearranjos como fusões e fissões poderiam explicar as variações de 32 a 60 cromossomos, e ainda as inversões pericêntricas seriam responsáveis pelas variações do número fundamental, de 44 a 118. Cano et al. (1982), sugeriram que as inversões pericêntricas estão entre os principais mecanismos envolvidos na evolução do cariótipo em Teleosteos, levando a alterações no número de braços cromossômicos.

Os dados compilados em ciclídeos, na tabela 1, evidenciam que a ocorrência de modificações que alteram a morfologia cromossômica são mais frequentes que aquelas envolvendo variações numéricas, o que já foi relatado para ciclídeos sul-americanos por Thompson (1979) e Feldberg e Bertollo (1985a).

Com os dados citogenéticos disponíveis, verifica-se que os ciclídeos mais analisados citogeneticamente são os neotropicais, com dados para 114 espécies, contendo representantes em todas as subfamílias (Astronotinae, Cichlasomatinae, Cichlinae e Geophaginae), diferente do grupo africano que apresenta 35 cariotipadas (Etroplinae, Pseudocrenilabrinae, Retroculinae e Heterochromidinae), não tendo nenhum estudo em espécies da última subfamília. Além de que, pode-se observar um padrão de distribuição geográfica do número diplóide para os ciclídeos, onde mais de 71% das espécies africanas apresentam $2n=44$, com variação de 32 a 48 cromossomos, e cerca de 81% das espécies neotropicais apresentam $2n=48$, podendo variar de 38 cromossomos em *Apistograma borellii*, a 60 cromossomos em *Symphysodon discus* (tabela 1).

Feldberg e Bertollo (1985a), realizaram estudos citogenéticos em dez espécies de ciclídeos de várias localidades, sendo eles: *Astronotus ocellatus*, *Batrachops*

semifasciatus, *Cichlasoma facetum*, *Chaetobranchopsis australe*, *Crenicichla lacustris*, *Crenicichla lepidota*, *Crenicichla vittata*, *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus surinamensis* e *Gymnogeophagus balzanii*. Todas as espécies apresentam $2n=48$, em ambos os sexos, ocorrendo variações no número fundamental. A impregnação pelo nitrato de prata evidenciou em todas as espécies 1 par de cromossomos portadores da região organizadora de nucléolo (RON), localizada na porção terminal ou intersticial, exceto em *C. australe* que apresentou apenas 1 cromossomo nucleolar. Todas as marcações das RONS se encontravam sobre as constrições secundárias (FELDBERG e BERTOLLO, 1985b).

Martins et al. (1995) estudando 5 espécies de ciclídeos: *Cichlasoma paranaense*, *Geophagus brasiliensis*, *Satanoperca papaterra*, *Crenicichla niederleinii* e *C. lepidota*, da região de Porto Rico, da bacia do rio Paraná/PR, exceto *G. brasiliensis* que pertencia ao rio Pirapó, da bacia do rio Paranapanema/PR, observaram um número diplóide ($2n$) igual a 48 em todas as espécies, em ambos os sexos, mas também houve variações nas fórmulas cariotípicas entre eles (tabela 1).

Ainda nestas cinco espécies analisadas por Martins et al. (*op. cit.*), a heterocromatina foi limitada à região pericentromérica e à blocos sobre a constrição secundária, exceto em *C. niederleinii* que não apresentou um padrão de banda C satisfatório e somente em *C. lepidota* apareceu uma marcação intersticial adicional. A análise das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) detectou apenas 1 par AgRON nas espécies, exceto em *C. lepidota* que apresentou RONS múltiplas (2 pares).

Outro estudo em *Geophagus brasiliensis* foi conduzido por Brum et al. (1998) de duas lagoas diferentes do Rio de Janeiro: Rodrigo de Freitas e Maricá. Em ambas as localidades o número diplóide encontrado foi de 48, sendo o NF igual a 56 e 54, respectivamente. As AgRONS foram encontradas no braço curto de 1 par cromossômico, com marcações terminais; mas na população da lagoa Rodrigo de Freitas observou-se um mosaico de AgRONS, sendo encontradas de 1 a 6 marcações, com variações no tipo cromossômico. O bandamento C evidenciou marcações pericentroméricas e blocos heterocromáticos teloméricos em alguns cromossomos.

Loureiro (1999) também realizou estudos em *G. brasiliensis* das bacias dos rios Tibagi/PR e Itajaí-Açu/SC e duas populações de *Cichlasoma paranaense*, apenas da bacia do rio Tibagi/PR, que revelaram o $2n$ igual a 48 e NF = 54 e 68, respectivamente. As AgRONS em *G. brasiliensis* estava localizada em 1 par de cromossomos st-a coincidindo com a constrição secundária, já em *C. paranaense* esta região localizava-se em 1 par de cromossomos sm, exceto uma das populações que apresentava RONS múltiplas. Em ambas as

espécies, o tratamento com cromomicina (CMA₃) coincidiu com as marcações encontradas pela impregnação pelo nitrato de prata; e com o fluorocromo DAPI as contrações secundárias mostraram-se negativas.

Em *G. brasiliensis* a heterocromatina se manteve conservada na região centromérica, assim como em região telomérica, correspondendo à constrição secundária, sendo também observada uma marcação intersticial. Em *C. paranaense*, após utilização da enzima de restrição *Alu* I, foi observado um padrão semelhante à distribuição da heterocromatina, localizada em posição centromérica e um bloco sobre a constrição secundária, também terminal (LOUREIRO, 1999).

Estudos realizados por Uribe-Alcocer et al. (1999) em *Cichlasoma instlanum*, pertencente aos rios Amacuzar e Huámito no México, também revelaram $2n=48$ e $NF=56$, nas duas populações. O padrão do bandamento G, com bandas centroméricas em alguns cromossomos submetacêntricos e intersticiais em alguns subteloacrocêntricos, foi similar em exemplares de ambas às localidades. Outro estudo, identificando o número diplóide, foi realizado em lagoas adjacentes à cidade de Villahermosa (Tabasco), no México, por Arias-Rodriguez et al. (2008), analisando *Petenia splendida*, representante monoespecífico do gênero *Petenia*, e verificaram $2n$ igual a 48 e $NF=54$.

O primeiro dado citogenético do gênero *Crenicichla* foi apresentado por Oyhenart-Perera et al. em 1975, descrevendo *C. sexatilis*, mostrando $2n=48$ com 2 pares de cromossomos metacêntricos e 22 pares de acrocêntricos e número fundamental (NF) igual 52. Posteriormente, Thompson (1979) investigou 4 espécies do gênero: *Crenicichla lepidota*, *C. lucius*, *C. notophthalmus* e *C. strigata*, todas com estrutura cariotípica de 6 cromossomos sm e 42 cromossomos st-a e $NF = 54$.

Posteriormente, Loureiro et al. (2000) estudaram duas espécies de *Crenicichla*: *C. niederleinii*, da bacia do rio Tibagi/PR e *Crenicichla* sp., da bacia do rio Itajaí-Açu/SC, com $2n=48$ e $NF= 56$ e 58, respectivamente. A constrição secundária foi encontrada no braço curto do primeiro par cromossômico metacêntrico, em ambas as espécies, mostrando-se AgRON positiva, como já observado por Feldberg e Bertollo (1985b) nas espécies *Crenicichla lacustris*, *C. vittata*, *C. lepidota* e Martins et al. (1995) em *C. niederleinii*. O bandamento C nas espécies analisadas por Loureiro et al. (2000) apresentou o mesmo padrão observado por Martins et al. (1995) em *C. niederleinii* e *C. lepidota*.

Ainda nas duas espécies de *Crenicichla* analisadas por Loureiro et al. (2000), o tratamento com CMA₃ mostrou resultados similares aos do nitrato de prata, caracterizando a RON como rica em bases CG; e no tratamento com DAPI não foi observada

nenhuma marcação, sendo a constrição secundária negativa, semelhante ao resultado de Loureiro (1999) em *G. brasiliensis* e *C. paranaense*.

Lorscheider (2004) estudando as espécies *C. niederleinii* e *C. iguassuensis*, dos rios Piquiri e Iguçu/PR, respectivamente, verificou um $2n=48$ e $NF=64$. As RONS estavam localizadas no segundo par de cromossomos sm, correspondendo à constrição secundária. O fluorocromo específico mitramicina, evidenciou regiões CG ricas correspondentes à RON. A heterocromatina mostrou-se distribuída nas regiões centroméricas e em blocos associados às RONS.

Em trabalhos de Mizoguchi et al. (2007) analisando três espécies de *Crenicichla*: *C. iguassuensis*, *Crenicichla* sp. 1 e *Crenicichla* sp. 2, do rio Iguçu/PR, verificaram $2n=48$, $NF = 56$ e a mesma fórmula cariotípica. A impregnação por nitrato de prata evidenciou marcações intersticiais no braço curto do primeiro par metacêntrico para todas as três espécies de *Crenicichla*, coincidentes com as constrições secundárias e com as marcações de cromomicina A₃. O padrão de heterocromatina também foi similar entre as espécies, com bandas pericentroméricas em quase todos os cromossomos, entretanto, *Crenicichla* sp. 2 apresentou marcações em ambas regiões terminais de alguns cromossomos, padrão este que não tinha sido observado ainda no gênero *Crenicichla*. A RON não se mostrou banda C positiva, podendo ser característico destas espécies do rio Iguçu, já que a mesma espécie analisada por Lorscheider (2004), do rio Piquiri/PR, apresentou associação da heterocromatina com a RON. Desta mesma região, Graça et al. (2009) analisaram uma espécie ameaçada de extinção, *C. jupiaensis* e observaram que esta também apresentava o número diplóide característico do gênero.

Posteriormente, Benzaquem et al. (2008), analisaram seis espécies de *Crenicichla*: *C. britskii*, *C. lugubris*, *Crenicichla* cf. *johanna*, *C. inpa*, *C. reticulata* e *C. cincta*, coletadas próxima da confluência do rio Negro/AM e rio Solimões/AM, exceto a primeira espécie, coletada no rio Paraná. Todas apresentaram $2n=48$, porém com fórmulas cariotípicas diferentes. A constrição secundária foi encontrada no braço curto do primeiro par cromossômico metacêntrico para as três últimas espécies, no braço longo de cromossomos meta-submetacêntrico para *C. britskii* e *C. lugubris*, e no braço curto de cromossomos subtelo acrocêntricos em *Crenicichla* cf. *johanna*, onde através da impregnação por nitrato de prata, mostrou-se AgRON positiva (tabela 1).

Em estudos feitos com *Geophagus brasiliensis* por Pires et al. (2008) de diferentes pontos da bacia do rio Tibagi/PR, também foi observada a ocorrência de um complemento de 48 cromossomos, sendo a maioria do tipo subtelo-acrocêntrico, uma

característica comum em *G. brasiliensis*, com $NF = 52$. A AgRON foi observada no braço curto de um par cromossômico do grupo st-a, coincidindo com a constrição secundária, nas duas populações, sendo que em uma delas foi observado um heteromorfismo de tamanho desta região. Resultados encontrados pelo tratamento com o fluorocromo cromomicina (CMA_3), confirmam os dados obtidos pela prata e comprovam que a RON é rica em pares de bases CG. A heterocromatina mostrou-se distribuída na região centromérica da maioria dos cromossomos, assim como na constrição secundária. Resultados semelhantes foram observados por Pires et al. (2010), em diferentes populações de *G. brasiliensis*, pertencentes ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS.

Ainda no trabalho de Pires et al. (2010), de diferentes localidades do sistema hidrográfico Laguna dos Patos/RS, foram estudadas duas espécies de *Gymnogeophagus*, *G. gymnogenys* e *G. labiatus*, e ambas também apresentam um complemento de 48 cromossomos, com diferentes fórmulas cariotípicas. Foi observado que uma das populações de *G. gymnogenys* possuía a RON em região terminal, diferente das demais populações estudadas, nas quais esta região era intersticial, sendo proposta pelos autores a ocorrência de inversões pericêntricas. As RONs eram coincidentes com as constrições secundárias e com as marcações de CMA_3 . O bandamento C revelou heterocromatina nas regiões pericentroméricas e nas AgRONs para todas as espécies.

Em 2006, Vicari et al. analisaram *G. brasiliensis* e *Cichlasoma facetum* provenientes de diferentes rios do estado do Paraná, as quais apresentaram $2n=48$, com predominância de cromossomos do tipo subtelo-acrocêntricos, caracterizando $NF=54$ e 58 , respectivamente. As RONs foram identificadas no braço curto de um par st-a, coincidente com a constrição secundária e com o fluorocromo CMA_3 . A banda C revelou marcações heterocromáticas nas regiões pericentroméricas e RONs para ambas as espécies. Entretanto, os autores verificaram bandas intersticiais em alguns cromossomos de *G. brasiliensis* do rio Jaguariaíva, além de apresentar uma maior quantidade de heterocromatina quando comparada com as outras populações.

Estudos realizados por Perazzo et al. (2010) em *Crenicichla lepidota* e *Australoheros facetus*, demonstraram que ambas as espécies apresentam o número diplóide igual a 48, com distintos cariótipos. As AgRONs foram observadas no braço curto de diferentes pares cromossômicos do grupo m-sm, coincidentes com o fluorocromo cromomicina (CMA_3), comprovando que a região é rica em pares de bases CG. A heterocromatina mostrou-se distribuída na região centromérica da maioria dos cromossomos.

Recentemente, Valente et al. (2012) analisaram comparativamente dez espécies de ciclídeos do rio Araguaia/MS, entre elas: *Aequidens tetramerus*, *Biotodoma cupido*, *Cichla piquiti*, *Crenicichla strigata*, *Geophagus proximus*, *Heros efasciatus*, *Laetacara araguaiae*, *Mesonauta festivus*, *Retroculus lapidifer* e *Satanoperca jurupari*. Exceto *L. araguaiae* que apresentou $2n=44$, todas as outras apresentam 48 cromossomos, apenas um par AgRON e a heterocromatina geralmente distribuída na região pericentromérica.

Na última década, as investigações sobre as espécies do gênero *Symphysodon* aumentaram consideravelmente. No entanto, as análises citogenéticas em *S. aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi*, mostraram similaridades em relação ao $2n=60$ e a predominância de cromossomos meta-submetacêntricos, porém com diferentes fórmulas cariotípicas e quantidade de microcromossomos (MESQUITA et al., 2008; GROSS et al., 2009, 2010; MAZZUCHELLI et al., 2012, entre outros). A heterocromatina mostrou-se distribuída na região centromérica da maioria dos cromossomos e o sistema de RONS múltiplas. Interessante notar que, em estudos meióticos em *S. aequifasciatus* e *S. haraldi* foi visualizado a maior cadeia cromossômica meiótica dentre os vertebrados (GROSS et al., 2009).

A hibridação *in situ* (FISH), já foi realizada em algumas espécies de ciclídeos neotropicais com sonda de DNAr 18S, revelando com exatidão os cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos, confirmando os resultados obtidos pela impregnação de nitrato de prata, como evidenciado por Pires et al. (2008) em *Geophagus brasiliensis*, Vicari et al. (2006) em *Cichlasoma facetum* e *G. brasiliensis*, Perazzo et al (2010) em *Crenicichla lepidota* e *Australoheros facetus*, Gross et al. (2010) em *Symphysodon aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi* e Poletto et al. (2010a) em *Satanoperca jurupari* e *C. lepidota*, entre outros.

Em relação à utilização da sonda de DNAr 5S, foram observadas marcações intersticiais no braço longo de cromossomos diferentes aos portadores dos cístrons de DNAr 18S, para *C. facetum* e *G. brasiliensis* (VICARI et al., 2006) e *C. lepidota* (PERAZZO et al, 2010), e marcações terminais no braço curto em *S. aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi*, também em cromossomos não portadores das RONS (GROSS et al., 2009).

Em relação aos polimorfismos cromossômicos já foram relatados em Cichlidae por Martins-Santos et al. (2005) e Valente et al. (2012), onde no primeiro estudo a espécie *Laetacara cf. dorsigera* apresentou 4 citótipos diferentes, com $2n = 46, 45, 44$ e 43 cromossomos. As diferenças nas fórmulas cariotípicas estavam relacionadas com o número de

cromossomos metacêntricos presentes, sendo estes inversamente proporcionais ao seu número diplóide, levando assim a um NF constante igual 48. Segundo os autores, eventos de fusões cêntricas, como translocação Robertsoniana e formação de isocromossomo, estariam envolvidos neste processo de polimorfismo, levando à variação do número diplóide e dos cromossomos metacêntricos nesta espécie. Diferentemente, no estudo de Valente et al. (2012), a espécie *Geophagus proximus* apresentou dois citótipos diferentes, mas com o mesmo número diplóide ($2n=48$) e os autores consideraram que este polimorfismo foi consequência de translocações Robertsonianas entre dois cromossomos subtelo-acrocêntricos, resultando em um cromossomo metacêntrico grande e um elemento puntiforme.

1.3 OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS B NA FAMÍLIA CICHLIDAE

As espécies são formadas por um conjunto de cromossomos que constituem o cariótipo normal da espécie no entanto, em algumas, cromossomos extras estão presentes. Estes cromossomos são também conhecidos como supranumerários, acessórios ou Bs, e sua ocorrência pode variar entre células de um mesmo indivíduo. Geralmente, são de tamanho pequeno e heterocromáticos, mas podem ser grandes ou até mesmo se assemelhar aos outros do complemento normal (GUERRA, 1988).

Ao longo do tempo, citogeneticistas tentaram definir os supranumerários porém, nem sempre as características estabelecidas estão presentes em todos os cromossomos B analisados (KASAHARA, 2009). De acordo com Jones e Rees (1982), existem alguns critérios pelos quais os cromossomos supranumerários podem ser diferenciados do complemento normal; de maneira geral os critérios são: I- não são essenciais à reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos que os possuem; II- apresentam uma frequência variável tanto intra como interindividual, podendo variar também quanto à morfologia nos diferentes indivíduos que os apresentam; III- não são homólogos a nenhum cromossomo do complemento padrão; IV- geralmente são formados de heterocromatina; V- geralmente são subinertes, isto é, destituídos de genes, não apresentando assim efeitos fenotípicos detectáveis; VI- não seguem as leis mendelianas, ou seja, não tem um padrão definido de divisão meiótica e/ou mitótica.

Em alguns organismos os cromossomos B são herdados como os autossomos, indicando certa estabilidade durante o ciclo celular somático. E, durante a meiose, os cromossomos B se pareiam entre si formando bivalentes, podendo até formar multivalentes quando mais de dois estiverem presentes, embora raramente pareiem com a

mesma eficiência e regularidade dos autossômicos. Contudo, os Bs tem comportamento variável quando não ocorrem em pares e, geralmente, há uma pequena perda meiótica de univalentes, mas este evento (perda) é importante, desde que é um dos meios pelo qual a frequência dos Bs pode ser ajustada na população (JONES, 1975 *apud* MARTINS, 1995).

Os cromossomos B têm sido encontrado em todos os maiores grupos de animais e de plantas (CAMACHO et al., 2000), de modo que se estima que estejam presentes em 15% de todas as espécies vivas (BEUKEBOOM, 1994; KASAHARA, 2009). Entre os peixes, a partir dos anos de 1980 começaram as primeiras descrições e, segundo levantamento realizado por Carvalho et al. (2008), cromossomos B foram encontrados, em 61 espécies de peixes dulcícolas neotropicais, distribuídas em 16 famílias de sete ordens diferentes. A ordem com maior ocorrência de Bs é a Characiformes, com descrição em 31 espécies, seguida pelos Siluriformes e Perciformes, em 21 e 5 espécies, respectivamente. E as ordens Beloniformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes contêm apenas uma espécie com cromossomos extras (CARVALHO et al., 2008). No entanto, em alguns grupos de peixes, a presença destes cromossomos parece ser mais frequente, como nos gêneros *Prochilodus* (Prochilodontidae), *Cyphocharax* e *Steindachnerina* (Curimatidae), *Astyanax* (Characidae), *Iheringichthys* (Pimelodidae) e *Rhamdia* (Heptapteridae).

A família Cichlidae é a única família dentro da ordem dos Perciformes que apresenta relatos de cromossomos B, os quais foram descritos pela primeira vez, em ciclídeos neotropicais, nas células germinativas de *Gymnogeophagus balzanii* (FELDBERG e BERTOLLO, 1984). Posteriormente, Feldberg et al. (2004) verificaram a presença de cromossomos supranumerários em células somáticas de *Crenicichla reticulata*, *Cichla monoculus* e *Cichla* sp. da bacia Amazônica. Essas três espécies apresentaram $2n = 48$, mais 1 a 3 microcromossomos B e a banda C revelou que eram completamente heterocromáticos.

Martins-Santos et al. (1995) descreveram a presença de “corpúsculos de cromatina” em células somáticas de *Geophagus brasiliensis*, *Satanoperca papaterra* e *Crenicichla niederleini*, não descartando a possibilidade de estes serem cromossomos B. Em 2005, Martins-Santos et al. observaram em *Laetacara* cf. *dorsigera* de 1 a 2 cromossomos B em um dos seus citótipos ($2n = 44$) e sua origem poderia ser explicada pela perda de segmentos cromossômicos da região centromérica, envolvidos no processo de fusão cêntrica de dois acrocêntricos.

Já nos ciclídeos africanos foram descritos Bs, recentemente, em treze espécies. Poletto et al. (2010a) verificaram este tipo de cromossomo em *Astatotilapia latifasciata* (citado como *Haplochromis obliquidens*), sendo metacêntrico de tamanho grande.

Logo após, foi observada a presença de cromossomos supranumerários em células somáticas de *Metriaclima lombardoi* (POLETTO et al., 2010b) e, mais recentemente em onze espécies de ciclídeos pertencentes ao lago Victoria, na África, sendo elas: *Lithochromis rubripinnis*, *L. rufus*, *Pundamilia pundamilia*, *Neochromis greenwoodi*, *N. rufocaudalis* e em 6 espécies do gênero *Haplochromis* (YOSHIDA et al., 2011).

Considerando os dados cromossômicos disponíveis em mais de 149 espécies de ciclídeos, somente oito espécies foram descritas carregando cromossomos B. Isto representa cerca de 5% dos ciclídeos cariotipados, o qual consiste com a frequência de cromossomos B nos peixes em geral (FELDBERG et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo geral caracterizar citogeneticamente diferentes espécies da família Cichlidae, visando contribuir com mais informações a respeito desta família, para o entendimento da estrutura e evolução cariotípica deste grupo de peixes, bem como suas relações filogenéticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ analisar e comparar os cariótipos de espécies de peixes da família Cichlidae da bacia do rio Paranapanema, do rio Paraguai, e da bacia do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e do Tramandaí;
- ❖ detectar as regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs) e analisar a distribuição de heterocromatina;
- ❖ identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases G-C e A-T;
- ❖ localizar os cístrons ribossômicos 18S;
- ❖ observar o comportamento meiótico do cromossomo B em *Crenicichla lepidota* da laguna dos Patos/RS
- ❖ contribuir com dados citogenéticos sobre este grupo de peixes para um melhor entendimento de suas relações evolutivas.

