



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“ESTUDO DA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM  
*BRYCONAMERICUS ECAI* SILVA, 2004, UTILIZANDO  
DIFERENTES MARCADORES CROMOSSÔMICOS”**

Londrina  
2011

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“ESTUDO DA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM  
*BRYCONAMERICUS ECAI* SILVA, 2004, UTILIZANDO  
DIFERENTES MARCADORES CROMOSSÔMICOS”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina  
2011

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S237e Santos, Angélica Rossotti dos.

Estudo da diversidade cariotípica em *Bryconamericus ecai* Silva, 2004, utilizando diferentes marcadores cromossômicos / Angélica Rossotti dos Santos. – Londrina, 2011.

41 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Characideo – Citogenética. – Teses. 2. Characideo – Cariótipos – Teses. 3. Peixe – Citogenética – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – 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

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“ESTUDO DA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM *BRYCONAMERICUS*  
ECAI SILVA, 2004, UTILIZANDO DIFERENTES MARCADORES  
CROMOSSÔMICOS”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Dias

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho  
UFSC – São Paulo – SP

Londrina, 11 de fevereiro de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e ao meu noivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me dar forças pra nunca desistir.

À minha família pelo carinho, compreensão e apoio incondicional.

Ao meu noivo pelo companheirismo e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós Graduação e à CAPES pela oportunidade.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Dias pela orientação, dedicação e pelo carinho que recebi durante o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada Ana!

À Profa. Dra. Lucia Giuliano-Caetano pelas sugestões e principalmente pelas coletas, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

À Sueli, secretária da pós-graduação, pela atenção e competência.

Ao Prof. Orlando Moreira-Filho e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano-Caetano por aceitarem fazer parte da banca examinadora da minha defesa de dissertação.

Aos amigos que fiz nestes anos no laboratório de Citogenética Animal: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia, Natália, Juceli, Laura, Angéliquinha, Larissa Lacerda, Mariana, Josi, Fábio (obrigada japonês, pelos momentos de descontração), Tiago e em especial à Marce, Larissa Pires, Vivian, Tati e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata pela disposição, sempre que precisei, em me ensinar e ajudar.

Obrigada a todos que de certa forma contribuíram para que fosse possível desenvolver este trabalho!

SANTOS, Angélica Rossotti dos. **Estudo da diversidade cariotípica em *Bryconamericus ecai* Silva, 2004 utilizando diferentes marcadores cromossômicos**. 2011 41 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

No presente estudo foram realizadas análises citogenéticas em exemplares de *Bryconamericus ecai*, coletados no sistema hidrográfico da Laguna dos Patos, sendo estes os primeiros estudos para esta espécie. Todos os indivíduos analisados apresentaram  $2n=52$  entretanto, com diferentes fórmulas cariotípicas, resultando em 4 citótipos, sendo observada a presença de um macrocromossomo acessório no citótipo III. A heterocromatina em *Bryconamericus ecai* apresentou-se distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos nos citótipos I, II e III; e no citótipo IV blocos de heterocromatina foram evidenciados em regiões pericentroméricas e em um par em posição intersticial. O cromossomo acessório mostrou-se heterocromático apenas nas regiões centromérica e terminal do braço curto. A coloração do bandamento C com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI evidenciou heterocromatina DAPI<sup>+</sup> em regiões pericentroméricas e terminais no citótipo I; no citótipo II e III foram observadas bandas terminais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em um par cromossômico e marcações terminais DAPI<sup>+</sup> em alguns cromossomos. O cromossomo B apresentou heterocromatina terminal GC rica. No citótipo IV foram observados sinais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal e intersticial e marcações centroméricas e terminais DAPI<sup>+</sup> em alguns cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs), por meio da impregnação pelo nitrato de prata, foram múltiplas nos citótipos I, III e IV, com variação inter e intraindividual nos citótipos I e III e variação interindividual no citótipo IV. No citótipo II foi observada a presença de apenas um par de cromossomos portadores de sítios AgRONs. A coloração com o fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub>, evidenciou sinais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal, com variação inter e intraindividual nos citótipos I, II e III, sendo alguns sítios coincidentes com as RONs. No citótipo IV houve maior número de sítios CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em relação aos outros citótipos, sendo observado um par com marcação intersticial coincidente com a heterocromatina. A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S, revelou, no citótipo I, quatro cromossomos portadores de sítios ribossômicos 18S, sendo coincidentes com os sítios AgRONs. No citótipo II foi confirmado o sistema simples de RON. No citótipo III até seis cromossomos foram marcados, tendo correspondência com algumas RONs e maior coincidência com os sinais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e no citótipo IV dois cromossomos apresentaram sinais fluorescentes, coincidentes com as RONs. O acentuado polimorfismo cromossômico observado entre os exemplares de *Bryconamericus ecai* somado aos dados da literatura, demonstram que rearranjos cromossômicos, especialmente inversões pericêntricas, tiveram um papel importante na evolução cariotípica deste grupo de peixes, mostrando que sua evolução ocorreu de modo divergente. Pode-se inferir também, que esteja ocorrendo mais de uma espécie de *Bryconamericus*, vivendo em simpatria no rio Forquetinha/RS.