3 ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETA

Para o presente trabalho foram analisadas doze espécies de peixes da família Cichlidae, pertencendo a três gêneros: *Cichlasoma*, *Crenicichla* e *Gymnogeophagus* (Figura 1). Estas espécies foram coletadas em diferentes pontos de quatro bacias hidrográficas distintas:

3.1 BACIA DO RIO PARANAPANEMA

Nesta bacia foram coletadas três espécies de *Crenicichla*: *C. britskii*, coletada no ribeirão Taquari/PR e rio Paranapanema/SP, *C. haroldoi* coletada no ribeirão Pavão/PR e *C. niederleinii* coletada no ribeirão Três Bocas/PR; e *Cichlasoma paranaense* coletada no ribeirão Taquari/PR e rio Paranapanema/SP (Figura 2).

3.2 BACIA DO RIO PARAGUAI

Nesta bacia foram coletadas duas espécies de *Crenicichla*: *C. semifasciata* e *C. lepidota*, e *Cichlasoma dimerus*, todas coletadas no rio Miranda/MS (Figura 2).

3.3 BACIA DO SISTEMA HIDROGRÁFICO LAGUNA DOS PATOS

O sistema hidrográfico Laguna dos Patos pode ser subdividido em duas outras menores: as bacias do Lago Guaíba e do Tramandaí (Figura 2). No Lago Guaíba foram coletadas seis espécies, em diferentes pontos, sendo:

- Saco da Alemoa: *Crenicichla lepidota* e *C. punctata*;
- Gasômetro: *C. lepidota* e *C. punctata*;
- Arroio Capivara: *C. lepidota*;
- Estação Experimental Agrônômica da UFRGS: *C. lepidota*, *Cichlasoma portalegrense* e *Gymnogeophagus rhabdotus*;
- Forqueta: *C. punctata*;

Na bacia do Tramandaí foram coletadas três espécies: *Crenicichla maculata* e *C. lepidota*, coletadas no rio Maquiné e na Barra do João Pedro, respectivamente; e *Gymnogeophagus lacustris* coletada na lagoa Rondinha (Figura 2).

Figura 1 - Fotos das espécies coletadas: *Crenicichla britskii* (a), *Crenicichla haroldoi* (b), *Crenicichla lepidota* (c), *Crenicichla maculata* (d), *Crenicichla niederleinii* (e), *Crenicichla punctata* (f), *Crenicichla semifasciata* (g), *Cichlasoma dimerus* (h), *Cichlasoma paranaense* (i), *Cichlasoma portalegrense* (j), *Gymnogeophagus rhabdotus* (k) e *Gymnogeophagus lacustris* (l).

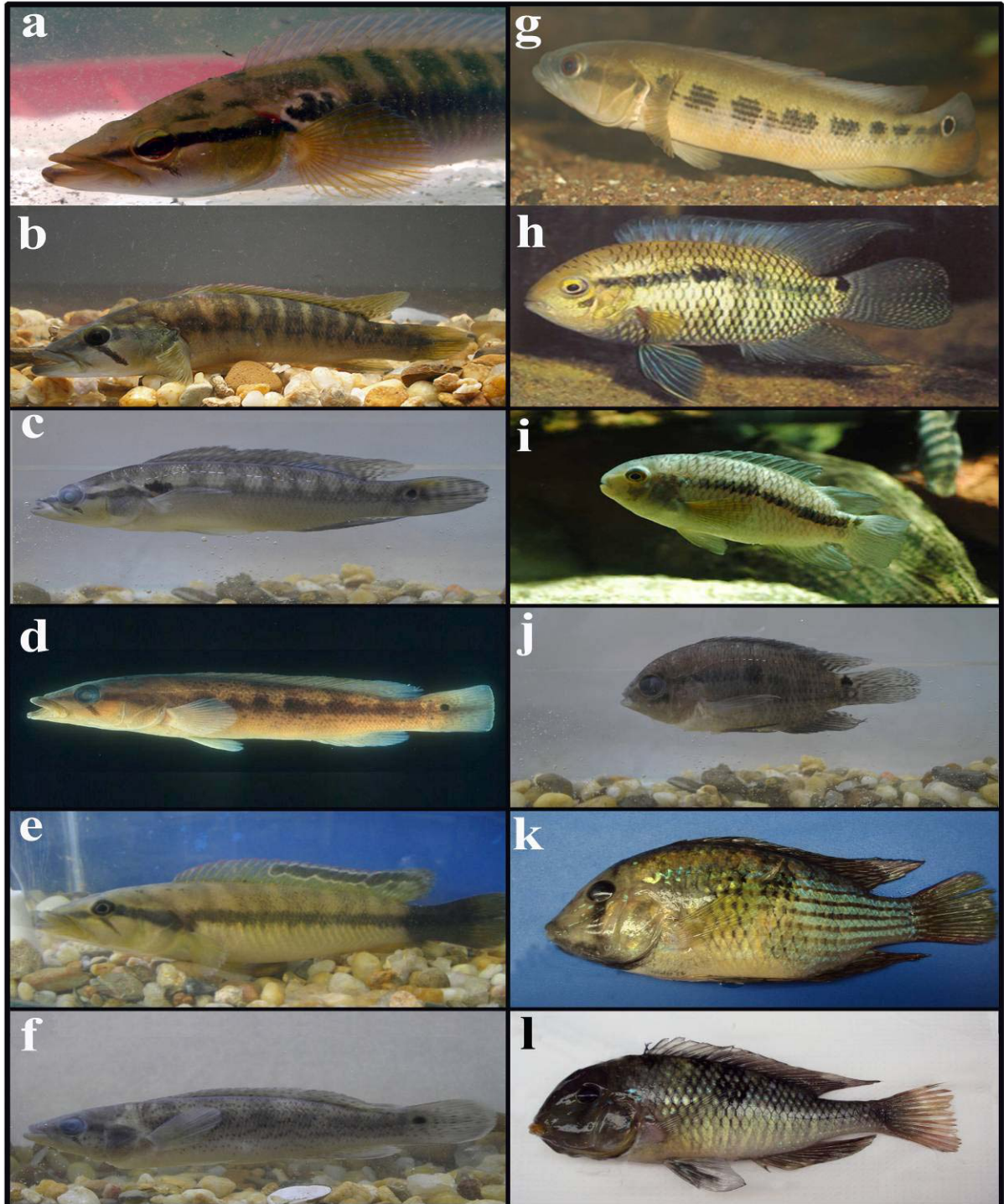
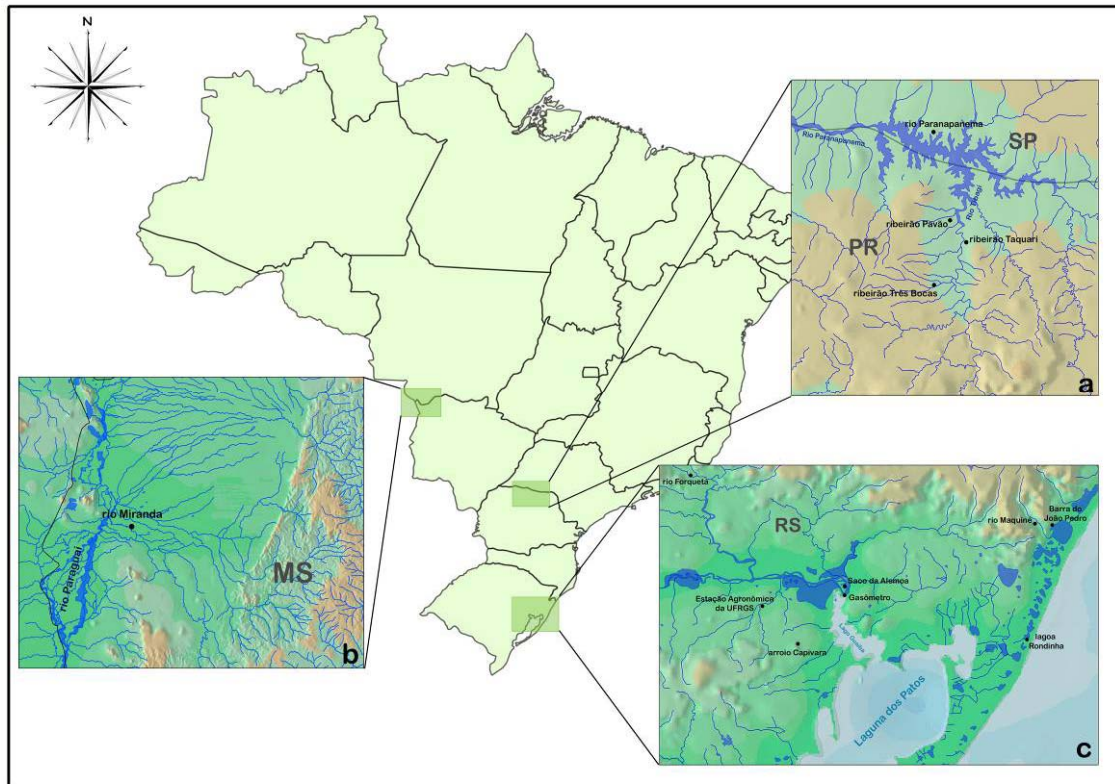


Figura 2 – Mapa representando os locais de coleta: bacia do rio Paranapanema (a), bacia do rio Paraguai (b) e o sistema hidrográfico Laguna dos Patos (c). Os pontos indicam os locais de coletas.



CAPÍTULO 1**Comportamento mitótico e meiótico do cromossomo B de *Crenicichla lepidota*
(Cichlidae)***

* Este artigo será enviado para **Cytogenetic and Genome Research**.

**Comportamento mitótico e meiótico do cromossomo B de *Crenicichla lepidota*
(Cichlidae)**

Larissa B. Pires; Tatiane R. Sampaio; Ana Lucia Dias*

Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil

Resumo

Cromossomos B são elementos genéticos adicionais ao complemento padrão, com características próprias, presentes em 15% das espécies eucarióticas, tanto vegetais quanto animais. Foram analisadas quatro populações de *Crenicichla lepidota*, coletadas em diferentes pontos do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS (Brasil). Todos exemplares apresentaram $2n=48$ com $6m+42st-a$ e $NF=54$, com uma constrição secundária no primeiro par do complemento. Entre os 18 espécimes analisados, 6 indivíduos pertencentes às populações do Gasômetro e Saco da Alemoa, apresentaram de 1 a 3 cromossomos B heterocromáticos de tamanho pequeno, variando tanto inter quanto intra-individualmente. Todas as populações apresentaram RONS simples e estas regiões foram CMA_3 positivas e DAPI negativas. Nas análises meióticas foram detectadas regiões heteropicnóticas, evidentes nas fases de leptóteno e zigóteno, que poderiam estar relacionadas com a presença do cromossomo B nestas células. Em paquíteno, foram observados 24 bivalentes e um univalente isolado, assim como em metáfases I e diplóteno, provavelmente o cromossomo B, demonstrando que este não apresenta homologia com os outros do complemento normal. Na diacinese, foi evidenciada uma configuração meiótica incomum, onde dois bivalentes do complemento A se mostravam mais próximos ao cromossomo B univalente e, em anáfase I, foram visualizados cromossomos B com migração tardia. Não foi localizado nenhum sítio de DNAr 18S nestes cromossomos extras. A baixa ocorrência deste tipo de cromossomo na família Cichlidae e no gênero *Crenicichla* sugere seu recente aparecimento neste grupo de peixes, visto que é o primeiro relato em *C. lepidota*.

Palavras-chave: Cromossomo supranumerário. Meiose. Pisces. Univalente.

Introdução

Camacho et al. (2000) consideram que cromossomos adicionais, com certas características específicas, são chamados de cromossomos supranumerários, acessórios ou Bs, a fim de distingui-los do complemento padrão A (complemento normal diplóide). Cromossomos B podem ser originados intraespecificamente do complemento padrão A ou interespecificamente como resultado de acasalamento de espécies diferentes, estes cromossomos podem também ser subprodutos de rearranjos cromossômicos ou de

* Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, Telefone e Fax: +55 043 33714417.

cromossomos prejudicados por algum fator e, posteriormente, seguem seus próprios caminhos evolutivos (Camacho et al., 2000).

Na maioria dos casos, a presença de cromossomos B não acarreta nenhum efeito fenotípico sobre o portador, assim como não se mostra prejudicial (Jones e Rees, 1982). Entretanto, alguns autores levantam a possibilidade de que a presença deste cromossomo seja benéfica, visto que cromossomos B apresentam uma ampla distribuição, ocorrendo em diversos grupos, como fungos (10 espécies), plantas (superior a 130 espécies) e animais (superior a 500 espécies), porém nenhuma evidência concreta suporta esta suposição (Camacho et al., 2000).

Cromossomos B foram descritos pela primeira vez em peixes, por Pauls and Bertollo (1983), em *Prochilodus lineatus* (citado como *P. scrofa*) e, desde então, novas ocorrências foram registradas segundo levantamento realizado por Carvalho et al. (2008), que mostra a ocorrência deste tipo de cromossomo para diferentes espécies de peixes, podendo variar tanto em tamanho quanto em número. Entre os ciclídeos neotropicais, já foi relatada a ocorrência de cromossomos B em apenas *Gymnogeophagus balzanii*, *Crenicichla reticulata*, *Cichla* sp., *Cichla monoculus* e *Laetacara* cf. *dorsigera* (Carvalho et al., 2008), já nos ciclídeos africanos, foram encontrados cromossomos extras em 13 espécies: *Astatotilapia latifasciata* (citado como *Haplochromis obliquidens*) (Poletto et al., 2010a), *Metriaclima lombardoi* (Poletto et al., 2010b), *Lithochromis rubripinnis*, *L. rufus*, *Pundamilia pundamilia*, *Neochromis greenwoodi*, *N. rufocaudalis* e em 6 espécies de *Haplochromis* (Yoshida et al., 2011).

Estudos meióticos na família Cichlidae são escassos, assim como nos peixes teleósteos em geral. Até o momento, apenas dois gêneros de ciclídeos sulamericanos apresentam estudos meióticos, *Gymnogeophagus* e *Symphysodon* (Feldberg e Bertollo, 1984; Gross et al., 2009; 2010a; 2010b). Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência e frequência de cromossomos B de *Crenicichla lepidota*, de diferentes localidades do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS, com um enfoque particular no seu comportamento durante a meiose, a fim de obter informações que possibilitem uma melhor compreensão da possível origem e evolução destes cromossomos.

Material e Métodos

No presente trabalho foram analisados 18 indivíduos (12 machos e 6 fêmeas) de *Crenicichla lepidota* (figura 1b), coletados em diferentes pontos do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS: Saco da Alemoa (S51°14'29.12'' W51°14'24.1''), Gasômetro (S30°02'06.3'' W51°14'29.12''), Arroio Capivara (S30°17'34.0'' W51°19'21.2'') e Estação Experimental Agronômica da UFRGS (S30°5'38.38'' W51°40'22.4''). Os exemplares de *C. lepidota* foram coletados com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: número da licença - 1947869) e catalogados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, com os seguintes números de catálogo: MZUEL 4836; MZUEL 4881; MZUEL 5051; MZUEL 5080; MZUEL 5100 e MZUEL 5100.

As preparações cromossômicas mitóticas e meióticas foram obtidas de células do rim anterior e das gônadas masculinas, por preparação direta, de acordo com as técnicas descritas por Bertollo et al. (1978) e Kligerman e Bloom (1977), respectivamente, com algumas modificações, e depois coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6.8. Os cromossomos mitóticos foram classificados conforme Levan et al. (1964), com modificações. Para determinação do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos foram considerados com dois braços e o grupo subtelo-acrocêntrico com um braço.

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) pela impregnação por nitrato de prata e a determinação do padrão de heterocromatina foram realizadas de acordo com as técnicas descritas por Howell e Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. Para a determinação dos sítios ricos em bases GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,6-diamino-phenylindole (DAPI), respectivamente, de acordo com a técnica de coloração descrita por Schweizer (1980), com modificações. A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada seguindo protocolo de Pinkel et al. (1986), com modificações, utilizando sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr 2004). As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Leica DM2000) e as metáfases foram capturadas pelo software Leica Application Suite, versão 3.1.0. (Leica Microsystems).

Resultados e Discussão

O número diplóide encontrado para *Crenicichla lepidota* de todas as localidades estudadas foi de 48 cromossomos, com fórmula cariotípica de $6m+42st-a$ e número fundamental igual 54, para ambos os sexos (figura 1a), como já evidenciado por Feldberg and Bertollo (1985a, 1985b); Martins-Santos et al. (1995); Fenocchio et al. (2003) e Poletto et al. (2010b) analisando esta mesma espécie, sendo visualizada uma constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico (figura 1a). Todas espécies de *Crenicichla* até agora cariotipadas apresentam este número diplóide, assim como a maioria dos ciclídeos neotropicais (Feldberg et al., 2003), exceto *Crenicichla* sp. que apresentou $2n=46$ (Rezende et al., 1996).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas intersticialmente no braço curto do maior par cromossômico, pela impregnação por nitrato de prata e confirmadas pela FISH, com sonda de DNAr 18S (figura 1d-e, respectivamente), sendo coincidentes com as constrições secundárias observadas pela coloração com Giemsa. O tratamento com o fluorocromo cromomicina A_3 evidenciou marcações fluorescentes nestas regiões, que mostraram bandas negativas após coloração com DAPI (Figura 1f). A presença de NORs simples, ricas em pares de bases GC, localizadas no braço curto do maior par cromossômico é bastante conservado neste gênero, como já relatado por Mizoguchi et al. (2007), Perazzo et al. (2010), entre outros.

Apesar do mesmo número diplóide e constituição cariotípica, somente o presente estudo ressalta a ocorrência de cromossomos supranumerários ou Bs em *C. lepidota*. Entre os 18 espécimes analisados desta espécie, 6 indivíduos (3 machos e 3 fêmeas), apresentaram de um (1) a três (3) pequenos cromossomos B, numa frequência de 33,3%, sendo estes os menores do complemento e, dependendo da condensação cromossômica, pode ser observado, em algumas metáfases, como um pequeno metacêntrico heterocromático (figura 1c), semelhante ao encontrado por Feldberg et al. (2004) em ciclídeos amazônicos. Somente as populações do Saco da Alemoa e Gasômetro apresentaram cromossomos B, sendo que somente a última apresentou de dois a três Bs. No total de 136 células mitóticas analisadas destes seis indivíduos, 72,06% das células não apresentaram Bs; 21,32% apresentaram 1B; 5,15% com 2 Bs e 1,47% com 3Bs (tabela 1).

A família Cichlidae é a única família dentro da ordem dos Perciformes que apresentou relatos de cromossomos B encontrados, até o momento, em cinco espécies de ciclídeos neotropicais: *Cichla* sp., *Cichla monoculus*, *Crenicichla reticulata*,

Gymnogeophagus balzanii e *Laetacara* cf. *dorsigera*, relatados em revisão feita por Carvalho et al. (2008), e em treze espécies de ciclídeos africanos, *Astatotilapia latifasciata* (citado como *Haplochromis obliquidens*) (Poletto et al., 2010a), *Metriaclima lombardoi* (Poletto et al., 2010b) e em onze espécies pertencentes ao lago Victoria (Yoshida et al., 2011) (tabela 2). Martins-Santos et al. (1995) descreveram a presença de “corpúsculos de cromatina” em células somáticas de *Geophagus brasiliensis*, *Satanoperca papaterra* e *Crenicichla niederleinii*, não descartando a possibilidade de estes serem cromossomos B.

Cromossomos B já foram relatados em outras diferentes ordens de peixes, como em Siluriformes, Characiformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes (Carvalho et al., 2008). No entanto, em alguns grupos de peixes, a presença destes cromossomos parece ser mais frequente, como nos gêneros *Prochilodus* (Prochilodontidae), *Cyphocharax* e *Steindachnerina* (Curimatidae), *Astyanax* (Characidae), *Iheringichthys* (Pimelodidae) e *Rhamdia* (Heptapteridae).

Na maioria dos estudos com Bs em Cichlidae, o tipo mais frequentemente encontrado foi microcromossomo, inclusive no presente estudo em *C. lepidota*. Porém, Poletto et al. (2010a; 2010b) encontraram, nas espécies africanas, este cromossomo de tamanho grande, diferindo portanto dos dados dos ciclídeos neotropicais (tabela 2). O tamanho dos cromossomos B pode ser mais uma característica citogenética que diferencia os ciclídeos neotropicais dos africanos, assim como o número diplóide, onde estes apresentam, predominantemente, 48 e 44 cromossomos, respectivamente.

Analisando as células meióticas, dos indivíduos das populações do Saco da Alemoa e do Gasômetro, foram observadas metáfases espermatogoniais com 49 cromossomos sendo um destes, provavelmente, o cromossomo B (figura 2a). Nas fases iniciais da prófase I (leptóteno e zigóteno) regiões heteropicnóticas bem evidentes foram observadas, o que pode indicar a presença do cromossomo B nestas células (figura 2b-c). Este padrão heteropicnótico do B pode estar relacionado ao fato deste ser um cromossomo diferenciado, pelo seu tamanho reduzido e por estar mais condensado, apresentando assim características próprias. Interessante notar que o cromossomo B também se mostrou heteropicnótico em outras fases meióticas subsequentes como paquíteno, diacinese e metáfase I (figura 2e, g, i; respectivamente).

Analisando várias células em paquítenos iniciais, foi possível observar um univalente (I) deslocado dos demais bivalentes (II) (figura 2d, 3f,j, box); e em paquítenos bem definidos foram observados 24 bivalentes e um univalente um pouco deslocado e mais corado, podendo ser o cromossomo B, como citado acima (figura 2e), demonstrando que ele

não apresenta homologia com os cromossomos do complemento padrão. O esquema mostrado na figura 2e' foi feito para uma melhor visualização e identificação dos univalentes e bivalentes na célula em paquíteno. Cromossomos B foram observados durante o diplóteno, sendo constatada a ocorrência de dois Bs que não se mostraram associados (figura 2f).

A análise do comportamento dos cromossomos meióticos em *Crenicichla lepidota* revelou uma característica peculiar, como observada durante a diacinese, onde uma configuração meiótica incomum entre os bivalentes e o cromossomo B (univalente) foi notada, podendo esta ser uma configuração diferenciada deste B durante esta fase (figura 2g e 3g). No entanto, não foi evidenciado nenhum pareamento entre este cromossomo e os do complemento padrão durante a fase de paquíteno, confirmando que seja apenas alguma configuração diferenciada entre os cromossomos envolvidos.

As células em metáfase I apresentavam o alinhamento padrão na placa equatorial dos 24 bivalentes sendo observado que, em algumas células, o cromossomo B estava bem deslocado da placa de alinhamento central (figura 2h-i e 3l), mostrando uma não associação com os outros cromossomos do complemento, semelhante ao que foi observado durante o paquíteno. Nos espermatócitos em anáfase I, que apresentavam o cromossomo B nas células mitóticas, observaram-se dois conjuntos haplóides migrando aleatoriamente para pólos opostos da célula e dois cromossomos com deslocamento tardio (figura 2k), provavelmente dois cromossomos B.

Nas células meióticas foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de prata, e cromossomos Ag-RONs foram detectados no complemento padrão em algumas fases, como: espermatogonial, paquíteno, diplóteno e metáfase I (figura 3a-d), indicando a atividade gênica destas regiões durante a divisão celular, diferindo de outros trabalhos que não observam o mesmo comportamento, como relatado em insetos (Severi-Aguiar et al., 2006) e mamíferos (Hofgärtner et al., 1979; Schmid et al., 1982).

Segundo Leung et al. (2004) e Sirri et al. (2008), o nucléolo se desorganiza no final da prófase, quando a atividade gênica da região organizadora de nucléolo cessa temporariamente, devido a inativação da transcrição do DNA ribossômico (DNAr), que só é reiniciada durante a anáfase mitótica. No entanto, o que se observa neste estudo, é que os cromossomos Ag-RONs apresentam uma pequena atividade durante a meiose I, talvez resultado da atividade mínima de síntese durante as fases da espermatogênese, como também sugerido para diferentes gêneros de morcegos por Beguelini et al. (2011). Apesar da grande quantidade de trabalhos relatando a dinâmica do nucléolo durante a mitose, as informações sobre a atividade nucleolar durante a meiose em vertebrados é escassa (Beguelini et al., 2011).

A hibridação fluorescente *in situ* detectou sinais de DNAr 18S nos cromossomos do complemento padrão, nas fases espermatogonial, paquíteno, diacinese e metáfase I (figura 3e-h), confirmando o resultado obtido pela prata. Não foi encontrado nenhum sinal positivo nos cromossomos B de *C. lepidota* porém, foi observada a mesma configuração meiótica incomum entre os bivalentes e o B (figura 3g), já visualizada na coloração de Giemsa, sendo que um dos bivalentes apresenta sítios de DNAr 18S (figura 3g). As análises mitóticas em *C. lepidota* demonstram que o par portador da região organizadora de nucléolo (RON) é o primeiro par, e que esta região também apresenta heterocromatina associada (figura 1e and 1c, respectivamente). Estes fatos sugerem que a configuração observada durante a diacinese, pode estar ocorrendo devido a alguma afinidade entre as heterocromatinas presentes nos cromossomos envolvidos, visto que o cromossomo B é heterocromático e que este se mantém próximo aos bivalentes durante toda esta fase (figura 2g e 3g).

Após a coloração com fluorocromos, as regiões marcadas pela prata e com a sonda de DNAr 18S, também se mostraram CMA₃ positivas e DAPI negativas nas fases espermatogonial, paquíteno, diplóteno e metáfase I (figura 3i-l), indicando a alta concentração de bases GC neste local e confirmando os dados mitóticos para a espécie (presente estudo e Perazzo et al., 2010). Interessante notar que, em metáfase I, o cromossomo B mostrou-se deslocado dos demais cromossomos alinhados na placa equatorial (figura 3l), semelhante ao observado com a coloração de Giemsa.

Poletto et al. (2010a) verificaram em células meióticas do ciclídeo africano *Astatotilapia latifasciata* (citado como *Haplochromis obliquidens*), que os cromossomos B não apresentavam nenhuma associação com os cromossomos do complemento A, durante toda a prófase I e que eles apresentavam cópias de genes de RNAr 18S, sugerindo que os Bs possam ter surgido de cromossomos que apresentavam os clusters de DNAr 18S. Esta idéia foi também compartilhada por Sobrinho et al. (2006), que relataram cromossomos B com sítios de DNAr 18S em duas populações de *Moenkausia sanctaefilomenae*, pertencentes a bacia do médio rio Tietê/SP.

Os estudos meióticos realizados em *C. lepidota* refletem a variabilidade dos cromossomos B encontrados nas células somáticas, visto que foi possível também observar, em diversas fases da meiose, a ocorrência de 1 a 2 univalentes, bem como células sem os Bs. Esta variabilidade mitótica e meiótica pode ser explicada pelo fato destes cromossomos não seguirem o comportamento mendeliano durante a divisão celular, como observado durante a anáfase I, onde estes migram para o mesmo polo celular (figura 2k), corroborando a teoria de

não segregação mendeliana, como proposto por Jones and Rees (1982) e compartilhado por Camacho et al. (2000).

A observação de cromossomos B tanto em células mitóticas quanto em meióticas em machos e fêmeas, de ambas as populações de *C. lepidota*, sugere que pode estar ocorrendo um mecanismo de acúmulo em ambos os sexos, como já relatado por Camacho et al. (2000) para outros animais e plantas. Portela-Castro et al. (2001) verificaram que cromossomos B de *Moenkausia sanctaefilomenae* formavam bivalentes durante a prófase I, sugerindo que estes podem ter uma segregação normal, com a transmissão igualitária de Bs para cada célula, explicando assim a alta frequência de células somáticas com 1B na espécie (59,4%). Considerando que, durante a meiose, não foi observada a formação de bivalentes ou trivalentes entre os cromossomos B de *C. lepidota*, pode-se sugerir que uma segregação irregular esteja ocorrendo com estes cromossomos, visto que a frequência de células com 1B é consideravelmente baixa (21,32%), quando comparado com a encontrada por Portela-Castro et al. (2001).

No gênero *Crenicichla*, somente duas espécies (*C. reticulata* e *C. lepidota*) apresentam cromossomos B, compartilhando características como a similaridade do tamanho reduzido, o padrão heterocromático e o irregular comportamento mitótico, apesar da grande distância geográfica entre elas, visto que *C. reticulata* é da bacia Amazônica/AM (Feldberg et al., 2004) e *C. lepidota* é do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS (presente estudo).

Analisando o fato que a família Cichlidae é bastante conservada citogeneticamente e que apenas 5% das espécies estudadas de ciclídeos apresentam cromossomos B, pode-se sugerir seu recente aparecimento na família e em *Crenicichla lepidota*, visto que nenhuma outra população estudada desta espécie apresentou este tipo de cromossomo (Thompson, 1979; Feldberg e Bertollo, 1985a, 1985b; Martins-Santos et al., 1995; Fenocchio et al., 2003; Perazzo et al., 2010; Poletto et al., 2010b), inclusive as demais localidades deste estudo (Arroio Capivara e Estação Experimental Agronômica da UFRGS). Tal proposta difere do que ocorre em outros peixes neotropicais, onde a origem do cromossomo B antecede a diversificação das espécies a partir de um ancestral comum, como em espécies dos gêneros *Rhamdia* (Fenocchio et al., 2000; Moraes et al., 2007; 2009) e *Astyanax* (Moreira-Filho et al., 2004).

De todas as populações analisadas, apenas as do Saco da Alemoa e Gasômetro apresentaram cromossomos B, sendo que somente a última localidade apresentou a variação de zero a três. Estas localidades pertencem ao lago Guaíba, que está situado nos mais importantes núcleos industriais do estado do Rio Grande do Sul e recebe resíduos

provenientes de, aproximadamente, 70% da população dos maiores centros urbanos, incluindo a capital (Menegat et al., 1999). Esta condição ambiental pode ter favorecido a ocorrência de Bs que, provavelmente, podem tolerar condições mais adversas. Embora não se conheça exatamente o significado da presença destes cromossomos nas espécies, é possível que estes possam ter um valor adaptativo em *Crenicichla lepidota*, pois os indivíduos que habitam o Gasômetro, considerado uma área mais poluída que o Saco da Alemoa, apresentaram uma maior quantidade de cromossomos B.

Feldberg et al. (2004) sugerem que uma das possíveis hipóteses para o aparecimento do cromossomo B nas três espécies de ciclídeos amazônicos, foram eventos de quebras cromossômicas devido às condições ambientais, causando atraso dos fragmentos cromossômicos durante a divisão celular, decorrente da presença de metais pesados no ambiente. Fato semelhante parece ocorrer em *C. lepidota*, que também habita um local poluído, pois foi possível observar cromossomos B com migração tardia para apenas um pólo celular durante a anáfase I (figura 2k), o que pode acarretar o acúmulo deste cromossomo, uma vez que a poluição local pode favorecer a migração diferencial para somente um polo, além do fato que certas substâncias podem promover quebras cromossômicas e originar estes cromossomos.

No entanto, Camacho et al. (2000) sugerem que a variação da ocorrência de cromossomos B nos indivíduos está relacionada a diversos fatores, como os históricos, seletivos, de transmissão e outros fatores aleatórios, e não somente às condições ambientais.

Os estudos realizados em *Crenicichla lepidota* descrevem mais uma ocorrência de cromossomos B na família Cichlidae, sendo a primeira nesta espécie e as análises do seu comportamento meiótico revelam características próprias e confirmam sua instabilidade e a não associação com os demais cromossomos do complemento normal padrão. A baixa frequência destes cromossomos na família sugerem um recente aparecimento, e condições ambientais adversas poderiam explicar sua ocorrência nas populações analisadas de *C. lepidota*.

Tabela 1 – Frequência de cromossomos B em células somáticas de *Crenicichla lepidota* (M – macho; F fêmea).

| NÚMEROS | LOCALIDADE | SEXO | Nº DE CROMOSSOMOS B | | | | TOTAL Nº DE CÉLULAS |
|---------|----------------|------|---------------------|-------|------|------|------------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| 174 | Gasômetro | M | 7 | 6 | 5 | 1 | 19 |
| 208 | Gasômetro | F | 30 | 2 | 2 | 1 | 35 |
| 248 | Saco da Alemoa | F | 11 | 9 | 0 | 0 | 20 |
| 774 | Saco da Alemoa | M | 27 | 5 | 0 | 0 | 32 |
| 775 | Saco da Alemoa | M | 7 | 3 | 0 | 0 | 10 |
| 776 | Saco da Alemoa | F | 16 | 4 | 0 | 0 | 20 |
| Total | | | 98 | 29 | 7 | 2 | 136 |
| (%) | | | 72,06 | 21,32 | 5,15 | 1,47 | 100 |

Tabela 2 - Cromossomos B na família Cichlidae (2n – número diplóide; B_{micro} – microcromossomo; B_M – metacêntrico grande; B_m – metacêntrico médio; Ref - referências).

| Espécies | Localidade | 2n | Bs | Tipo/ Tamanho | Presença de Heterocromatina | Ref |
|--|---|----|-----|--------------------|--------------------------------|-----|
| <i>Astatotilapia latifasciata</i> | Fonte comercial, Botucatu/SP | 44 | 0-2 | B _M | totalmente | 3 |
| <i>Cichla</i> sp. | Lago Balbina, Rio Uatumã/AM | 48 | 1-3 | B _{micro} | totalmente | 1 |
| <i>Crenicichla reticulata</i> | Lago Balbina, Rio Uatumã/AM | 48 | 1-3 | B _{micro} | totalmente | 1 |
| | Lago Catalão, Rio Solimões e Rio Negro/AM | 48 | 1-3 | B _{micro} | totalmente | 1 |
| <i>Crenicichla lepidota</i> | Saco da Alemoa, Laguna dos Patos/RS | 48 | 0-1 | B _{micro} | totalmente | 7 |
| | Gasômetro, Laguna dos Patos/RS | 48 | 0-3 | B _{micro} | totalmente | 7 |
| <i>Gymnogeophagus balzanii</i> | Rio Miranda/MS | 48 | 0-4 | B _{micro} | - | 2 |
| <i>Haplochromis plagiodon</i> | Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 1-3 | - | - | 6 |
| <i>Haplochromis pyrrhocephalus</i> | Mwambulugu, Lago Victoria | 44 | 0-3 | B _m | - | 6 |
| <i>Haplochromis tanaos</i> | Baía Nyegezi | 44 | 0-1 | - | - | 6 |
| <i>Haplochromis</i> sp. “purple yellow” | Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 0-1 | - | - | 6 |
| <i>Haplochromis</i> sp. “Matumbi hunter” | Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 1 | - | - | 6 |
| <i>Haplochromis fisheri</i> | Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 2 | - | - | 6 |
| <i>Laetacara</i> cf. <i>dorsigera</i> | Lagoas Guaraná, Garça e Pontal, Rio Paraná/PR | 48 | 0-2 | B _{micro} | - | 5 |
| <i>Lithochromis rubripinnis</i> | Ilha Matumbi, Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 0-3 | - | - | 6 |
| <i>Lithochromis rufus</i> | Ilha Kilimo, Ilha Matumbi | 44 | 1-2 | - | - | 6 |
| <i>Metriaclima lombardoi</i> | Fonte comercial, UMD/USA; Botucatu/SP | 44 | 1 | B _M | - | 4 |
| <i>Neochromis greenwoodi</i> | Baía Nyegezi, Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 0-2 | - | - | 6 |
| <i>Neochromis rufocaudalis</i> | Baía Nyegezi, Ilha Hipopótamo | 44 | 1-2 | - | - | 6 |
| <i>Pundamilia pundamilia</i> | Nyaruwambu, Lago Victoria | 44 | 1-3 | - | - | 6 |

Referências: 1 - Feldberg et al. (2004); 2 - Feldberg and Bertollo (1984); 3 - Poletto et al. (2010a); 4 - Poletto et al. (2010b); 5 - Martins-Santos et al. (2005); 6 - Yoshida et al. (2011); 7 - presente estudo.

Figura 1 – Cariótipo (a), exemplar (b), metáfase parcial mitótica após bandamento C (c) e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA₃/DAPI em *Crenicichla lepidota* (d, e, f; respectivamente). A seta indica o cromossomo B e o asterisco indica o par 1 com heterocromatina associada a RON. Em a, observar a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico

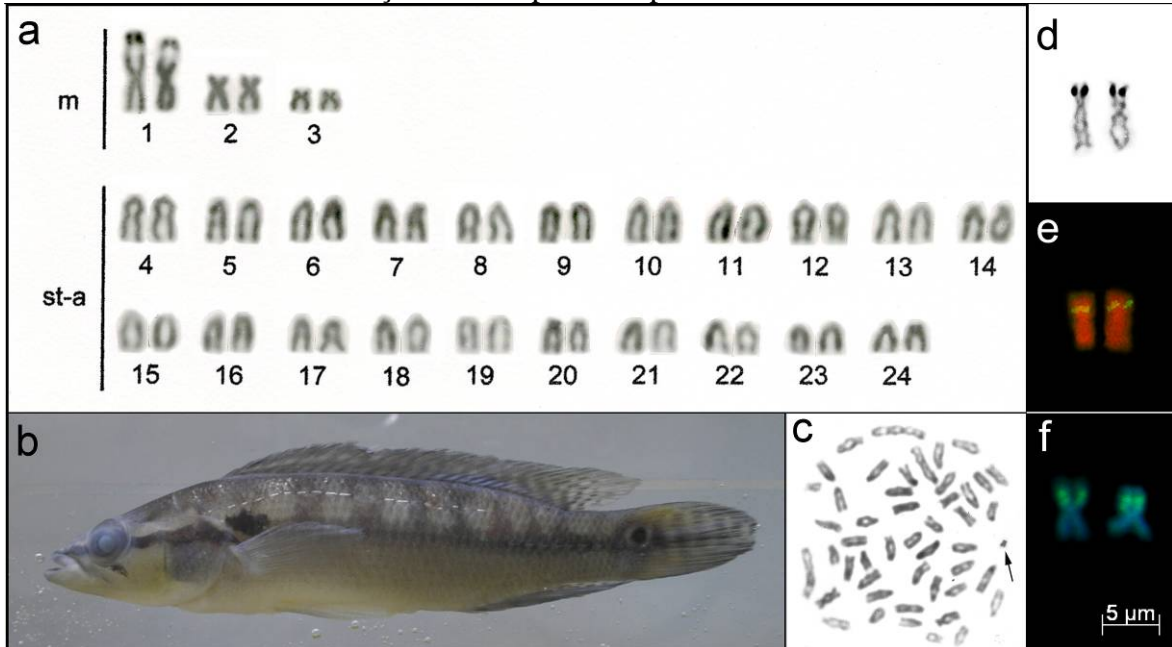


Figura 2 – Células meióticas de *Crenicichla lepidota* corada com Giemsa. **a** Espermatogônias com 49 cromossomos. **b-c** Leptóteno e Zigóteno, respectivamente, mostrando regiões heteropícnóticas (cabeças de seta). **d-e** Paquítenos, com o cromossomo B (seta) isolado dos demais bivalentes e esquema interpretando essa fase e indicando o B (**e'**). **f** Diplóteno, com 24 bivalentes e dois cromossomos Bs (setas). **g** Diacinese, mostrando uma configuração diferenciada (asterisco) entre os bivalentes e o B (seta). **h-i** Metáfases I, com o cromossomo B (seta) isolado da placa central de orientação. **j-k** Anáfases I, com a ausência e a presença de cromossomos B (setas), respectivamente.

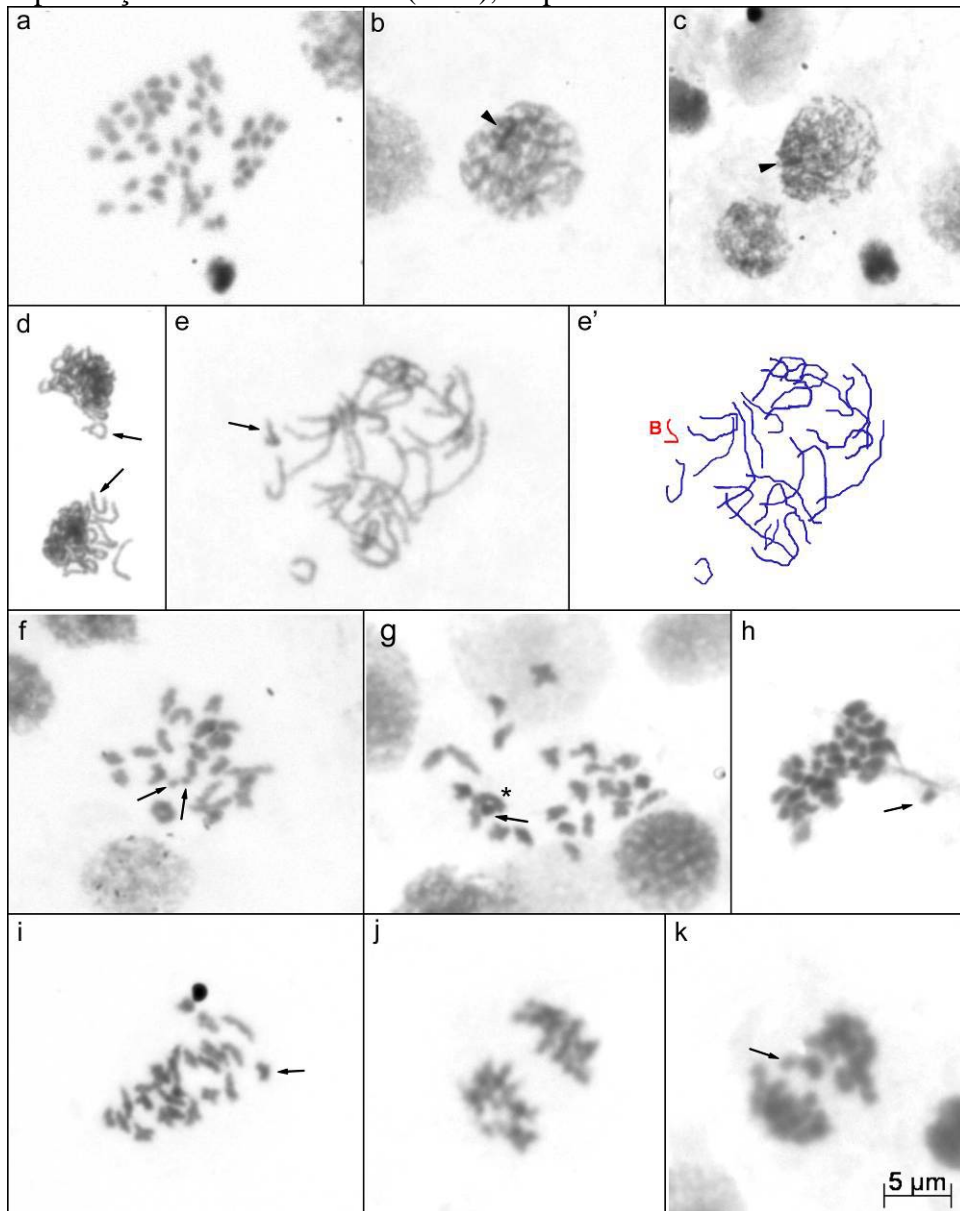
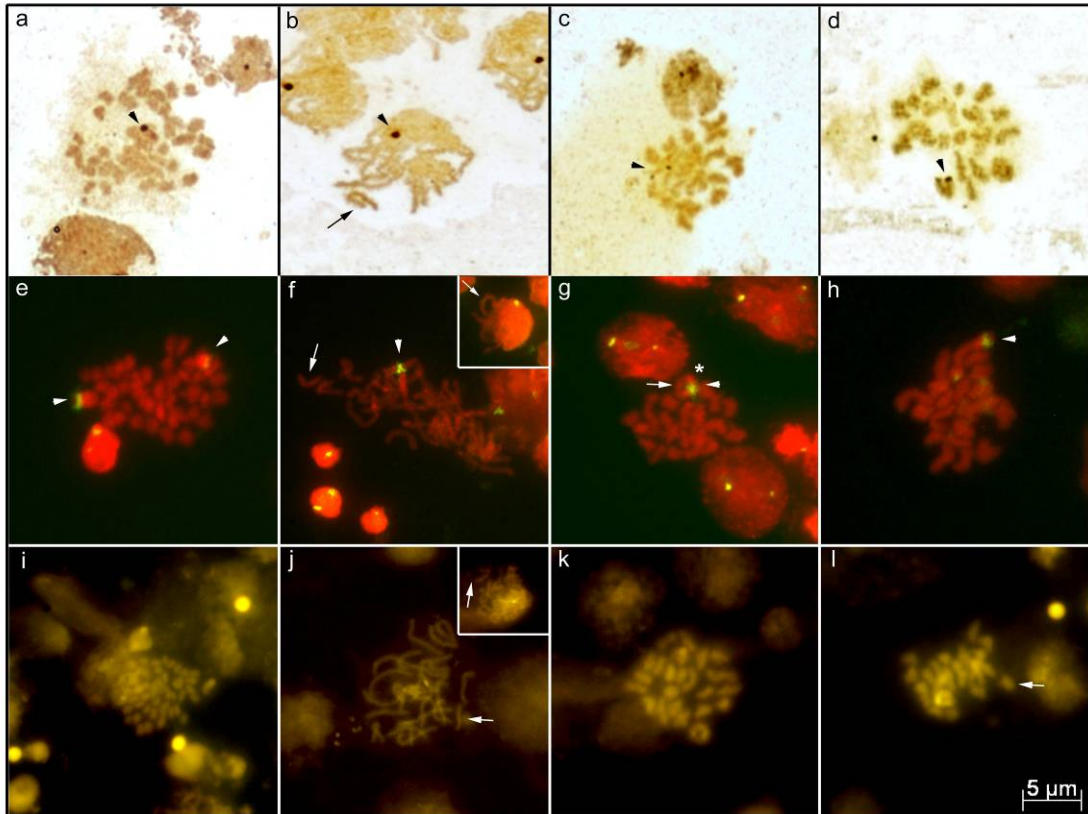


Figura 3 – Células meióticas de *Crenicichla lepidota* com impregnação pelo nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA₃/DAPI, respectivamente. **a, e, i** Espermatogônias. **b, f, j** Paquítenos, com o cromossomo B (seta) isolado dos demais bivalentes e paquíteno iniciais destacados no box. **c, k** Diplótenos. **g** Diacinese, mostrando uma configuração diferenciada (asterisco) entre os bivalentes e o B (seta). **d, h, l** Metáfases I, com o cromossomo B (seta) isolado da placa central de orientação. As cabeças de seta indicam as regiões organizadoras de nucléolo.