**Palavras-chave:** Characidae. Citótipos. Composição heterocromática. RON. Fluorocromos. FISH.

SANTOS, Angélica Rossotti dos. **Study of karyotypic diversity in *Bryconamericus ecai* Silva, 2004 by chromosomal markers**. 2011 41 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

### ABSTRACT

In the present study cytogenetic analysis were performed on specimens of *Bryconamericus ecai* collected in the water shed of the Laguna dos Patos, which are the first study in this species. All individuals analyzed had  $2n = 52$  with different karyotypic formulae, resulting in four cytotypes, revealing the presence of a macro accessory chromosome in cytotype III. Heterochromatin in *Bryconamericus ecai* is distributed in the pericentromeric region of most chromosomes in cytotypes I, II and III, and in the cytotype IV the heterochromatin blocks were detected in pericentromeric regions and in interstitial region in only one pair of chromosome. The accessory chromosome showed heterochromatic blocks just in the centromeric and terminal regions of the short arm. The C banding was stained with the fluorochromes DAPI and CMA<sub>3</sub> and revealed heterochromatin DAPI<sup>+</sup> in the pericentromeric and terminal regions in cytotype I; in cytotype II and III were observed terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> bands on one chromosome pair and terminal markings DAPI<sup>+</sup> in some chromosomes. The accessory chromosome heterochromatin terminal is GC rich. In cytotype IV were observed signals CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> in the interstitial and terminal regions and DAPI<sup>+</sup> in the centromeric and terminal region of some chromosomes. The nucleolar organizer regions (NORs) identified by silver nitrate impregnation, were multiple in the cytotypes I, III and IV, with inter and intra individual variation in cytotype I and III and an interindividual variation were found in cytotype IV. In the cytotype II was observed the presence of only one pair of chromosomes bearing AgNOR sites. Staining with the fluorochrome chromomycin A<sub>3</sub> showed signs CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> in the terminal region in the cytotypes I, II and III, with variations inter and intra individual, some sites were coincident with the NORs. In cytotype IV was observed more sites CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> than in the other cytotypes, and one pair of chromosomes showed interstitial markings coincident with the heterochromatin. *In situ* hybridization with 18S rDNA probe revealed, in cytotype I, four chromosomes bearing 18S ribosomal sites, which were coincident with the sites AgNOR. Cytotype II was confirmed the simple system of RON. In cytotype III six chromosomes were marked, with some correspondence with AgNOR and higher coincidence with the signals CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Two chromosomes in cytotype IV showed fluorescent signals, coincident with the NORs. The chromosomal polymorphism observed among the specimens of *Bryconamericus ecai* and the data found in the literature reveals that chromosomal rearrangements, especially pericentric inversions, had an important role in karyotype evolution of this group of fish, showing that its development was divergent. It's also possible infer that there is more than one species of *Bryconamericus* living in sympatry in the Forquetinha river/RS.