Referências

- Beguelini MR, Marchesin SRC, Azeredo-Oliveira MTV, Morielle-Versute E: Nucleolar behavior during meiosis in four species of phyllostomid bats (Chiroptera, Mammalia). *Genet. Mol. Res.* 10 (2): 552-565 (2011).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias Lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120 (1978).
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW: B-Chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 163-178 (2000).
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL: B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 72(8): 1907-1932 (2008).

- Feldberg E, Bertollo LAC: Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus Balzani* (Pisces: Cichlidae). *Rev. Brasil. Genet.* 4: 639-645 (1984).
- Feldberg E, Bertollo LAC: Karyotypes of 10 species of neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38 (3-4): 257-268 (1985a).
- Feldberg E, Bertollo LAC: Nucleolar organizing regions in some species of neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38 (3-4): 319-324 (1985b).
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC: Chromosomal changes and adaptation of cichlids fishes during evolution, pp. 285-308. in *Fish Adaptation*, edited by A.L. Val & B.G. Kapoor, Science Publishers, Inc, Enfield – Nh, Usa (2003).
- Feldberg E, Porto JIR, Alves-Brinn MN, Mendonça MNC, Benzaquem DC: B chromosomes in amazonian cichlid species. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 195-198 (2004).
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JPM: B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica (Kraków)* 48(3-4): 105-109 (2000).
- Fenocchio AS, Pastori MC, Roncati HA, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: A cytogenetic survey of the fish fauna from argentina. *Caryologia* 56(2): 197-204 (2003).
- Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C: Intriguing evidence of translocations in discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*: 1-7 (2009).
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E: Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic And Genome Research* 5: 1-11 (2010a).
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C, Feldberg E: Variability of 18s rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* 76: 1117-1127 (2010b).
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244 (2004).
- Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W, Zenzes MT, Engel W: Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71: 197-216 (1979).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015 (1980).
- Jones RN, Rees H: B chromosomes. London, Uk: Academic Press (1982).
- Kligerman AD, Bloom SE: Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the fisheries research board of canada* 34: 266-269 (1977).

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220 (1964).
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, Lyon C: Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J. Cell Biol.* 166: 787-800 (2004).
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Júlio Jr. HF: Chromosomes analysis of 5 species of the cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Parana river. *Cytologia* 60: 223-231 (1995).
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Júlio Jr. HF: Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara* cf. *dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the Paraná river PR Brazil. *Caryologia* 58 (2): 95-101 (2005).
- Menegat R, Porto ML, Carraro CC, Fernandes LAD: Atlas ambiental de porto alegre. Editora da universidade (2 Ed.). Porto Alegre: 297p (1999).
- Mizoguchi SMHK, Portella-Castro ALB, Martins-Santos IC: Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguaçu river. *Genetics and Molecular Research*, 6: 650-656 (2007).
- Moraes VPO, Cereali SS, Froehlich O, Dias AL: Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 6(3): 627-633 (2007).
- Moraes VPO, Carneiro JS, Dias AL: B chromosomes in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): a comparative study of frequency and distribution. *Folia Biologica (Kraków)* 57(3-4): 165-169 (2009).
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC: B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 230-234 (2004).
- Pauls E, Bertollo LAC: Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36: 307–314 (1983).
- Perazzo G, Noletto RB, Vicari MR, Machado PC, Gava A, Cestari MM: Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme southern Brazil. *Rev Fish Biol Fisheries*: 1-7 (2010).
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci (Usa)* 83: 2934–2938 (1986).
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C: The B chromosomes of the african cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S RNA gene copies. *BMC Genetics* 11: 1-8 (2010a).
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD, Martins C: Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics* 11(50): 1-12 (2010b).

- Portela-Castro ALB, Júlio Jr. HF, Nishijama PB: 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 (2001).
- Rezende AB, Queiroz CC, Caldart FA, Ribeiro L, Miyazawa CS: Notas preliminares do estudo cariotípico de distintos grupos de peixes da bacia do rio Paraguai, no estado do Mato Grosso, p. 105. in *Anais of VI Simpósio de citogenética evolutiva aplicada em peixes neotropicais*, SBG (1996).
- Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W: Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86: 149-179 (1982).
- Schweizer D: Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatinic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27: 190–193 (1980).
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129: 13-31 (2008).
- Severi-Aguiar GD, Lourenco LB, Bicudo HE, Azeredo-Oliveira MT: Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141-151 (2006).
- Sobrinho PE, Corazza-Brassetto LCQ, Oliveira C, Foresti F: Detecção de sítios ribossômicos 18S DNAr em cromossomos supranumerários de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae), p. 139. in *Anais of XI Brazilian symposium on fish cytogenetics and genetics*, SBG (2006).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306 (1972).
- Thompson KW: Cytotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. *Copeia* 4: 679-691 (1979).
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N: B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genet* 7(8): e1002203 (2011).

CAPÍTULO 2

Diversidade cariotípica entre espécies de *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae) de diferentes bacias hidrográficas do centro-oeste e sudeste brasileiro *

* Este artigo será enviado para Review Fish Biology Fisheries.

Diversidade cariotípica entre espécies de *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae) de diferentes bacias hidrográficas do centro-oeste e sudeste brasileiro

Larissa B. Pires; Ana Lucia Dias

Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil

Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, telefone e fax: +55 043 33714417

RESUMO

Crenicichla é o maior gênero da família Cichlidae na América do Sul, com 85 espécies válidas, que são popularmente conhecidas no Brasil como “jacundás” ou “joaninhas” e estão amplamente distribuídas nos rios a leste da Cordilheira dos Andes. Análises citogenéticas foram realizadas em sete espécies pertencentes ao gênero *Crenicichla*: *C. britskii*, *C. haroldoi*, *C. lepidota*, *C. maculata*, *C. niederleinii*, *C. punctata* e *C. semifasciata*, coletadas em diferentes pontos das bacias do rio Paranapanema (PR/SP), do rio Paraguai/MS e do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS. Todas as espécies apresentaram um número diplóide igual a 48, com diferenças interespecíficas quanto às fórmulas cariotípicas. *Crenicichla britskii*, *C. niederleinii* e *C. punctata* apresentaram $4m+6sm+38st-a$ e $NF=58$; *C. haroldoi* apresentou $6m+4sm+38st-a$ e $NF=58$; $6m+42st-a$ e $NF=54$ para *Crenicichla maculata* e *Crenicichla lepidota* e $4m+44st-a$ e $NF=52$ para *C. semifasciata*. Todas as espécies apresentaram RONS simples, com exceção da população de *C. britskii* do rio Paranapanema que mostrou uma variação de 2 a 4 cromossomos nucleolares. As RONS foram coincidentes com constrições secundárias, exceto em *C. britskii* do rio Paranapanema que apresentou apenas um dos pares nucleolares (par 5) correspondente à constrição secundária. Todos os demais cromossomos com cístrons ribossômicos foram CMA_3 positivos e DAPI negativos. A heterocromatina mostrou-se distribuída principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos e coincidentes com as RONS. *C. maculata*, *C. niederleinii* e *C. britskii* (população do Paranapanema) mostraram heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos da RON. Este trabalho mostra pela primeira vez dados citogenéticos de *Crenicichla haroldoi*, *C. maculata* e *C. punctata*, e os resultados obtidos mostram padrões cariotípicos semelhantes aos da literatura, entretanto, a diversidade cariotípica encontrada nas populações de *C. britskii* trazem novas informações sobre a evolução cariotípica da família Cichlidae que, até então, se mostrou conservativa. Além disso, os dados obtidos podem auxiliar os estudos filogenéticos no gênero *Crenicichla*.

Palavras-Chaves: AgRONS. Fluorocromos. Rio Paranapanema. Rio Paraguai. Laguna dos Patos.

Introdução

A família Cichlidae apresenta uma grande variedade de espécies de peixes e é uma das maiores dentre os Perciformes, com aproximadamente 1640 espécies válidas (Eschmeyer e Fong 2013), sendo considerada um grupo altamente especializado (Kullander 1998). Através de análises cladísticas morfológicas, Kullander (1998) e Landim (2006)

verificaram que esta família é um grupo monofilético e os resultados demonstraram uma dicotomia entre ciclídeos do “Velho Mundo” e do “Novo Mundo”.

Os ciclídeos neotropicais, com mais de 406 espécies válidas (Kullander 2003), teve seu monofiletismo primeiramente reconhecido por Stiassny (1991) e, posteriormente, foi corroborado por relações filogenéticas baseadas em dados moleculares (Farias et al. 1999; López-Fernández et al. 2010) ou combinação de dados morfológicos e moleculares (Farias et al. 2000; López-Fernández et al. 2005; Landim 2006; Smith et al. 2008).

Dentre os ciclídeos neotropicais, o gênero *Crenicichla* é um dos mais numerosos com mais de 90 espécies conhecidas, das quais 85 já foram descritas como espécies válidas (Kullander et al. 2009; Piálek et al. 2010). As “pike cichlids” são facilmente reconhecidas devido a forma do corpo alongada, boca grande e prognata, ocorrendo em sua grande maioria na região tropical e subtropical da América do Sul, desde as drenagens costeiras da Venezuela e Guianas, até o rio da Prata na Argentina (Kullander e Lucena 2006).

Este gênero é bastante estudado do ponto de vista citogenético, com o primeiro estudo realizado por Oyhenart-Perera et al. (1975) em *Crenicichla sexatilis*. Desde então, vários estudos vem sendo realizados, estando em sua maioria resumidos à identificação do número diplóide, totalizando dezenove espécies analisadas, até o momento. Destas, apenas *Crenicichla* sp. não apresentou o número diplóide igual a 48 cromossomos, segundo um levantamento citogenético realizado por Feldberg et al. (2003). Entretanto, a posição filogenética de *Crenicichla* dentro da família é bastante controversa, ora pertencendo ao clado Cichlinae (Stiassny 1991; Kullander 1998) e ora ao clado Geophaginae (Farias et al. 2000; López-Fernández et al. 2005; Landim 2006; Smith et al. 2008).

Deste modo, este trabalho vem acrescentar informações cariotípicas para sete espécies de “pike cichlids”: *Crenicichla britskii*, *C. lepidota*, *C. niederleini*, *C. semifasciata*, *C. punctata*, *C. haroldoi* e *C. maculata*, por meio de diferentes técnicas de bandamento cromossômico, sendo inéditas as informações para as três últimas espécies. Os dados obtidos poderão ser utilizados como uma ferramenta adicional para estudos filogenéticos, auxiliando na melhor definição das relações filogenéticas dentro do gênero.

Material e Métodos

As espécies estudadas foram coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema(PR/SP), Paraguai/MS, Laguna dos Patos/RS e Tramandaí/RS, sendo

analisados treze exemplares (7 machos e 6 fêmeas) de *Crenicichla britskii* do ribeirão Taquari/PR (23°10'45.2''S 50°56'30.9''W) e do rio Paranapanema/SP (22°42'30.3''S 51°04'08.4''W); 4 espécimes (2 machos e 2 fêmeas) de *C. haroldoi* coletados no ribeirão Pavão/PR e sete espécimes (2 machos e 5 fêmeas) de *C. niederleinii* coletados no ribeirão Três Bocas/PR (23°23'06.6''S 51°04'35.8''W), sendo que estas localidades pertencem à bacia do rio Paranapanema. Das espécies coletadas no rio Miranda (19°34'38.01''S 57°01'06.63''W), foram analisados três indivíduos (1 macho e 2 fêmeas) de *C. lepidota* e uma fêmea de *C. semifasciata*, pertencentes a bacia do rio Paraguai/MS.

Das espécies da bacia do Tramandaí/RS, foram analisados seis indivíduos (2 machos e 4 fêmeas) de *C. maculata* coletados no rio Maquiné (29°39'10.4''S 50°12'31.8''W) e nove indivíduos (3 machos, 3 fêmeas e 3 de sexo indeterminado) de *C. lepidota* coletados na Barra do João Pedro (29°46'21.2''S 50°05'08.0''W); e sete indivíduos (2 machos e 5 fêmeas) de *C. punctata*, coletados no Saco da Alemoa e rio Forqueta (29°22'08.0''S 52°03'30.0''W), pertencentes ao sistema Laguna dos Patos/RS. Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil e, por conveniência, as diferentes populações de *C. britskii* foram chamadas de A (Taquari) e B (Paranapanema), como demonstrado na tabela 1. Os exemplares foram coletados com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: número da licença - 1947869).

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica de preparação direta, proposta por Bertollo et al. (1978). A morfologia dos cromossomos foi embasada na razão dos braços proposta por Levan et al. (1964), classificando-os em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), considerados com 2 braços cromossômicos, e subtelo-acrocêntricos (st-a) com 1 braço para a determinação do número fundamental (NF).

A detecção da região organizadora de nucléolos (RONs) pela impregnação por nitrato de prata e a determinação do padrão de heterocromatina foram realizados de acordo com as técnicas descritas por Howell e Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. Para a determinação dos sítios ricos em bases GC e AT foram utilizadas as técnicas de coloração com cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), de acordo com as técnicas descritas por Schweizer (1980), com modificações. A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada seguindo protocolo de Pinkel et al. (1986), com modificações, utilizando sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr 2004). As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de epifluorescência

(Leica DM2000) e as metáfases foram capturadas pelo software Leica Application Suite, versão 3.1.0. (Leica Microsystems).

Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram o número diplóide ($2n$) igual a 48 cromossomos, no entanto, foram observadas quatro diferentes fórmulas cariotípicas entre as espécies, sendo $6m+4sm+38st-a$ e $NF=58$ para *C. haroldoi* (Fig. 1a), $4m+6sm+38st-a$ e $NF=58$ para *C. britskii*, *C. niederleinii* e *C. punctata* (Fig. 1b-d e 2c), $6m+42st-a$ e $NF=54$ para *C. lepidota* e *C. maculata* (Fig. 2a-b) e $4m+44st-a$ e $NF=52$ para *C. semifasciata* (Fig. 2d). Nenhuma diferenciação cariotípica foi observada entre machos e fêmeas nas populações estudadas.

Os espécimes de *Crenicichla britskii*, das populações A e B apresentaram uma constrição secundária, localizada na região terminal do braço longo do 5° par cromossômico do complemento, do tipo sm; sendo observado na população B um heteromorfismo de tamanho da constrição entre os homólogos desse par (Fig. 1b-c). Além disso, *C. britskii* apresentou uma constrição secundária adicional no braço longo do par 20 (st-a) para a população A e no braço curto do par 1 (m) para a população B (Fig. 1b-c e Tabela 1). Em todas as outras espécies, exceto *C. semifasciata*, as constrições secundárias localizaram-se intersticialmente no braço curto do primeiro par cromossômico do grupo m, sendo observado um heteromorfismo de tamanho em *C. maculata* e *C. niederleinii* (Fig. 1 e 2a-c).

As regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) foram localizadas em um par de cromossomos para todas as espécies, exceto a população B de *C. britskii* que apresentou até dois pares cromossômicos marcados. A população A de *C. britskii* apresentou marcações terminais no braço longo do 5° par do complemento (sm) (Fig. 1b) e as demais espécies marcações intersticiais no braço curto do maior par metacêntrico (Fig. 1 e 2), sendo que as AgRONS foram coincidentes com as constrições secundárias observadas pela coloração com Giemsa.

Em *C. britskii* da população B, foi possível observar uma variação de 2 a 4 cromossomos AgRONS, estando as marcações localizadas nas regiões terminais do braço longo de um par submetacêntrico (par 5) e do braço curto de um par subtelo-acrocêntrico (par 6), sendo o primeiro coincidente com a constrição secundária observada na coloração com Giemsa e apresentando o mesmo heteromorfismo quanto ao seu tamanho (Fig. 1b e Tabela 1).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sonda de DNAr 18S, revelou para todas as espécies de *Crenicichla*, exceto *C. britskii*, a presença de dois cístrons ribossômicos na região intersticial do braço curto do primeiro par cromossômico (Fig. 1 e 2). A população A de *C. britskii*, também apresentou dois cístrons ribossômicos, entretanto em região terminal no braço longo do quinto par. E a população B desta mesma espécie mostrou quatro cromossomos marcados, os pares 5 e 6, em região terminal (Fig. 1b-c).

O bandamento C revelou marcações heterocromáticas distribuídas na região pericentromérica da grande maioria dos cromossomos e associadas às RONS em todas as espécies (Fig. 3), exceto os espécimes da população B de *C. britskii*, cuja RON localizada no par 6 se mostrou banda C negativa (Fig. 3c). Em *C. britskii*, as constrictões adicionais observadas no par 20 (população A) e no par 1 (população B) não relacionadas às regiões organizadoras de nucléolos, mostraram-se heterocromáticas (Fig. 3b-c).

O tratamento com o fluorocromo cromomicina A₃ evidenciou marcações fluorescentes coincidentes com a RON em todas as espécies analisadas (Fig. 1 e 2), exceto o par 6 de *C. britskii* da população B, e nesta mesma população foi observado um par CMA₃ positivo adicional (par 1) (Fig. 1c). O par 5 dos exemplares desta mesma localidade, *C. niederleinii* e os de *C. maculata* apresentaram o mesmo heteromorfismo de tamanho que já tinha sido evidenciado pelo Giemsa e hibridação fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S (Fig. 1c e 2a e Tabela 1). Na coloração com DAPI estas regiões não apresentaram marcações fluorescentes, aparecendo somente como bandas negativas (Fig. 1 e 2).

Discussão

Estes são os primeiros dados citogenéticos para *Crenicichla haroldoi*, *C. maculata* e *C. punctata* e, assim como *C. lepidota*, *C. niederleinii*, *C. semifasciata* e *C. britskii*, todas apresentaram um conservado número diplóide (2n) de 48 cromossomos, corroborando com os dados da literatura, em que todas as espécies de *Crenicichla* possuem, até o momento, este padrão, exceto *Crenicichla* sp., estudada por Rezende et al. (1996), que apresentou 2n=46. O número fundamental (NF) observado também está entre as faixas encontradas na literatura, que é de 52 à 64.

Entretanto, apesar da conservação do número diplóide, variações nas fórmulas cariotípicas foram encontradas em *C. semifasciata*, *C. niederleinii* e *C. britskii* em relação às outras populações anteriormente estudadas destas espécies (Feldberg e Bertollo 1985a, 1985b; Martins et al. 1995; Benzaquem et al. 2008; Poletto et al. 2010). Tais

diferenças podem ser atribuídas a eventos de inversões pericêntricas que estão desempenhando um papel importante na diversidade cariotípica destas espécies, como já sugerido por Feldberg e Bertollo (1985a).

Segundo Thompson (1979), os ciclídeos apresentam 48 cromossomos do tipo subtelo-acrocêntricos em espécies basais, onde a presença de cromossomos meta-submetacêntricos significaria um cariótipo derivado e, quanto maior a presença de cromossomos acrocêntricos, mais ancestral será o cariótipo. Esta hipótese é também compartilhada por Feldberg et al. (2003) que considera o gênero *Crenicichla* mais derivado, devido a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Levando em consideração essas informações, o gênero *Crenicichla* está mais próximo dos Geophagíneos, visto que o clado Cichlinae seria mais ancestral quando comparado ao clado Geophaginae, pois apresenta, em sua maioria, espécies com cariótipo de apenas cromossomos subtelo-acrocêntricos, como as encontradas no gênero *Cichla*.

Outra característica compartilhada entre as espécies aqui analisadas, exceto a população A de *C. britskii*, foi a presença de uma constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par cromossômico do grupo m (Fig. 1 e 2), o qual parece ser um cromossomo característico deste gênero, sendo talvez um marcador citotaxonômico, pois é observado também em *C. lacustris*, *C. semifasciata* e *C. vittata* (Feldberg e Bertollo 1985a; 1985b), *C. lepidota* (Martins et al. 1995; Perazzo et al. 2010; Poletto et al. 2010), *Crenicichla* sp. e *C. niederleinii* (Loureiro et al. 2000), *C. iguassuensis* (Mizoguchi et al. 2007) e *C. reticulata* (Benzaquem et al. 2008). Este cromossomo particular do gênero é outra característica que aproxima este grupo do clado Geophaginae, já que outros gêneros deste clado, como *Geophagus* e *Gymnogeophagus*, apresentam também esse tipo cromossômico, como em *Gymnogeophagus balzanii* (Feldberg e Bertollo 1984; Roncati et al. 2007), *G. labiatus* (Pires et al. 2010); *Geophagus surinamensis* (Feldberg e Bertollo 1985a) e *G. proximus* (Valente et al. 2012).

Interessante notar, que a população A de *C. britskii* não mostrou esta constrição em região intersticial, e sim na região terminal do braço longo de um par cromossômico submetacêntrico. Outro fato que chama a atenção, é que ambas populações de *C. britskii*, apresentaram uma constrição secundária adicional no braço longo do par 20 (população A) e par 5 (população B). A ocorrência destas constrições secundárias adicionais nunca tinha sido relatada na literatura podendo indicar, a princípio, uma característica diferencial para esta espécie.

Na análise das regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS), foi verificado o primeiro par cromossômico como portador de uma marcação intersticial no braço curto em todas as espécies, exceto *Crenicichla britskii*, coincidente com a constrição secundária presente na coloração com Giemsa. A presença de RONS simples intersticiais neste par cromossômico é bastante conservado neste gênero, como relatado por Loureiro et al. (2000), Roncati et al. (2007), Benzaquem et al. (2008), Valente et al. (2012), entre outros; sendo encontrada apenas variação quanto à identificação do cromossomo portador, podendo ser em cromossomos metacêntricos (Martins et al. 1995; Loureiro et al. 2000; Mizoguchi et al. 2007) ou submetacêntricos (Martins et al. 1995).

As populações de *Crenicichla britskii* se mostraram mais variáveis em relação às estas regiões. A população A também apresentou um par cromossômico portador da AgNOR como as outras espécies, porém, com marcações no braço longo do 5º par cromossômico sm. Na população B de *C. britskii* foram observados 2 pares nucleolares: o par 5 e 6, sendo o primeiro correspondente à constrição secundária; já a constrição encontrada no par 1 não foi coincidente com sítios nucleolares. A ocorrência de RONS múltiplas pode indicar que esta população apresenta características mais derivadas em relação à da outra localidade estudada, pois este padrão foi relatado anteriormente no gênero, somente em *Crenicichla lepidota*, da região de Porto Rico proveniente da bacia do rio Paraná/PR, analisada por Martins et al. (1995), sendo observados também 2 pares nucleolares, situação distinta da encontrada nesta mesma espécie no presente trabalho.

De modo geral, o padrão observado em *Crenicichla* (*C. britskii*, *C. maculata*, *C. lepidota*, *C. haroldoi*, *C. niederleinii*, *C. semifasciata* e *C. punctata*), com exceção de uma população de *C. britskii*, que apresentou 4 marcações, todas espécies analisadas no presente estudo, apresentaram apenas um par cromossômico com cístrons ribossômicos 18S, corroborando assim os dados obtidos com a impregnação por nitrato de prata e a condição ancestral proposta por Feldberg et al. (2003). Os sinais de hibridação foram localizados intersticialmente no braço curto do maior par cromossômico do complemento, semelhante ao já relatado para *Crenicichla lepidota* por Perazzo et al. (2010) e Poletto et al. (2010). É importante destacar que *C. lepidota* era a única espécie do gênero, até o momento, com resultados de hibridação *in situ*.

Heteromorfismo de tamanho nas regiões organizadoras de nucléolos, como encontrado no par 5 em *C. britskii* (população B), *C. niederleinii* e *C. maculata*, pode ser resultado de crossing-over desigual ou amplificação diferencial desta região entre os

cromossomos homólogos, como já tem sido proposto para outros peixes e, inclusive, na família Cichlidae (Pires et al. 2008; Gross et al. 2010; Poletto et al. 2010, entre outros).

A coloração pelo fluorocromo cromomicina A₃ evidenciou, para as sete espécies, marcações fluorescentes coincidentes com as RONS, indicando a predominância de bases GC. Entretanto, a população B de *Crenicichla britskii*, apresentou novamente um padrão distinto, sendo que apenas um dos pares nucleolares (par 5) foi CMA₃ positivo. Nos exemplares desta mesma localidade foi observada uma marcação fluorescente intersticial no par 1, coincidente com a heterocromatina sendo esta, portanto, composta predominantemente de bases GC, diferente das heterocromatinas pericentroméricas. As RONS mostraram-se DAPI negativas revelando portanto, escassez de bases AT. Os dados com fluorocromos coincidem com os encontrados na literatura para o gênero por Loureiro et al. (2000), Perazzo et al. (2010), Mizoguchi et al. (2007) e Valente et al. (2012).

A heterocromatina em *Crenicichla britskii* mostrou-se distribuída nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos e nas constrições secundárias, característica comum do gênero, entretanto, somente as constrições do par 5 para ambas as populações são correspondentes às RONS, indicando a presença de heterocromatina associada e não associada aos cístrons ribossômicos. Já a distribuição da heterocromatina para as outras seis espécies de *Crenicichla* foi semelhante, sendo observadas marcações pericentroméricas na grande maioria dos cromossomos e associadas às RONS. O mesmo heteromorfismo de tamanho observado nas regiões organizadoras de nucléolos e na coloração com Giemsa em *C. britskii* (população B), *C. niederleinii* e *C. maculata* foi encontrado na banda C.

Este padrão de distribuição de heterocromatina é bem característico do gênero sendo observado em diferentes espécies, como *C. lepidota* (Martins et al. 1995; Roncati et al. 2007; Perazzo et al. 2010), *Crenicichla* sp., *C. niederleinii* (Loureiro et al. 2000; Roncati et al. 2007), *C. reticulata* (Feldberg et al. 2004) e *C. strigata* (Valente et al. 2012). No entanto, Mizoguchi et al. (2007) analisando três espécies de *Crenicichla* do rio Iguaçu/PR, verificaram que as AgRONS são banda C negativa, o que poderia, segundo os autores, caracterizar as espécies de *Crenicichla* do rio Iguaçu/PR.

Analisando os dados encontrados para *C. britskii*, pode-se verificar que, apesar de possuírem o mesmo número diplóide tão conservado no gênero e na família, apresentaram características próprias, que diferiram esta espécie do padrão geral encontrado para o gênero *Crenicichla*, assim como para as espécies aqui estudadas.

As diferenças citogenéticas observadas em *C. britskii* podem ser resultantes de um isolamento geográfico entre as populações do ribeirão Taquari/PR e do rio

Paranapanema/SP. Ploeg (1991), ao estudar esta mesma espécie, verificou que era endêmica da bacia do Alto Paraná e que este endemismo era resultante da pequena capacidade de deslocamento destes peixes; pelo fato de serem altamente territorialistas, de modo geral, não realizam extensas migrações ao longo do seu ciclo de vida, mantendo-se isoladas (Castro 1999).

De acordo com Oliveira et al. (1988), populações que apresentam menor mobilidade e quantidade de indivíduos são mais instáveis em relação à sua macroestrutura cariotípica, visto que o fluxo gênico é menor, proporcionando assim, uma maior taxa de fixação de alguma alteração cromossômica. É o que pode estar ocorrendo com as duas populações de *Crenicichla britskii*, onde o isolamento geográfico facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos, levando a um processo de especiação, sendo que a população de *C. britskii* do rio Paranapanema apresenta características mais derivadas quando comparadas com a do ribeirão Taquari.

Os resultados para as demais espécies de *Crenicichla* mostram que os padrões cariotípicos foram semelhantes aos da literatura, indicando uma tendência conservativa na evolução cromossômica deste grupo de peixes, apresentando características consideradas típicas deste gênero como $2n=48$, a presença do maior par cromossômico com constrição secundária intersticial no braço curto, a distribuição pericentromérica da heterocromatina, entretanto, a diversidade cariotípica encontrada nas populações de *C. britskii* trazem novas informações sobre a evolução cariotípica da família Cichlidae que, até então, se mostrou conservativa.

É importante ressaltar que as características citogenéticas peculiares de *Crenicichla*, como o maior par do complemento com constrição secundária intersticial e a presença de cromossomos meta/submetacêntricos no cariótipo, podem ser uma importante ferramenta para estudos filogenéticos neste grupo de peixes, posicionando o gênero *Crenicichla* no clado Geophaginae, corroborando a filogenia proposta por López-Fernández et al. (2005), Landim (2006) e Smith et al. (2008).

Tabela 1 - Resultados cariotípicos para as espécies de *Crenicichla* analisadas no presente estudo: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, CS = constrição secundária, RONS = regiões organizadoras de nucléolos e CMA₃ = cromomicina A₃.

| Espécies | Localidade | Populações | 2n | Fórmulas Cariotípicas | NF | CS | RONS | CMA ₃ |
|------------------------|---|------------|----|--------------------------|----|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>C. britskii</i> | rib.Taquari (PR) | A | 48 | 4 m + 6 sm + 38 st-a | 58 | Par 5 (t) Par 20 (t) | Simplex: Par 5 (t) | Par 5 (t) |
| | rio Paranapanema (SP) | B | 48 | 4 m + 6 sm + 38 st-a | 58 | Par 1 (i) Par 5 (t)* | Múltipla: Par 5 (t)* Par 6 (t) | Par 1 (i) Par 5 (t)* |
| <i>C. haroldoi</i> | rib. Pavão (PR) | - | 48 | 6 m + 4 sm + 38 st-a | 58 | Par 1 (i) | Simplex: Par 1 (i) | Par 1 (i) |
| <i>C. lepidota</i> | Barra do João Pedro (RS) e rio Miranda (MS) | - | 48 | 6 m + 42 st-a | 54 | Par 1 (i) | Simplex: Par 1 (i) | Par 1 (i) |
| <i>C. punctata</i> | Saco da Alemoa e rio Forqueta (RS) | - | 48 | 4 m + 6 sm + 38 st-a | 58 | Par 1 (i) | Simplex: Par 1 (i) | Par 1 (i) |
| <i>C. maculata</i> | rio Maquiné (RS) | - | 48 | 6 m + 42 st-a | 54 | Par 1 (i)* | Simplex: Par 1 (i)* | Par 1 (i)* |
| <i>C. niederleinii</i> | rib.Três Bocas (PR) | - | 48 | 4m + 6sm + 38st-a | 58 | Par 1 (i)* | Simplex: Par 1(i)* | Par 1 (i)* |
| <i>C. semifasciata</i> | rio Miranda (MS) | - | 48 | 4m+44st-a | 52 | Par 1 (i) | Simplex: Par 1 (i) | Par 1 (i) |

Legenda: rib. = ribeirão; t = terminal; i = intersticial; * = heteromorfismo.

Figura 1 - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA₃/DAPI em *Crenicichla haroldoi* (a), *C. britskii*, das populações A (b) e B (c) e *C. niederleinii* (d), respectivamente. O box evidencia a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico (a, c e d) e no braço longo (b e c).

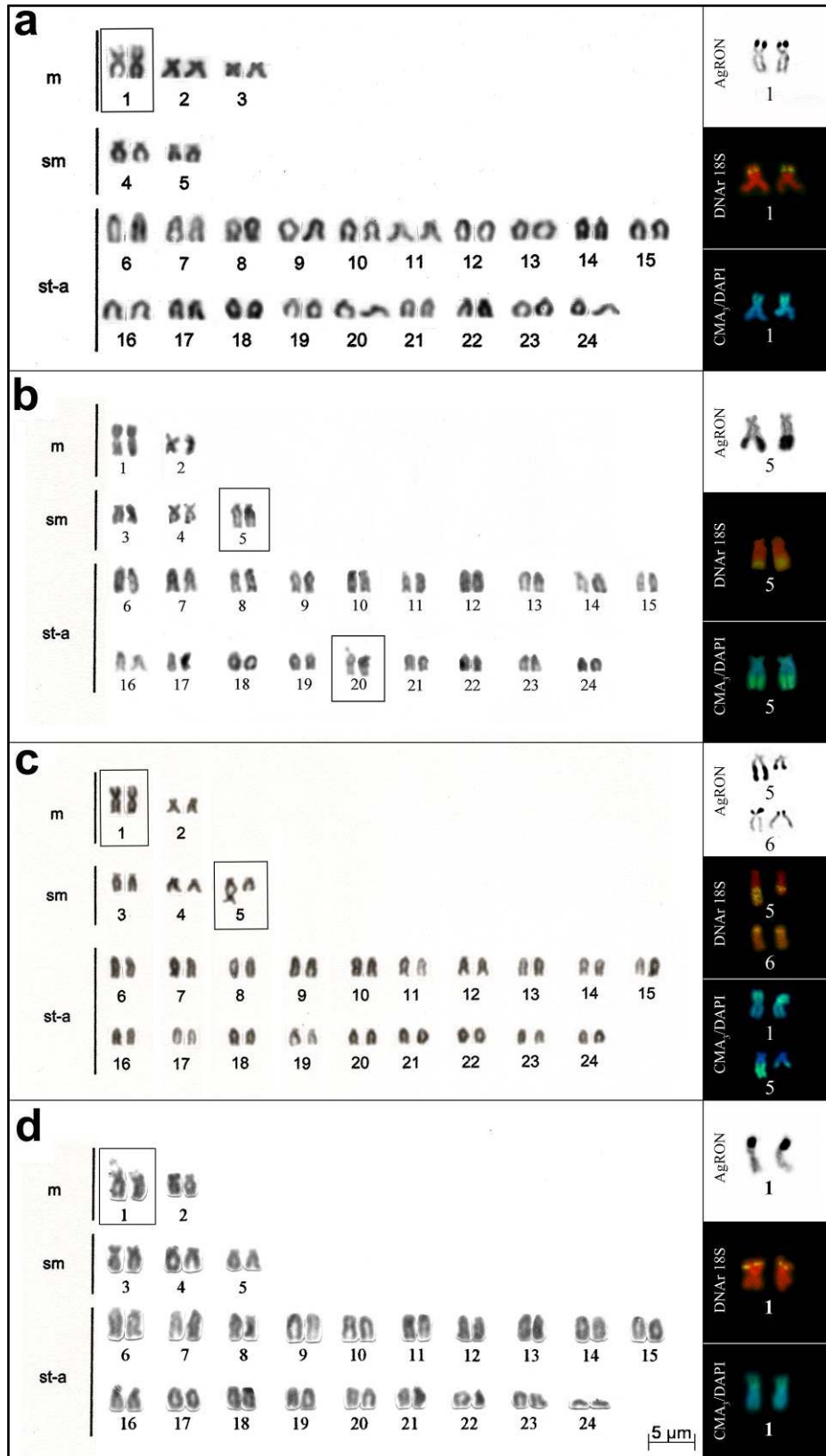


Figura 2 - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA₃/DAPI em *Crenicichla maculata* (a), *C. lepidota* (b), *C. punctata* (c) e *C. semifasciata* (d), respectivamente. O box evidencia a constrição secundária intersticial no braço curto do primeiro par metacêntrico.

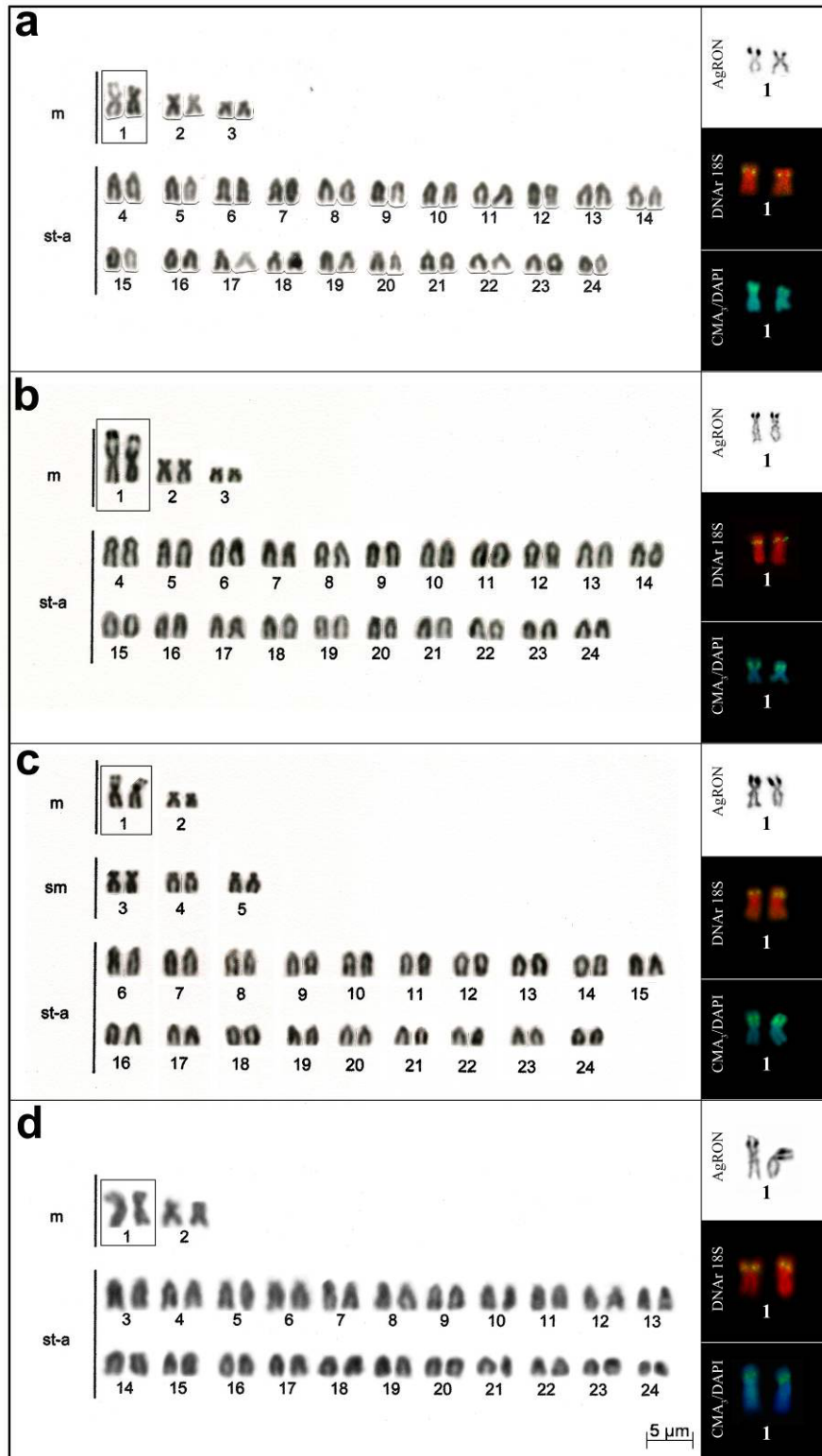
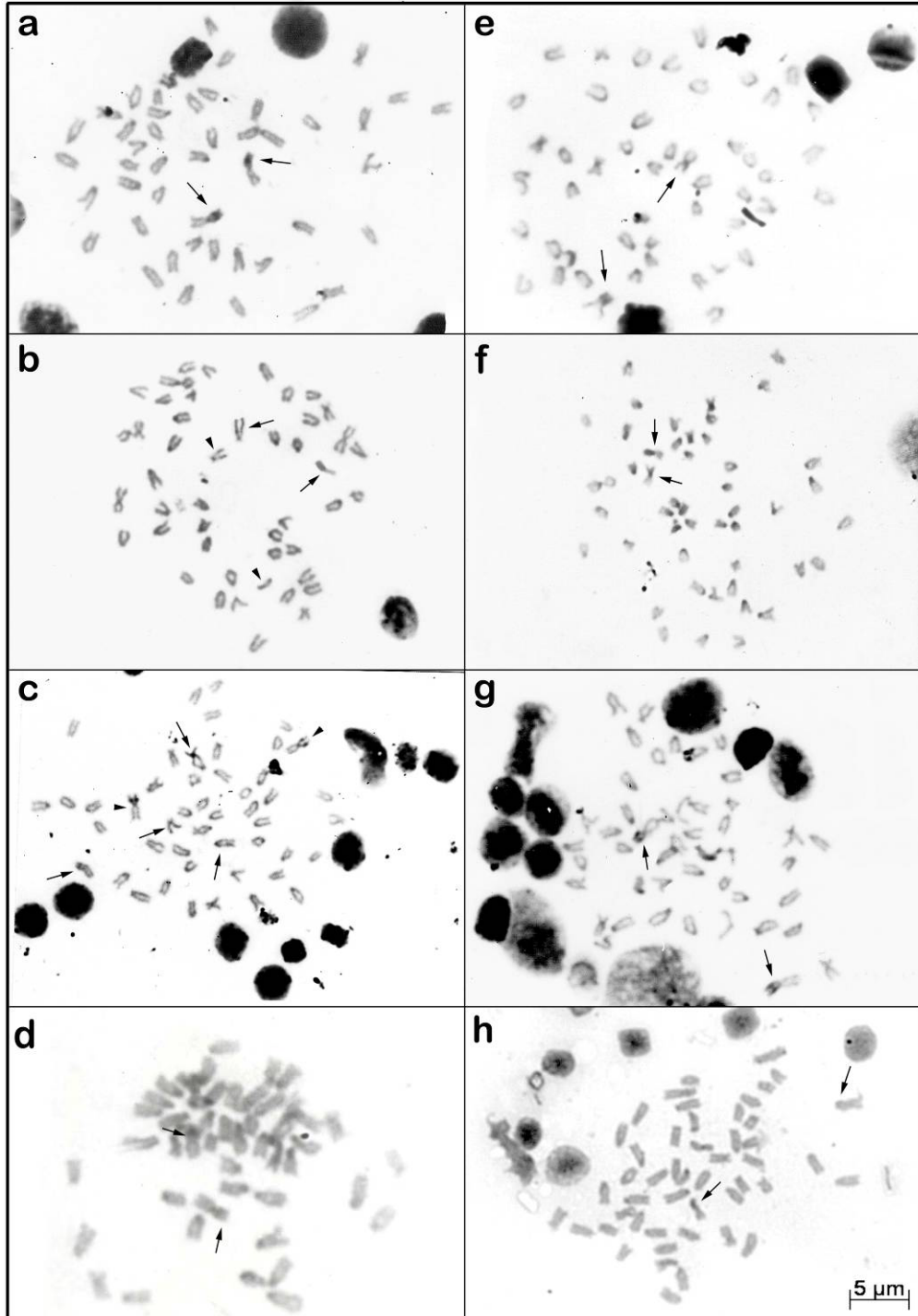


Figura 3 - Metáfases somáticas após o bandamento C de *Crenicichla haroldoi* (a), *C. britskii*, das populações A (b) e B (c); *C. niederleinii* (d), *C. maculata* (e), *C. lepidota* (f), *C. punctata* (g) e *C. semifasciata* (h), respectivamente. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolos e as cabeças de seta as constrições secundárias adicionais em *C. britskii*.



Referências

- Benzaquem DC, Feldberg E, Porto JIR, Gross MC, Zuanon JAS (2008) Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology* 31 (1): 250-255.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120.
- Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sulamericanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *In: Caramaschi EP, Mazzoni R, Peres-Neto PR (eds) Ecologia de peixes de riachos. Série oecologia brasiliensis, Rio de Janeiro, Brasil, pp 139-155.*
- Eschmeyer WN, Fong JD (2013) Species by family/subfamily in the catalog of fishes. Electronic Database accessible at <http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> Acessado 31 de janeiro de 2013.
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A (2000) Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of Experimental Zoology* 288: 76-92.
- Farias IP, Ortí G, Meyer A (1999) Mitochondrial DNA phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical Assemblage. *Journal of Molecular Evolution* 48: 703-711.
- Feldberg E, Bertollo LAC (1984) Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces: Cichlidae). *Rev Bras Genet* 4 (IV): 639-645.
- Feldberg E, Bertollo LAC (1985a) Karyotypes of 10 species of neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38: 257-268.
- Feldberg E, Bertollo LAC (1985b) Nucleolar organizing regions in some species of neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38 (3-4): 319-324.
- Feldberg E, Porto JIR, Alves-Brinn MN, Mendonça MNC, Benzaquem DC (2004) B chromosomes in amazonian cichlid species. *Cytogenetic and genome research* 106:195-198.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC (2003) Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. *In: Val AL, Kapoor BG, Fish adaptations, New Dehli & New York, Science publishers. 418p.*
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C, Feldberg E (2010) Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* 76: 1117-1127.

- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239–244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizing regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kullander SO (1998) A phylogeny and classification of the south american Cichlidae (Teleostei: Perciformes). *In*: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, Phylogeny and classification of neotropical fishes. Edipucrs. 1998.
- Kullander SO (2003) Family Cichlidae *In*: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ (org) Check list of the freshwater fishes of south and central america. Edipucrs, Porto Alegre, pp 605-654
- Kullander SO, Lucena CAS (2006) A review of the species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from the atlantic coastal rivers of southeastern brazil from Bahia to Rio Grande do Sul states, with descriptions of three new species. *Neotropical ichthyology* 4: 127-146.
- Kullander SO, Norén M, Fridriksson GB, Lucena CAS (2009) Phylogenetic relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South America based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48: 248-258.
- Landim MIPF (2006) Relações filogenéticas na família Cichlidae Bonaparte, 1840 (Teleostei: Perciformes) Dissertação, Universidade Estadual de São Paulo.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-204.
- López-Fernández H, Honeycutt RL, Stiassny MLJ, Winemiller KO (2005) Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes: Cichlidae). *Zool. Scripta* 34: 627–651.
- López-Fernández H, Winemiller KO, Honeycutt RL (2010) Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1070-1086.
- Loureiro MA, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2000) Cytogenetic characterization of two species of the genus *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae). *Cytologia* 65: 57-63.
- Martins IC, Portella-Castro ALB, Júlio Jr HF (1995) Chromosomes analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Parana river. *Cytologia* 60: 223-231.
- Mizoguchi SMHK, Portella-Castro ALB, Martins-Santos IC (2007) Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguauçu river. *Genetics and molecular research* 6 (3): 650-656.
- Oliveira CLF, Almeida-Toledo LM, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazilian journal of genetic* 11: 577-624.

- Oyhenart-Perera MF, Luengo JA, Brum-Zorilla N (1975) Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) y *Crenicichla sexatilis* (Linn.) (Teleostei. Cichlidae). Ver Biol del Uruguay 3: 29-36.
- Perazzo G., Noleto RB, Vicari MR, Machado PC, Gava A, Cestari MM (2010) Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme southern Brazil. Rev Fish Biol Fisheries: 1-7.
- Piálek L, Rícan O, Casciotta JR, Almirón AE. (2010) *Crenicichla hu*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from the Paraná basin in Misiones, Argentina. Zootaxa 2537: 33-46.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci (Usa) 83: 2934–2938.
- Pires LB, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. Caryologia 61(2): 135-138.
- Pires LB, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2010) Cytogenetic characterization of *Geophagus brasiliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. Folia Biologica (Kraków) 58: 29-34.
- Poletto A.B., I.A. Ferreira, I.A., D.C. Cabral-de-Mello, R.T. Nakajima, J. Mazzuchelli, H.B. Ribeiro, P.C. Venere, M. Nirchio, T.D. Kocher & C. Martins, 2010. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. BMC Genetics 11(50): 1-12.
- Ploeg A (1991) Revision of the south american cichlid genus *Crenicichla* Heckel, 1840, with descriptions of fifteen new species and considerations on species groups, phylogeny and biogeography (Pisces, Perciformes, Cichlidae). Academic Proefschrift, Universiteit Van Amsterdam.
- Rezende AB, Queiroz CC, Caldart FA, Ribeiro L, Miyazawa CS (1996) Notas preliminares do estudo cariotípico de distintos grupos de peixes da bacia do rio Paraguai, no estado do Mato Grosso. In: VI Simpósio de citogenética evolutiva aplicada em peixes neotropicais. p.105.
- Roncati HA, Pastori MC, Fenocchio AS (2007) Cytogenetic Studies and Evolutive Considerations on Fishes of the Family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). Cytologia 72(4): 379–384.
- Schweizer D (1980) simultaneous fluorescent staining of r bands and specific heterochromatic regions (da/dapi) in humans chromosomes. Cytogenetics and cell genetics 27: 190-193.
- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks J S (2008) Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). Cladistics 24: 625–641.
- Stiassny MLJ (1991) Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. In: Keenleyside (Ed.), Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution. Chapman Hall, London, pp. 1–35

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research* 74: 304-306.

Thompson KW (1979) Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. *Copeia* 4: 679-691.

Valente G T, Andrade Vitorino C, Cabral-de-Mello DC, Oliveira C, Lima Souza I, Martins C, Venere PC (2012) Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia River system, Brazil, by conventional cytogenetic methods. *Comparative Cytogenetics* 6(2):163-181.

CAPÍTULO 3

Comparação cromossômica entre cinco espécies de ciclídeos neotropicais dos gêneros *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* (Perciformes)*

*** Este artigo será enviado para Freshwater Biology.**

**Comparação cromossômica entre cinco espécies de ciclídeos neotropicais dos gêneros
Cichlasoma e *Gymnogeophagus* (Perciformes)**

Larissa B. Pires; Ana Lucia Dias*

Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná CEP 86051-970, Brasil

RESUMO

A família Cichlidae é um dos maiores grupos de teleósteos e um dos mais especiosos da ordem Perciformes, tendo mais de 1.600 espécies de peixes habitando a África, países do Oriente e toda América. Os gêneros *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus*, pertencem à subfamília Cichlinae, compreendendo 52 espécies válidas, mas com poucos estudos citogenéticos. Análises citogenéticas foram realizadas em cinco espécies: *Cichlasoma dimerus*, *C. paranaense*, *C. portalegrense*, *Gymnogeophagus rhabdotus* e *G. lacustris*, coletadas em diferentes pontos das bacias dos rios Paranapanema (PR/SP) e Paraguai/MS e do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS. Todas as espécies apresentaram um número diplóide igual a 48, com diferenças inter e intraespecíficas quanto às fórmulas cariotípicas. *Cichlasoma dimerus* apresentou 12m-sm+36st-a (NF=60), *C. portalegrense* e *C. paranaense* (população ribeirão Taquari) apresentaram 14m-sm+34st-a (NF=62); *C. paranaense* (população rio Paranapanema) mostrou 4sm+44 st-a (NF=52), *Gymnogeophagus rhabdotus* com 4m+2sm+42st-a (NF=54) e 4m+4sm+40st-a (NF=56) para *G. lacustris*. Todas as espécies apresentaram RONS simples, com exceção de *G. rhabdotus* e da população de *C. paranaense* do rio Paranapanema que mostraram RONS múltiplas, confirmadas pela FISH com sonda de DNAr 18S, sendo que nesta última população foram observados cístrons ribossômicos em cromossomos sem homologia. Todas as RONS foram CMA₃ positivas e DAPI negativas. A heterocromatina mostrou-se distribuída principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos e coincidentes com as RONS, exceto *C. paranaense* (população do rio Paranapanema) que mostrou um bloco heterocromático intersticial em apenas um cromossomo (cromossomo 5), que não é AgRON mas apresenta sítios de DNAr 18S. Este trabalho mostra pela primeira vez dados citogenéticos de *Cichlasoma portalegrense*, *Gymnogeophagus lacustris* e *G. rhabdotus*, e os resultados reforçam a idéia da evolução cromossômica conservativa neste grupo de peixes entretanto, as variações cromossômicas interespecíficas e intrapopulacionais observadas, confirmam o fato de que novos mecanismos cromossômicos estejam atuando na diversificação cariotípica deste grupo de peixes.

Palavras-chave: AgRONS. Cichlinae. DNAr 18S. heterocromatina. Pisces.

Introdução

A família Cichlidae representa o maior e mais diversificado grupo de peixes entre os Perciformes neotropicais, sendo assim considerada um dos maiores grupos de teleósteos, com cerca de 1600 espécies (Moyle e Cech Junior, 2000; Eschmeyer e Fong,

* Autor Correspondente: A.L. Dias; e-mail: anadias@uel.br, telefone e fax: +55 043 33714417

2013). A maioria das espécies que compõem esta família tem ampla distribuição, ocorrendo na América Central e na América do Sul, sendo encontrados representantes em quase todas as bacias hidrográficas sulamericanas (Nelson, 2006).

O gênero *Cichlasoma* apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo em quase toda região neotropical, do México ao sul da América do Sul (Rican e Kullander, 2006) no entanto, o gênero *Gymnogeophagus* apresenta uma distribuição mais restrita, onde a maioria das espécies é endêmica às drenagens dos rios costeiros do Uruguai e do sul brasileiro, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com exceção de *G. balzanii* que apresenta uma ampla distribuição (Reis e Malabarba, 1988).

Baseados em dados morfológicos e moleculares, Smith *et al.* (2008) propuseram que todos os ciclídeos neotropicais pertencem a uma única subfamília, a Cichlinae, e compõem um grupo monofilético, sendo que esta subfamília está subdividida em sete tribos: Astronotini, Chaetobranchini, Cichlasomatini, Cichlini, Geophagini, Heroini e Retroculini. Os gêneros *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* pertencem às tribos Cichlasomatini e Geophagini, respectivamente, sendo estas consideradas bastante numerosas (Kullander, 2003) e, do ponto de vista citogenético, ambos os gêneros já foram estudados citogeneticamente porém, *Cichlasoma* apresenta um maior número de estudos quando comparado com *Gymnogeophagus*, segundo um levantamento citogenético realizado por Feldberg *et al.* (2003), visto que este apresenta somente três espécies cariotipadas, sendo estas *G. balzanii*, *G. gymnogenys* e *G. labiatus* (Feldberg e Bertollo, 1984; Pires *et al.*, 2010).

Dessa maneira, este trabalho tem como objetivo uma análise cariotípica comparativa de cinco espécies de ciclídeos: *Cichlasoma paranaense*, *C. dimerus*, *C. portalegrense*, *Gymnogeophagus rhabdotus* e *G. lacustris*, por meio de diferentes técnicas de bandamento cromossômico, a fim de que os dados obtidos possam contribuir para uma melhor caracterização das subfamílias Cichlasomatinae e Geophaginae. Adicionalmente, este estudo traz as primeiras informações citogenéticas para *Cichlasoma portalegrense*, *Gymnogeophagus lacustris* e *G. rhabdotus*

Material e Métodos

As espécies estudadas dos gêneros *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* foram coletadas em diferentes pontos da bacia dos rios Paranapanema(PR/SP) e Paraguai/MS e do sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS. Foram analisados 6 exemplares (4 machos e 2 fêmeas) de *C. paranaense* coletados no ribeirão Taquari/PR (23°10'45.2''S 50°56'30.9''W) e

4 exemplares (2 machos e 2 fêmeas) coletados no rio Paranapanema/SP (22°42'30.3''S 51°04'08.4''W), sendo que estas localidades pertencem à bacia do rio Paranapanema; 10 exemplares (4 machos e 6 fêmeas) de *C. dimerus* coletados no rio Miranda (19°34'38.01''S 57°01'06.63''W) pertencente à bacia do rio Paraguai/MS; e 8 exemplares (5 machos e 3 fêmeas) de *C. portalegrense* coletados na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS (30°5'38.38''S 51°40'22.4''W), pertencente ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS.

Nesta Estação Experimental Agrônômica da UFRGS também foram coletados 6 exemplares (3 machos e 3 fêmeas) de *Gymnogeophagus rhabdotus*; e na bacia do Tramandaí/RS foram analisados dois indivíduos (2 machos) de *G. lacustris* coletados na lagoa Rondinha (30°13'53.25''S 50°15'15.17''W), pertencente também ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS. Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil e, por conveniência, as diferentes populações de *C. paranaense*, do ribeirão Taquari e rio Paranapanema, foram chamadas de A e B, respectivamente. Os exemplares foram coletados com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: número da licença - 1947869).

As preparações cromossômicas foram obtidas de acordo com a técnica de preparação direta, descrita por Bertollo *et al.* (1978). Os cromossomos foram classificados conforme Levan *et al.* (1964), com modificações e, para determinação do número fundamental (NF), os cromossomos meta e submetacêntricos foram considerados com dois braços e o grupo subtelo-acrocêntrico (st-a) com um braço.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e o padrão de distribuição da heterocromatina foram evidenciados segundo as técnicas propostas por Howell e Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. Os tratamentos com fluorocromos base específicos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), foram realizados de acordo com a técnica de coloração descrita por Schweizer (1980), com algumas modificações. A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada seguindo protocolo de Pinkel *et al.* (1986), com modificações, utilizando sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004). As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Leica DM2000) e as metáfases foram capturadas pelo software Leica Application Suite, versão 3.1.0. (Leica Microsystems).

Resultados

Todos os exemplares de *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus*, das diferentes localidades, apresentaram número diplóide ($2n$) igual a 48, no entanto, fórmulas cariotípicas distintas foram encontradas, sendo $12m-sm+36st-a$ e número fundamental (NF) igual a 60 para *Cichlasoma dimerus* (Figura 1a), $14m-sm+34st-a$ (NF=62) para *C. portalegrense* e a população A de *C. paranaense* (Figura 1b-c, respectivamente) e $4sm+44st-a$ (NF=52) para a população B de *C. paranaense* (Figura 1d). *Gymnogeophagus rhabdotus* apresentou $4m+2sm+42st-a$ (NF=54) e *G. lacustris* $4m+4sm+40st-a$ (NF=56) (figuras 2a-b, respectivamente); nesta última espécie foi identificada uma constrição secundária intersticial no braço curto do maior par cromossômico, com um pequeno heteromorfismo de tamanho (Figura 2b - box). Nenhuma diferença entre os cariótipos de machos e fêmeas foi evidenciada entre os exemplares (Tabela 1).

As regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) foram localizadas em um par de cromossomos para todas as espécies, exceto na população B de *C. paranaense* e em *G. rhabdotus* que apresentaram de três a quatro cromossomos marcados (Fig. 1 e 2). Na população B de *C. paranaense* foi possível observar uma variação de 2 a 3 AgRONS localizadas nas regiões terminais do braço curto de um par submetacêntrico (par 1) e do braço longo de um cromossomo subtelo-acrocêntrico (cromossomo 11) (Fig. 1d). As demais espécies de *Cichlasoma*, incluindo a população A de *C. paranaense*, apresentaram marcações terminais no braço curto de cromossomos meta-submetacêntricos (Fig. 1a-c).

Em *Gymnogeophagus rhabdotus* as marcações estavam localizadas em cromossomos st-a, no braço longo do par 5 e no braço curto do par 12 (Fig. 2a), e em *G. lacustris* as AgRONS foram localizadas intersticialmente no braço curto do maior par metacêntrico, com heteromorfismo de tamanho entre os homólogos (Fig. 2b).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sonda de DNAr 18S, revelou para *C. dimerus*, *C. portalegrense*, *C. paranaense* (população A) e *G. lacustris* a presença de dois cístrons ribossômicos, correspondendo às marcações observadas pela impregnação por nitrato de prata (Fig. 1a-c e 2b). Nas outras duas espécies, foram observados quatro cístrons ribossômicos localizados nos pares 5 e 12 na região terminal em *G. rhabdotus* (Fig. 1d) e em *C. paranaense* (da população B) no braço curto do par 1 (m-sm) e no braço longo dos cromossomos 5 e 11 (sem homologia) na região intersticial e terminal, respectivamente (Fig 1d). Este cromossomo 5 não tinha sido observado pela impregnação com nitrato de prata.

O bandamento C revelou marcações heterocromáticas distribuídas na região pericentromérica da grande maioria dos cromossomos e associadas às RONS em todas as espécies (Fig. 3), exceto *G. rhabdotus* e *C. paranaense* que apresentaram marcações adicionais: a primeira espécie apresentou blocos heterocromáticos terminais em alguns cromossomos; e *C. paranaense* (população B) apresentou uma marcação intersticial, no braço longo de um cromossomo subtelo-acrocêntrico (par 3) de tamanho grande (Fig. 3e-d, respectivamente).

O tratamento com o fluorocromo cromomicina A₃ evidenciou marcações fluorescentes coincidentes com as RONS em todas as espécies analisadas (Fig. 1 e 2). Os exemplares de *G. lacustris* apresentaram o mesmo heteromorfismo de tamanho que já tinha sido evidenciado pelo Giemsa e hibridação fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S (Fig. 1 e 2). Na coloração com DAPI estas regiões não apresentaram marcações fluorescentes, aparecendo somente como bandas negativas (Fig. 1 e 2).

Discussão

Todas as espécies de *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* analisadas neste estudo apresentaram um $2n=48$, semelhante aos dados da literatura para os ciclídeos (Thompson, 1979; Feldberg *et al.*, 2003). Este número diplóide é bastante conservado em Cichlidae neotropicais, sendo identificado na maioria das espécies das tribos Geophagini e Cichlasomatini, com exceção de *Bujurquina vittata*, *Cichlasoma bimaculatum*, *Nannacara anomala* com $2n = 44$ (Thompson, 1979), de espécies do gênero *Apistogramma*, *Cichlasoma* sp. C, *Dicrosus filamentosus*, *Uaru amphiacanthoides* com $2n = 46$ (Thompson, 1979), *Acaronia nassa*, *Caquetaia kraussi*, *C. spectabilis*, *Cleithracara maronii* com $2n = 50$ (Zahner, 1977; Thompson, 1979), *Cichlasoma salvini* com $2n = 52$ (Zahner, 1977; Thompson, 1979) e *Symphysodon aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi* com $2n = 60$ (Thompson, 1979, Gross *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Valente *et al.*, 2011).

A tribo Cichlasomatini é a que apresenta maior variação do $2n$ dentro da subfamília Cichlinae e, conseqüentemente, da família Cichlidae, podendo estar ocorrendo processos de fusão e fissão (Feldberg *et al.*, 2003) e, no gênero *Symphysodon* ($2n = 60$), um possível evento de poliploidização com perda de cromossomos (Thompson, 1979; Kornfield, 1984 *apud* Feldberg *et al.*, 2003; Mesquita *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2011).

Estes são os primeiros dados citogenéticos para *Cichlasoma portalegrense*, *Gymnogeophagus rhabdotus* e *G. lacustris* e, apesar da conservação do número diploide entre as espécies, variações nas fórmulas cariotípicas foram encontradas em *C. dimerus* e *C. paranaense* (população B) em relação às populações anteriormente estudadas destas espécies (Martins *et al.*, 1995; Feldberg *et al.*, 2003; Roncati *et al.*, 2007; Poletto *et al.*, 2010). As inversões pericêntricas parecem ser o mecanismo que mais contribuiu para essas mudanças, visto que o número diplóide não foi alterado, assim como observado por Thompson (1979); Feldberg *et al.* (2003), Poletto *et al.* (2010) em outras espécies de ciclídeos. Entretanto, outros eventos de rearranjos não podem ser descartados, como em *Tilapia mariae*, na qual processos de fusões cromossômicas explicariam a redução do 2n para 40 cromossomos (Poletto *et al.*, 2010), e em espécies de *Symphysodon*, onde sucessivos eventos de translocações, fissões e/ou fusões, teriam contribuído para a formação do cariótipo mais derivado na família Cichlidae (2n=60) (Gross *et al.*, 2009).

De modo geral, com exceção da população B de *Cichlasoma paranaense* e *G. rhabdotus*, que apresentaram RONS múltiplas, todos os ciclídeos analisados no presente estudo, apresentaram apenas um par cromossômico nucleolar, caracterizando um sistema de RONS simples, confirmando assim a condição ancestral proposta por Feldberg *et al.* (2003) porém, diferenças nos tipos cromossômicos e na localização destes sítios foram observadas. Em *Cichlasoma dimerus*, *C. portalegrense* e *C. paranaense* (população A) os sítios nucleolares estavam localizados na posição terminal do braço curto de pares cromossômicos meta-submetacêntricos, já em *G. lacustris* estes sítios estavam intersticialmente no braço curto, correspondente ao par 1, sendo coincidente com uma constrição secundária, visível na coloração de Giemsa. Estes resultados são semelhantes aos encontrados para outras espécies de *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus*, como *C. facetum* (Feldberg e Bertollo, 1985; Vicari *et al.*, 2006), *C. paranaense* (Martins *et al.*, 1995), e *G. labiatus* (Pires *et al.*, 2010), sendo encontrada apenas variação quanto à identificação do cromossomo portador, podendo ser em cromossomos metacêntricos (Martins *et al.*, 1995) ou subtelo-acrocêntrico (Vicari *et al.*, 2006).

Em *G. rhabdotus* e *C. paranaense* (população B) foram observados até quatro cromossomos nucleolares, sendo que a primeira espécie apresentou dois pares cromossômicos portadores dos cístrons ribossômicos, padrão incomum na tribo Geophaginae, já que há relatos de RONS múltiplas apenas em *Geophagus brasiliensis*, *Gymnogeophagus gymnogenys* e *Satanoperca acuticeps* (Brum *et al.*, 1998; Feldberg *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2010), sendo esta a primeira descrição no gênero confirmada por hibridação *in situ*.

Entretanto, na população B de *C. paranaense* foi observado um par cromossômico e dois cromossomos nucleolares não homólogos (cromossomos 5 e 11) com cístrons ribossômicos, sendo que o primeiro cromossomo apresenta um sinal intersticial, não correspondente com sítios AgRONS e correspondente a heterocromatina.

A ocorrência de sítios de DNAr 18S em apenas um dos cromossomo homólogos dos pares 5 e 11 e a localização destes genes de RNAr 18S no braço longo, é incomum em *Cichlasoma paranaense*, nunca antes relatado, podendo indicar, a princípio, uma característica particular desta espécie e nesta população do rio Paranapanema. Na literatura, a maioria destes sítios estão, predominantemente, localizados no braço curto dos cromossomos, podendo ser tanto do grupo m-sm (Perazzo *et al.*, 2010; Poletto *et al.*, 2010) ou do grupo st-a (Pires *et al.*, 2008; Vicari *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2010a, 2010b; Poletto *et al.*, 2010).

Nas tribos Geophagini e Cichlasomatini, como nos Cichlidae em geral, com raras exceções, o padrão de RONS simples é o mais encontrado, assim como nos Perciformes, fazendo com que esta característica seja considerada plesiomórfica em relação às RONS múltiplas, relatada nas tribos nos gêneros *Caquetaia*, *Cichlasoma*, *Crenicichla*, *Geophagus*, *Gymnogeophagus*, *Mesonauta*, *Satanoperca* e *Symphysodon*, como pode ser visto em revisão feita por Feldberg *et al.* (2003), Brum *et al.* (1998) e Pires *et al.* (2010). Relatos de RONS múltiplas confirmadas pela FISH em ciclídeos são escassos, pois somente 6 espécies, incluindo as do presente estudo, apresentaram este sistema, sendo encontrado em *Mesonauta festivus* (Poletto *et al.*, 2010), em *Symphysodon aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi* (Gross *et al.*, 2010a). Interessante notar, que essas quatro espécies pertencem à tribo Heroini, considerada a mais derivada dentro da subfamília Cichlinae, e que *Cichlasoma paranaense* e *Gymnogeophagys rhabdotus* pertencem as tribos Cichlasomatini e Geophagini, respectivamente (Smith *et al.*, 2008).

A coloração pelo fluorocromo cromomicina A₃ evidenciou, para todas as espécies, marcações fluorescentes coincidentes com as RONS, sendo estas DAPI negativas, reforçando que são ricas em pares de bases GC. Este padrão foi evidenciado por outros autores, como Loureiro (1999), Vicari *et al.* (2006) e Pires *et al.* (2010), em outras espécies de geophagíneos e cichlasomatídeos. No entanto, a população B de *Cichlasoma paranaense*, apresentou novamente um padrão distinto, sendo que apenas um cromossomo nucleolar (cromossomo 11) e par 1 foram CMA₃ positivo. Além disso, ainda nos exemplares desta localidade, foi observada uma marcação fluorescente intersticial no cromossomo 5, coincidente com a heterocromatina sendo esta, portanto, composta predominantemente de

bases GC, diferente das heterocromatinas pericentroméricas. Portanto, nesta população de *C. paranaense* está ocorrendo uma variação na composição de bases tanto das RONS quanto da heterocromatina.

Em relação à heterocromatina, esta se mostrou distribuída nas cinco espécies nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, com marcações heterocromáticas terminais coincidentes aos sítios nucleolares, característica comum da família, exceto a população B de *C. paranaense* que também apresentou uma marcação intersticial, como citado anteriormente. Este padrão de distribuição de heterocromatina é bem típico ao padrão geral encontrado em ciclídeos, sendo observado em diferentes espécies de *Cichlasoma*, como em *C. paranaense*, *C. dimerus*, *C. facetum* (Martins *et al.*, 1995; Vicari *et al.*, 2006; Roncati *et al.*, 2007) e de *Gymnogeophagus*, como *G. balzanii*, *G. gymnogenys* e *G. labiatus* (Roncati *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2010).

Analisando as duas populações de *Cichlasoma paranaense*, apesar de ambas apresentarem o mesmo número diploide tão conservado na família, a população de *C. paranaense* do rio Paranapanema apresenta características totalmente diversas da população do ribeirão Taquari, como uma fórmula cariotípica composta por uma grande quantidade de cromossomos st-a e RONS múltiplas, que parecem ser derivadas para os ciclídeos, visto que foram observados sítios de DNAr 18S em regiões terminais e uma intersticial, no braço longo de cromossomos subtelo-acrocêntricos não homólogos. A localização destes sítios em regiões terminais dos cromossomos pode, principalmente, ser o fator que facilitaria a transposição destas sequências para outros cromossomos através de eventos de translocação, como observado por Gross *et al.* (2010a, 2010b) em espécies de *Symphysodon*, e que poderiam explicar a origem do cístron ribossômico intersticial encontrado em apenas um cromossomo subtelo-acrocêntrico de tamanho grande (cromossomo 5).

Interessante notar, que esta região intersticial no cromossomo 5 de *Cichlasoma paranaense*, do rio Paranapanema, apresenta heterocromatina rica em bases GC e cístrons ribossômicos 18S, que não é AgRON, indicando a inatividade deste sítio nucleolar. Essa inatividade pode ser devido ao silenciamento gênico nesta região, ocasionada pela associação de heterocromatina neste local, visto que na maioria dos ciclídeos, como nos teleósteos em geral, os sítios de DNAr 18S quase sempre compreendem grandes frações de DNA ricas em pares de bases GC (Mantovani *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2008), indicando que genes ribossômicos estão intercalados com heterocromatina GC ricas (Pendás *et al.*, 1993; Abuín *et al.*, 1996). Sabe-se que os cromossomos de ciclídeos são ricos em diversas famílias de DNA repetitivos, como relatado por Gross *et al.* (2009), Valente *et al.* (2011), Mazzuchelli

et al. (2011, 2012); e estas famílias poderiam promover o silenciamento do gene DNAr 18S, similarmente ao que ocorre em uma população de *Astyanax janeiroensis*, nos sítios ribossômicos associados com o DNA repetitivo As51 (Vicari *et al.*, 2008).

As diferenças entre as duas populações de *Cichlasoma paranaense* podem ser decorrentes do isolamento geográfico entre as populações do ribeirão Taquari e rio Paranapanema e, conseqüentemente, este isolamento estaria facilitando a fixação de rearranjos cromossômicos nas populações, como proposto por Oliveira *et al.* (1988) e que, talvez, *C. paranaense* seja uma espécie críptica.

Os resultados para as espécies de *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* demonstram que, os padrões cariotípicos foram bastante semelhantes aos encontrados na literatura, para as tribos Cichlasomatini e Geophagini, reforçando a idéia da evolução cromossômica conservativa neste grupo de peixes. No entanto, as variações encontradas entre as populações de *Cichlasoma paranaense* e, até mesmo entre as outras espécies, confirmam o fato que novos mecanismos cromossômicos estejam atuando na diversificação deste grupo de peixes.

Tabela 1 - Resultados cariotípicos para as espécies de *Cichlasoma* e *Gymnogeophagus* analisadas no presente estudo: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, CS = constrição secundária, RONS = regiões organizadoras de nucléolos e CMA₃ = cromomicina A₃.

| Espécies | Localidade | Populações | 2n | Fórmulas Cariotípicas | NF | CS | RONS | CMA ₃ |
|-------------------------|--|------------|----|--------------------------|----|-----------|--|-------------------------------------|
| <i>C. paranaense</i> | rib.Taquari (PR) | A | 48 | 14m-sm + 34 st-a | 62 | - | Simplex: par 3 (t) | par 3 (t) |
| | rio Paranapanema (SP) | B | 48 | 4 m-sm + 44 st-a | 52 | - | Múltipla: par 1 (t) crom 5 (i) e 11 (t) | par 1 (t) crom 5 (i) e 11 (t) |
| <i>C. portalegrense</i> | Estação Agronômica da UFRGS (RS) | - | 48 | 14 m + 34 st-a | 62 | - | Simplex: par 5 (t) | par 5 (t) |
| <i>C. dimerus</i> | rio Miranda (MS) | - | 48 | 12 m + 36 st-a | 60 | - | Simplex: par 4 (t) | par 4 (t) |
| <i>G. rhabdotus</i> | Estação Agronômica da UFRGS (RS) | - | 48 | 4 m + 2 sm + 42 st-a | 54 | - | Múltipla: par 5 (t) par 12 (t) | par 5 (t) par 12 (t) |
| <i>G. lacustris</i> | Lagoa Rondinha (RS) | - | 48 | 4 m + 4 sm + 40 st-a | 56 | par 1 (i) | Simplex: par 1 (i) | par 1 (i) |

Legenda: rib. = ribeirão; t = terminal; i = intersticial; crom = cromossomo.

Figura 1 - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA₃/DAPI de: *Cichlasoma dimerus* (a), *C. portalegrense* (b) e *C. paranaense*, populações A (c) e B (d), respectivamente.

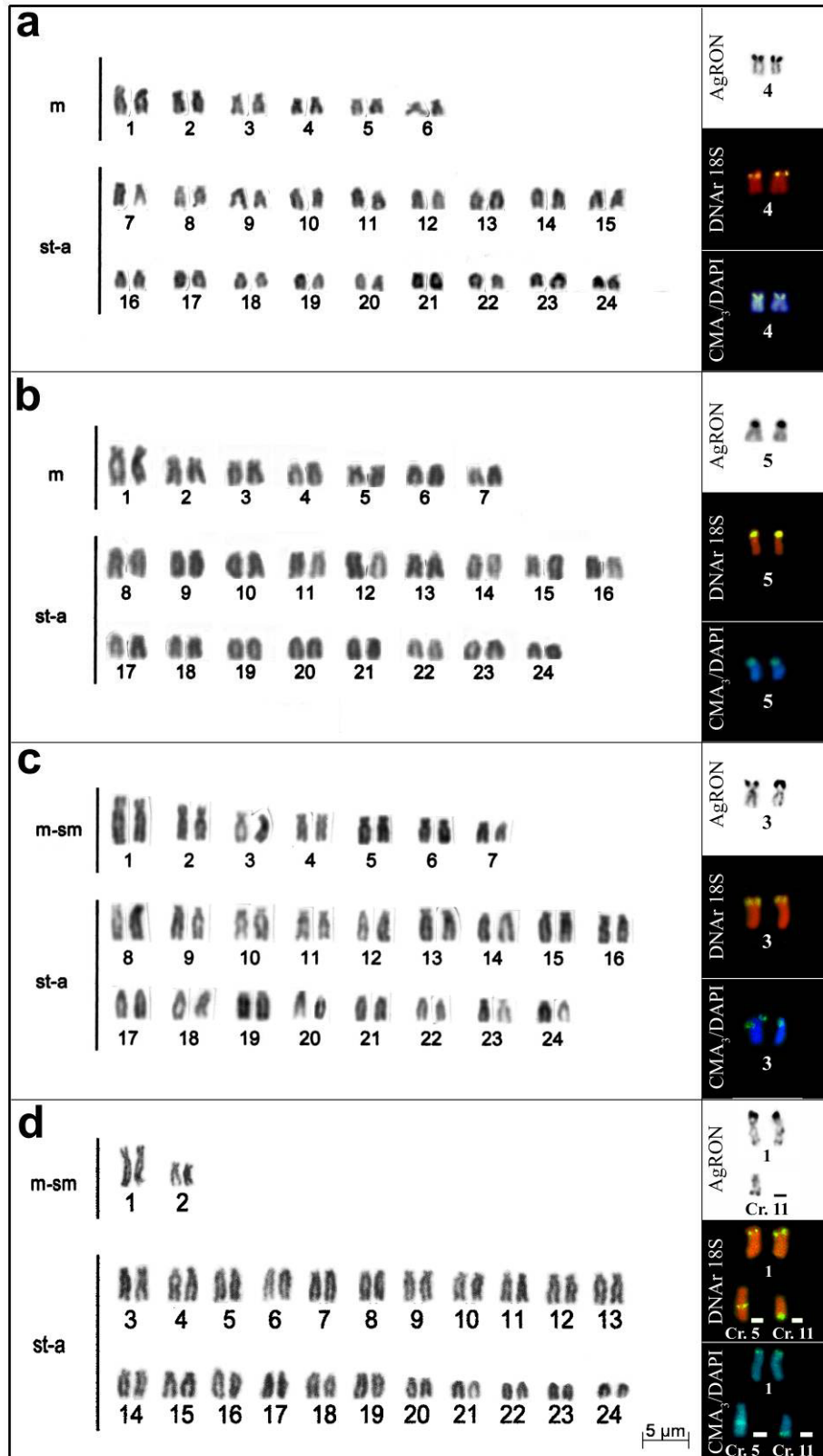


Figura 2 - Cariótipo e pares cromossômicos após impregnação por nitrato de prata, FISH com sonda de DNAr 18S e dupla coloração CMA3/DAPI de: *Gymnogeophagus rhabdotus* (a) e *G. lacustris* (b), respectivamente.

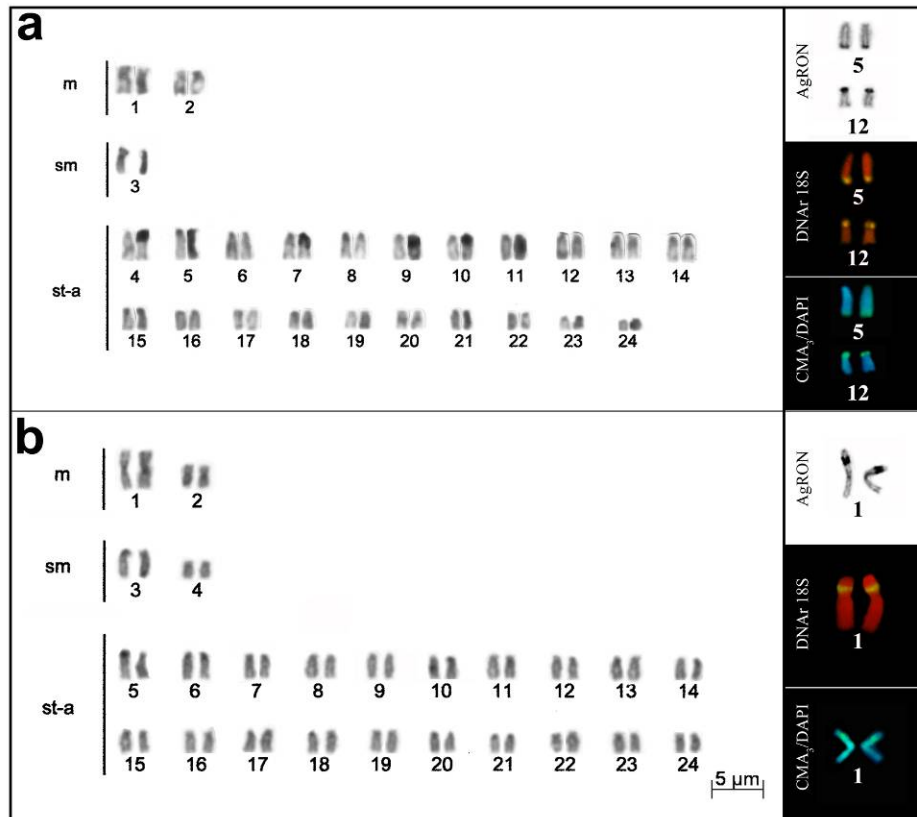
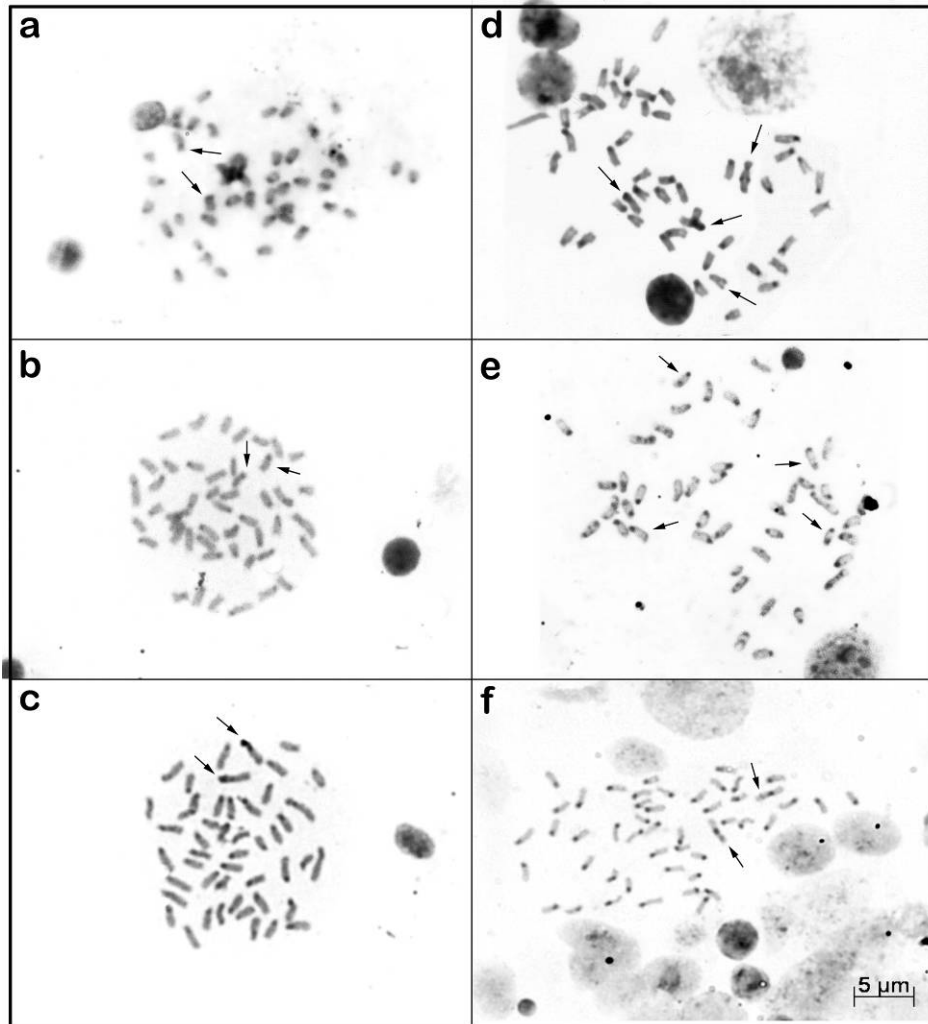


Figura 3 - Metáfases somáticas após o bandamento C de *Cichlasoma dimerus* (a), *C. portalegrense* (b), *C. paranaense*, populações A (c) e B (d), *Gymnogeophagus rhabdotus* (e) e *G. lacustris* (f), respectivamente. As setas indicam as regiões organizadoras de nucléolos.



Referências

- Abuín M., Clabby C., Martínez P., Goswami U., Flavin F. (1996) A NOR associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome* **39**: 671–679.
- Bertollo L.A.C., TAKAHASHI C.S., MOREIRA-FILHO O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, **1**: 103-120.
- Brum M.J.I., Oliveira C.C., Voigt N, Côrrea M.M.O. (1998) Karyotypic discrepancy between populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae), including the topotypical population, with possible taxonomic implications. *J. Comp. Biol.*, **2** (3): 177-184.
- Eschmeyer WN, Fong JD (2013) Species by family/subfamily in the catalog of fishes. Electronic Database accessible at

<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> Acessado 31 de janeiro de 2013.

- Feldberg E., Bertollo L.A.C. (1984) Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pices: Cichlidae) Rev. Bras. Genet. **4** (IV): 639-645.
- Feldberg E., Bertollo L.A.C. (1985) Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). Caryologia, **38**: 319-324.
- Feldberg E., Porto J.I.R., Bertollo L.A.C. (2003) Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G., *Fish Adaptations*, New Dehli & New York, Science Publishers. 418p.
- Gross M.C., Feldberg E., Cella D.M., Schneider M.C., Schneider C.H., Porto J.I.R., Martins C. (2009) Intriguing evidence of translocations in discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. Heredity: 1-7.
- Gross M.C., Schneider C.H., Valente G.T., Martins C., Feldberg E. (2010a) Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. Journal of Fish Biology **76**: 1117-1127.
- Gross M.C., Schneider C.H., Valente G.T., Porto J.I.R., Martins C., Feldberg E. (2010b) Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. Cytogenetic and Genome Research **5**: 1-11.
- Hatanaka T., Galetti Jr P.M. (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica **122**: 239-244.
- Howell W.M., Black D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizing regions with a protective colloidal developer: a one step method. Experientia **36**: 1014-1015.
- Kullander S.O. (2003) Family Cichlidae Pp 605-654 In: Reis R.E., Kullander S.O., Ferraris Jr. C.J. (Org) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 729p.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. Hereditas **52**: 201-204.
- Loureiro M.A. (1999) Análise citogenética em quatro espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Londrina: Londrina, 98p.
- Mantovani M., Abel L.D.S., Mestriner C.A., Moreira-Filho O. (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Genet Mol Biol **27**: 536-542.

- Martins I.C., Portella-Castro A.L.B., Júlio Jr. H.F. (1995) Chromosomes analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Parana river. *Cytologia* **60**: 223-231.
- Mazzuchelli J., Yang F., Kocher T.D., Martins C. (2011) Comparative cytogenetic mapping of Sox2 and Sox14 in cichlid fishes and inferences on the genomic organization of both genes in vertebrates. *Chromosome Res*, **19**: 657–667.
- Mazzuchelli J., Kocher T.D., Yang F., Martins C. (2012) Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. *BMC Genomics*, **13**: 463.
- Mesquita D.R., Porto J.I.R., Feldberg E. (2008). Chromosomal Variability in the Wild Ornamental Species of *Symphysodon* (Perciformes: Cichlidae) from Amazon. *Neotropical Ichthyology*, **6**: 181-90.
- Moyle P.B., Cech Junior J.J.(2000) *Fishes: an introduction to ichthyology*. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 612 p.
- Nelson J.S. (2006) *Fishes of the world*. Wiley, New Jersey.
- Oliveira C.L.F., Almeida-Toledo L.M., Foresti F., Britski H.A., Toledo-Filho S.A. (1988) Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetic* **11**, 577-624.
- Pendás A.M., Morán P., Garcia-Vásquez G. (1993) Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet* **63**: 128–130 (1993)
- Perazzo G., Noleto R.B., Vicari M.R., Machado P.C., Gava A., Cestari M.M. (2010) Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme southern Brazil. *Rev Fish Biol Fisheries*: 1-7.
- Pinkel D, Straume T., Gray J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci (Usa)* **83**: 2934–2938.
- Pires L.B., Giuliano-Caetano L., Dias A.L. (2008) Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. *Caryologia* **61**(2): 135-138.
- Pires L.B., Giuliano-Caetano L., Dias A.L. (2010) Cytogenetic characterization of *Geophagus brasiliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia Biologica (Kraków)* **58**: 29-34.
- Poletto A.B., Ferreira I.A., Cabral-de-Mello D.C., Nakajima R.T, Mazzuchelli J., Ribeiro H.B., Venere P.C., Nirchio M., Kocher T.D., Martins C. (2010). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*; n(50): 1-12.
- Reis R.E., Malabarba L.R. (1988) Revision of The Neotropical Cichlid Genus *Gymnogeophagus* Ribeiro, 1918, with descriptions of two new species (Pisces, Perciformes). *Rev Bras Zool* **4**(4): 259-305.

- Rican O., Kullander S. O. (2006). Character- and tree-based delimitation of species in the 'Cichlasoma' *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*, **44**: 136-152.
- Roncati H.A., Pastori M.C., Fenocchio A.S. (2007) Cytogenetic Studies and Evolutive Considerations on Fishes of the Family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). *Cytologia* **72**(4): 379–384.
- Schweizer D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in humans chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**, 190-193.
- Smith W. L., Chakrabarty P., Sparks J.S. (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* **24**, 625–641.
- Sumner A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, **74**: 304-306.
- Thompson K.W. (1979) Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. *Copeia* **4**, 679-691.
- Valente G.T., Mazzuchelli J., Ferreira I.A., Poletto A.B., Fantinatti B.E.A., Martins C. (2011) Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res*, **133**:34–42.
- Vicari M.R., Artoni R.F., Moreira-Filho O, Bertollo L.A.C. (2006) Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia*, **59** (3): 260-266.
- 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 janaeirensis*. *Cytogenetic and Genome Research*, **122**: 67-72.
- Zahner E. (1977) *apud*: Kornfield I.L. (1984). Descriptive genetics of cichlid fishes. *In*: TURNER, B. J. (eds.), *Evolutionary Genetics of Fishes*. New York, Springer, 636p.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Todas as espécies analisadas apresentaram um número diplóide de 48 cromossomos, característico da família Cichlidae, entretanto foram encontradas diferenças interespecíficas e intrapopulacional nas fórmulas cariotípicas;
2. Na espécie *Crenicichla lepidota*, provenientes do Saco da Alemoa e Gasômetro, do sistema hidrográfico Laguna dos Patos/RS, foi observada a presença de cromossomos B, totalmente heterocromáticos;
3. Nas análises meióticas, foi possível verificar o comportamento padrão do cromossomo B em *C. lepidota*, como: migração tardia e a não homologia com os cromossomos do complemento A, sendo observada uma configuração meiótica incomum em diacinese;
4. As espécies do gênero *Crenicichla* coletadas em diferentes bacias hidrográficas, apresentaram fórmulas cariotípicas distintas, sendo que as populações de *Crenicichla britskii* mostraram características próprias, indicando uma diversidade cariotípica nesta espécie;
5. Todas as espécies de *Crenicichla* apresentaram uma constrição secundária intersticial no braço curto do maior par cromossômico, do tipo metacêntrico, considerado característico do gênero, com exceção de *C. semifasciata* e *C. britskii* do ribeirão Taquari/PR, sendo observado heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos nas espécies *C. maculata* e *C. britskii* do rio Paranapanema;
6. No gênero *Crenicichla* foi observado um sistema de RONS simples para todas as espécies, coincidentes com as constrições secundárias, exceto *C. britskii* do rio Paranapanema, que apresentou 2 pares cromossômicos com cístrons ribossômicos, indicando a ocorrência de RONS múltiplas, e apenas um dos pares da RON foi correspondente com a constrição secundária;
7. As variações cromossômicas observadas entre as duas populações tanto de *Crenicichla britskii* quanto de *Cichlasoma paranaense* sugerem que o isolamento geográfico facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos e estas espécies poderiam estar em um processo inicial de especiação;

8. *Gymnogeophagus rhabdotus* e *G. lacustris* coletadas no sistema hidrográfico Laguna dos Patos, apresentaram fórmulas cariotípicas e padrão de RONS distintos (simples e múltiplo, respectivamente), e a última espécie apresentou uma constrição secundária intersticial no braço curto do maior par cromossômico metacêntrico;
9. Nas espécies do gênero *Cichlasoma* foi observado um sistema de RONS simples, exceto *Cichlasoma paranaense* do rio Paranapanema que apresentou um par cromossômico nucleolar mais dois cromossomos sem homologia, confirmando um sistema múltiplo de RONS;
10. *Gymnogeophagus rhabdotus*, *G. lacustris*, *Cichlasoma portalegrense*, *Crenicichla punctata*, *C. maculata* e *C. haroldoi* tiveram seu cariótipo descrito pela primeira vez na literatura;
11. O fluorocromo CMA₃ evidenciou regiões GC ricas correspondentes ao par da RON em todas as espécies. Em *C. britskii* e *C. paranaense*, pertencentes ao rio Paranapanema, foram também evidenciadas marcações CMA₃ intersticiais em outro par de cromossomos, e o fluorocromo DAPI não evidenciou marcações fluorescentes em nenhuma das espécies;
12. A heterocromatina mostrou-se distribuída nas regiões pericentroméricas e coincidente às RONS, exceto em *C. britskii* pertencentes ao rio Paranapanema que apresentou o par da RON (par 6), banda C negativo; nesta mesma espécie e em *Cichlasoma paranaense*, da mesma localidade, foram observadas marcações intersticiais heterocromáticas em um outro par de cromossomos;
13. Os dados aqui apresentados confirmam, de modo geral, a evolução cariotípica conservativa na família Cichlidae no entanto, revelam algumas características interessantes e particulares em algumas espécies, como o cromossomo B em *Crenicichla lepidota* e a ocorrência de RONS múltiplas, além da variação cariotípica encontrada em diferentes populações de *Crenicichla britskii* e *Cichlasoma paranaense*.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, P. R. A. M. 2000. Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da Família Pomacanthidae (Perciformes). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, 146p.
- ALVES, M. N. 1998. Análise citogenética na família Cichlidae: gênero *Cichla* (Schneider, 1801) (Perciformes, Labroidei). Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: Manaus.
- ALVES, M. N.; SANTOS, M. N. M.; FELDBERG, E. 1999. Presença de cromossomos supranumerários em três espécies de Cichlidae da bacia Amazônica. *In: XIII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA*, São Carlos, SP, 155p.
- ARAI, R.; KOIKE, A. 1980. A karyotype study on two species of freshwater fishestransplanted into Japan. *Bull. Nat. Sci. Mus.*, 6: 275-278
- ARIAS-RODRIGUES, L.; IBARRA-CASTRO, L.; PÁRAMO-DELGADILLO, S. 2008. Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Rev. Biol. Trop.*, 56 (2): 895-907.
- BADR, E. A.; EL-DIB, S. I. 1976. Effects of water pollution on the cell division cycle and chromosome behavior in *Tilapia* spp. *J. Cell. Biol.*, 70: 189a.
- BADR, E. A.; EL-DIB, S. I. 1977. Cytological studies on three species of the cichlid fish. *Egypt. J. Genet. Cytol.*, 6: 44-51.
- BENZAQUEM, D.C.; FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; GROSS, M.C.; ZUANON, J.A.S. 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology* 31 (1): 250-255.
- BEUKEBOOM, L.W. 1994. Bewildering Bs: An Impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, 73: 328-336.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. 1986. Manual de identificação de peixes da região de 3 Marias. 2. ed. Brasília: CODEVASP, 115 p.
- BUCKUP, P.A. 1999. Sistemática e Biogeografia de Peixes de Riachos. *In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P.R. (Eds). Ecologia de Peixes de Riachos*. Rio de Janeiro, PPGE-UFRJ, pp.91-138.
- BRUM, M. J. I. 1994. Evolução cariotípica dos teleósteos marinhos e suas correlações com a filogenia deste grupo (com especial ênfase aos Clupeiformes, Perciformes e Tetraodontiformes). Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, 184 p.
- BRUM, M. J. I. 1995. Correlação entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. *Série Monografias*, 2: 5-42.
- BRUM, M. J. I. 1996. Cytogenetics studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Comparative Biology*. 19 (3): 421-427.

- BRUM, M. J. I.; GALETTI JUNIOR, P. M. 1997. Teleostei ground plan karyotype. *J. Comp. Biol.*, 2 (2): 91-102.
- BRUM, M. J. I.; OLIVEIRA, C. C.; VOIGT, N.; CÔRREA, M. M. O. 1998. Karyotypic discrepancy between populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae), including the topotypical population, with possible taxonomic implications. *J. Comp. Biol.*, 2 (3): 177-184.
- BRUM, M. J.; NETO, A. F.; MOTA, L. G. 2002. Análise cariotípica de *Crenicichla lacustris* (Perciformes, Cichlidae) do Estado do Rio de Janeiro. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Maringá, PR, 97p.
- BURGESS, W. E. 1991. Two new genera of angelfishes, Family Pomacanthidae. *Tropical Fish Hobbyist*. 39: 68-70.
- CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. 2000. B-chromosome Evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 355: 163-178.
- CANO, J.; THODE, G.; ALVAREZ, M. C. 1982. Karyoevolutive considerations in 29 Mediterranean Teleost fishes. *Vie Milieu*, 32 (1): 21-24.
- CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. 2008. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 72: 1907-1932
- CHERVINSKI, J. 1964. Preliminary experiments in cichlids hybrids. *Bamidgeh*, 16: 95-105.
- CORAZZA, L. C. Q.; PORTO-FORESTI, F; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 1998. Estudo citogenético em populações de *Geophagus brasiliensis* de diferentes bacias hidrográficas. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, PR, 19p.
- COUTO, T, M.; ABREU, C. S.; MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 1998. Análises cariotípicas preliminares na espécie *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Cichlidae) proveniente do rio Sapucaí, represa de Furnas, MG. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, PR, 20p.
- FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; MEYER, A. 2000. Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 288: 76-92.
- FARIAS, L. N.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; SOUTO, P. S. S.; COELHO, P. N.; BARROS, R. M. 1999. Estudos cariotípicos de duas espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes) do rio Peixe-boi (Amazônia, PA). *Genet. Mol. Biol.* (suplemento) 22 (3): 73p.
- FARIAS, L. N.; NAGAMACHI, C. Y.; BARROS, R. M.; RODRIGUES, L. R. R.; PIECZARKA, J. C. 2000. Estudos citogenéticos em *Aequidens tetramerus* e *Satanoperca acuticeps* (Perciformes, Cichlidae) do rio Peixe-boi (Amazônia, PA). In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Manaus, AM, 91p.

- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. 1984. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pices: Cichlidae). *Rev. Bras. Genet.*, 4(4): 639-645.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. 1985a. Karyotypes of 10 species of neotropical Cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38: 257-268.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. 1985b. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38: 319-324.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; NAKAYAMA, C. M. 1990. Caracterização cariotípica em *Guianacara* sp. (Perciformes, Labrodei, Cichlidae) do rio trombetas – PA. In: III SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Botucatu, SP, 39p.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A.L.; KAPOOR, B.G., *Fish Adaptations*, New Dehli & New York, Science Publishers, 418p.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; ALVES-BRINN, M. N.; MENDONÇA, M. N. C.; BENZAQUEM, D. C. 2004. B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:195-198.
- FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; LOPEZ, P. A.; SANCHEZ, S.; ALBERDI, A. J.; BORDENAVE, S.; DIB, M. C. 1994. Levantamento citogenético em peixes de água doce da Argentina: resumo das espécies estudadas. In: V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, São Carlos, SP, 8p.
- FERREIRA, I.A.; POLETTO, A.B.; KOCHER, T.D.; MOTA-VELASCO, J.C.; PENMAN, D.J.; MARTINS, C. 2010. Chromosome Evolution in African Cichlid Fish: Contributions from the Physical Mapping of Repeated DNAs. *Cytogenet Genome Res*, 129:314–322.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GALETTI, P. M.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 1993. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36: 1124-1128.
- FRYER, G.; ILES, T. D. 1972. The Cichlids Fishes of the Great Lakes of Africa: their biology and Evolution. EdinBurg, Tropical Fish Hobbyist Publications, 641 p.
- FUKUOKA, H.; MURAMOTO, J. 1975. Somatic and meiotic chromosomes of *Tilapia mossambica* Peters. *Chromosome Inf. Serv.*, 18: 4-6.
- GALETTI JR, P. M.; AGUILAR, C. T.; MOLINA, W. 2000. Na overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420: 55-62.
- GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S.; LORSCHIEDER, C.; MARGARIDO V.P. 2009. Threatened fishes of the world: *Crenicichla jupiaensis* Britski & Luengo 1968 (Cichlidae). *Environ Biol Fish* 84:53–54.
- GROSS, M.C.; FELDBERG, E.; CELLA, D.M.; SCHNEIDER, M.C.; SCHNEIDER, C.H.;

- PORTO, J.I.R.; MARTINS, C. 2009. Intriguing evidence of translocations in discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*: 1-7.
- GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; VALENTE, G.T.; PORTO, J.I.R.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. 2010. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research* 5: 1-11.
- GUERRA, M. 1988. Introdução à Citogenética Geral. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- JAKOWSKA, S. 1950. Spermatogenesis in the cichlid fish *Tilapia macrocephala* (Beeker). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 69: 403-413.
- JALABERT, B.; KAMMACHER, P.; LESSENT, P. 1971. Descriptive genetics of cichlid fishes. In: In: TURNER, B. J. (eds.), *Evolutionary Genetics of Fishes*. New York, Springer, 636p.
- JONES, R.N.; REES, H. 1982. B Chromosomes. London, Academic Press.
- KASAHARA, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.
- KORNFIELD, I. L.; RITTE, U.; RICHLER, C.; WAHRMAN, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the sea of Galilee. *Evolution*, 33: 1-14.
- KORNFIELD, I. L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. In: *Evolutionary genetics of fishes*. New York, Springer, 636p.
- KRICHANÃ, S. R. L.; FALCÃO, J. N.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. 1996. Caracterização citogenética de três espécies de peixes ornamentais da bacia amazônica. In: VI SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, São Carlos, SP, 91p.
- KULLANDER, S. O. 1998. A phylogeny and classification of the south american Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Porto Alegre, EDIPUCS, 603 p.
- LAUDER, C. V.; LIEM, K. F. 1983. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 150 (3): 95-197.
- LORSCHIEDER, C. A. 2004. Análises citogenéticas em duas espécies do gênero *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae). Monografia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná: Cascavel, 63p.
- LOUREIRO, M. A.; DIAS, A. L. 1998. Regiões organizadoras de nucléolo (NORs) múltiplas em *Cichlasoma paranaense* (Pisces, Cichlidae) da região de Guaravera, Londrina, PR. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, PR, 18p.

- LOUREIRO, M. A. 1999. Análise citogenética em quatro espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Londrina: Londrina, 98p.
- LOUREIRO, M. A.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. 2000. Cytogenetic characterization of two species of the Genus *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae). *Cytologia* 65: 57-63.
- MAJUMBAR, K. C.; McANDREW, B. J. 1986. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* of the tribe Tilapini (Pisces, Cichlidae). *Genetica*, 68: 175-188
- MARESCALCHI, O. 2005. Karyotype and mitochondrial 16S gene characterizations in seven south American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). *JZS*. 43 (1): 22-28.
- MARTINS-SANTOS, I.C.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B.; JULIO JR, H. F. 1990. Estudo cromossômico de *Aequidens plagiozonatus* (Perciformes, Cichlidae) do rio Paraná. In: III SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Botucatu, SP, 40p.
- MARTINS, I. C.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO JR., H.F. 1995. Chromosomes analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Parana river. *Cytologia*, 60: 223-231.
- MARTINS-SANTOS, I.C.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B.; JULIO JR, H. F. 2005. Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara* cf. *dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the river Paraná PR Brazil. *Caryologia*, 58 (2): 95-101.
- MAZZUCHELLI, J.; KOCHER, T.D.; YANG, F.; MARTINS, C. 2012. Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. *BMC Genomics*, 13:463.
- MENDONÇA, M. N. C.; PORTO, J. I. C.; FELDBERG, E. 1999. Ocorrência de três citótipos em *Satanoperca* aff. *Jurupari* (Perciformes Cichlidae) no Catalão, Manaus, AM. *Genet. Mol. Biol.* (suplemento) 22: 69p.
- MESQUITA, D. R.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. 2000. Análise da variabilidade cromossômica do peixe ornamental acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus*) da Amazônia: população natural de Manacapuru, AM. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, PR, 34p.
- MESQUITA, D.R.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. 2008. Chromosomal Variability in the Wild Ornamental Species of *Symphysodon* (Perciformes: Cichlidae) from Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 6: 181-90.
- MICHELE, J. L.; TAKAHASHI, C. S. 1977. Comparative Cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). *Cytology*, 42: 535-537.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. 1999. Análise citogenética de *Crenicichla iguassuensis* e *Tilapia rendalli* (Pisces, Cichlidae) da bacia do rio Iguaçu. *Genet. Mol. Biol.* (suplemento) 22: 80p.

- MIZOGUCHI, S. M. H. K.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. 2007. Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguçu river. *Genetics and Molecular Research*, 6: 650-656.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; FERRARI, I.; TAKAHASHI, C. S.; FORESTI, F. 1980. Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica. III. Ordem Perciformes. *Ciência e Cultura* (suplemento), 32: 734.
- MOYLE, P. B.; CECH JUNIOR, J. J. 2000. Fishes: an introduction to ichthyology. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 612 p.
- NATARAJAN, R.; SUBRAHMANYAM, K. 1968. *Apud*: KORNFIELD, I. L.; RITTE, U.; RICHLER, C.; WAHRMAN, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the sea of Galilee. *Evolution*, 33: 1-14.
- NATARAJAN, R.; SUBRAHMANYAM, K. 1974. *Apud*: KORNFIELD, I. L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. *In*: TURNER, B. J. (eds.), *Evolutionary Genetics of Fishes*. New York, Springer, 636p.
- NELSON, J. S. 2006. Fishes of the World. 3. ed. New York: John Wiley & Sons. 601 p.
- NIJJHAE, B.; NATEG, C. K.; AMEDJO, S. D. 1983. Chromosome studies on *Sarotherodon niloticus*, *S. multifasciatus* and *Tilapia busumana*. *In*: PROC. INTERN. SYMP. ON *Tilapia* IN AQUACULTURE, Nazareth, Israel, 256-260p. .
- NISHIKAWA, S.; AMAOKA, K. KARASAWA, T. 1973. A preliminary study on the chromosomes of *Cichlasoma citrinella* (Cichlidae, Pisces). *Chrom. Inform. Serv.*, 14: 32-33.
- OHNO, S.; ATKIN, N. B. 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. *Chromosoma*, 18: 455-466.
- OLIVEIRA, C.C.; BRUM, M. J. I.; CÔRREA, M. M. O; GALETTI, P. M. 1994. Caracterização cromossômica de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) da localidade tipo (Rio de Janeiro). *In*: V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, São Carlos, SP, 23p.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2007. Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes. *In*: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F & Kapoor B. G (Eds). *Fish Cytogenetics*. Enfield, Science Publisher.
- OYHENART-PERERA. M. F., LUENGO, J. A., BRUM-ZORILLA, N. 1975. Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (JENYNS) y *Crenicichla sexatilis* (LINN.) (Teleostei. Cichlidae). *Ver. Biol. del Uruguay*, 3: 29-36.
- PEIXOTO, R. M.; ERDTMANN, B. Estudos citogenéticos no gênero *Gymnogeophagus* (Pisces, Perciformes, Cichlidae). 1988. *In*: II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Maringá, PR, 27p.
- PERAZZO, G.; NOLETO, R.B.; VICARI, M.R.; MACHADO, P.C.; GAVA, A.; CESTARI, M.M. 2010. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. *Reviews in Fish Biology and*

Fisheries 21(3): 509–515.

- PIRES, L. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. 2008. Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. *Caryologia* 61(2): 135-138.
- PIRES, L.B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. 2010. Cytogenetic characterization of *Geophagus brasiliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia Biologica* (Kraków) 58: 29-34.
- POLETTI, A.B.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; NAKAJIMA, R.T.; MAZZUCHELLI, J.; RIBEIRO, H.B.; VENERE, P.C.; NIRCHIO, M.; KOCHER, T.D.; MARTINS, C. 2010a. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics* 11: 1–50.
- POLETTI, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. 2010b. The B chromosomes of the african cichlid fish *Haplochromis obliquidens* 18SrRNA genes copies. *BMC Genetics*, 11:1.
- POST, A. *apud*. DENTON, T. E. 1965. Fish Chromosome Methodology. Springfield, USA, Charles C. Thomas, Publ, 166p.
- PRASAD, R.; MANNA, G. K. 1976. Chromosomes of the fishes *Tilapia mossambica* and *Notopterus notopterus*. *Chromosome Inf. Serv.*, 21: 11-13.
- QUIJADA, C. C. D.; CESTARI, M. M. Estudos citogenéticos em *Cichlasoma facetum* e *Geophagus brasiliensis* pertencentes a São Mateus do Sul-PR. 1998. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, Londrina, PR, 22p.
- RÁB, P.; LIEHMAN, P.; PROKES, M. 1983. Karyotype of *Cichlasoma tetraacanthum* (Pisces, Cichlidae) from Cuba. *Folia Zoologica*, 32: 185-188.
- RIBBINK, A. J. 1990. Alternative life styles of some African Cichlids fishes. *Environment Biology of Fishes*, 37: 87-100.
- REZENDE, A. B.; QUEIROZ, C. C.; CALDART, F. A.; RIBEIRO, L.; MIYAZAWA, C. S. 1996. Notas preliminares do estudo cariotípico de distintos grupos de peixes da bacia do rio Paraguai, no estado do Mato Grosso. In: VI SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS, São Carlos, SP, 105p.
- ROCHA, C.A.M.; SOUZA, A.C.P.; RAYOL, R.S.; RIBEIRO, H.F. 2013. Description of the karyotype of *Geophagus cf. proximus* (Perciformes, Cichlidae, Geophaginae). *Acta Scientiarum, Biological Science*, 35(1): 83-87.
- RONCATI, H. A.; PASTORI, M. C.; FENOCCHIO, A. S. 2007. Cytogenetic Studies and Evolutive Considerations on Fishes of the Family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). *Cytologia* 72(4): 379–384.
- RONCATI, H. A.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; SANCHEZ, S.; BRASSESCO, M. S. 2000. Diversidad cariotípica em cinco gêneros de peces de la família Cichlidae (Perciformes). In: VIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA

EM PEIXES NEOTROPICAIS, Manaus, AM, 33p.

- SALGADO, S. M.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. Estudos citogenéticos na família 1994. Cichlidae (Perciformes, Labroidei) da bacia Amazônica Central. *In: V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS*, São Carlos, SP, 47p.
- SALGADO, S. M.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. 1995. Estudos citogenéticos em cinco espécies da família Cichlidae (Perciformes-Labroidei), da bacia Amazônia Central. *Genet. Mol. Biol.* (suplemento) 18: 463p.
- SALGADO, S. M.; FALCÃO, J. N.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. 1996. Ocorrência de citótipos diferentes em *Symphysodon discus* (Perciformes, Cichlidae) da bacia amazônica. *In: VI SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS*, São Carlos, SP, 89p.
- SANTOS, A. C.; NAKAYAMA, C. M.; FELDBERG, E. 2001. Estudos citogenéticos no gênero *Mesonauta* (Perciformes: Cichlidae) da bacia Amazônica. *In: X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA*, Manaus, AM, 123-125p.
- SANTOS, L. O. S.; SANA, D. C. S., MOLINA, W. F. 1998. Citogenética comparativa entre os ciclídeos *Cichlasoma bimaculatum* e o híbrido *Oreochromis niloticus* X *O. mossambicus* (Pisces, Perciformes). *In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA*, Recife, PE, 239p.
- SEEHAUSEN, O. 1996. Lake Victoria Rock Cichlids: Taxonomy, Ecology and Distribution.
- SNOEKS, J.; RÜBER, L.; VERHEYEN, E. 1994. The Tanganyika problem comments on the taxonomy and distribution patterns of its cichlid fauna. *In: MARTENS, K.; GODDEERIS, G.; COULTER, G.W.* (eds) *Speciation in ancient lakes*, pp 355–372.
- THOMPSON, K. W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. *Copeia*, 4: 679-691.
- THOMPSON, K. W. 1981. Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces, Perciformes). *Experientia*, 37: 351-352.
- TORRES, R. A.; LEÃO, A. G. 2002. Chromosomal Analysis in a Fish Stock of Tilapia (Pisces: Perciformes: Cichlidae). *Estudos de Biologia*, 24 (49): 39-42.
- TURNER, G.F.; SEEHAUSEN, O.; KNIGHT, M.E.; ALLENDER, C.J.; ROBINSON, R.L. 2001. How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol Ecol* 10:793–806.
- URIBE-ALCOCER, M.; TÉLLEZ-VARGAS, C.; DÍAZ-JAIMES, P. 1999. Chromosomes of *Cichlasoma istlanum* (Perciformes: Cichlidae) and karyotype comparison of two presumed subspecies. *Rev. Biol. Trop.*, 47 (4): 1051-1059.
- VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I.A.; POLETO, A.B.; FANTINATTI, B.E.A.; MARTINS, C. 2011. Cytogenetic Mapping of the Retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. *Cytogenet Genome Res*, DOI: 10.1159/000322888.

- VALENTE, G. T.; ANDRADE VITORINO, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; OLIVEIRA, C.; LIMA SOUZA, I.; MARTINS, C.; VENERE, P.C. 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia River system, Brazil, by conventional cytogenetic methods. *Comparative Cytogenetics* 6(2):163-181.
- VENERE, P.C. 1988. Nota sobre os cromossomos de algumas espécies do baixo rio Tocantins (Reservatório de Tucuruí, PA). *In: II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA APLICADA EM PEIXES NEOTROPICAIS*, Maringá, PR, 36p.
- VERVOORT, A. 1980. The karyotypes of seven species of *Tilapia* (Teleostei: Cichlidae). *Cytologia*, 45: 651-656.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia*, 59 (3): 260-266.
- YOSHIDA, K.; TERAJ, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; KUROIWA, A.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; MATSUDA, Y.; OKADA, N. 2011. B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genet* 7(8): e1002203.
- ZAHNER, E. 1977. *Apud: KORNFIELD, I. L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. In: TURNER, B. J. (eds.), Evolutionary Genetics of Fishes. New York, Springer, 636p.*
- ZHU, H.P.; LU, M.X.; HUANG, Z.H.;1, GAO, F.Y.; MA, D.M.; ZHOU, L.; GUI, J.F. 2011. Karyotype analysis of *Oreochromis mossambicus*, *O. urolepis* and their hybrid based on *Cot-1* DNA bands by fluorescence *in situ* hybridization. *Aquaculture Research*, 42: 1178-1185