**Keywords:** Characidae. Cytotypes. Heterochromatic composition. NOR. Fluorochromes. FISH.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – a) Exemplar de *Bryconamericus ecai* e b) local de coleta - rio Forquetinha, sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS ..... 31
- Figura 2** – Cariótipos de *Bryconamericus ecai*: (a) citótipo I; (b) citótipo II; (c) citótipo III; (d) citótipo IV. Em (c) cromossomo extra evidenciado no box; em (a), (b) e (c) o primeiro par de cromossomos metacêntricos com heteromorfismo de tamanho nos citótipos I, II e III, evidenciados nos boxes..... 32
- Figura 3** – Metáfases somáticas dos diferentes citótipos de *Bryconamericus ecai*, submetidas à técnica de banda C: a-d) coradas com Giemsa; e-h) coradas com CMA<sub>3</sub>; i-l) coradas com DAPI. Em (c) cromossomo B parcialmente heterocromático, com heterocromatina terminal e pericentromérica, representado no box; em (g) e (k) cromossomo acessório, no box, com heterocromatina terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>, respectivamente. As setas em (b) e (c) indicam cromossomos portadores dos sítios AgRONS nos citótipos II e III; as setas em (f) e (g) indicam os sítios AgRONS, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e DAPI em (j) e (k); e as cabeças de setas em (h) indicam cromossomos com heterocromatina intersticial no citótipo IV, sendo positivas para os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI em (h) e (l) respectivamente.. ..... 33
- Figura 4** – Cromossomos de *Bryconamericus ecai* submetidos à impregnação de AgNO<sub>3</sub>, hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S e fluorocromo CMA<sub>3</sub>, representando os quatros citótipos. Em (a), (b), (c) variabilidade de sítios AgRONS, DNAr18S e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> no citótipo I, respectivamente. No citótipo III (g, h, i) e citótipo IV (j, k, l) variabilidade destes mesmos sítios. Em (d), (e), (f) correspondência de 1 par AgRON, DNAr 18S e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> no citótipo II e em (f) evidência de variabilidade de sítios CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>..... 34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE .....	9
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>BRYCONAMERICUS</i> .....	10
1.3 CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS SOBRE O GÊNERO <i>BRYCONAMERICUS</i> .....	10
1.4 SISTEMA HIDROGRÁFICO DA LAGUNA DOS PATOS .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	16
<b>OCORRÊNCIA SIMPÁTRICA DE QUATRO CITÓTIPOS E CROMOSSOMO B EM <i>BRYCONAMERICUS</i> ECAI SILVA, 2004 (CHARACIDAE): POLIMORFISMO DE DNAR 18S E COMPOSIÇÃO DE HETEROCROMATINA</b> .....	17
RESUMO .....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO .....	23
REFERÊNCIAS .....	26
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE

A família Characidae destaca-se dentro da ordem Characiformes, por representar o maior grupo de peixes de água doce da América do Sul, possuindo 1352 espécies, sendo 952 válidas e 400 ainda não descritas (REIS et al., 2003). Compreende membros de porte diversificado, desde pequenos (“mato-grosso”, “piaba”, etc) a grandes (“dourado”, “pacu”, etc), e encontram-se distribuídos em vários ambientes da região Neotropical (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Espécies de Characidae ocorrem desde o sudoeste do Texas nos Estados Unidos até as regiões de clima ameno da Argentina e do Chile. Embora a família não seja exclusiva de riachos, seus membros formam o principal conjunto desse habitat, sendo frequentes nos riachos do sudeste do Brasil espécies de *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Cheirodon*, *Bryconamericus*, *Deuterodon* e *Hollandichthys* (BUCKUP, 1999).

Além da grande variação no porte das espécies, também podem apresentar inúmeros tipos de hábitos alimentares, estratégias reprodutivas, padrões comportamentais, preferências de habitats, padrões de colorido e variações morfológicas de toda natureza, o que a caracteriza como a família mais heterogênea dentro dos peixes neotropicais. Muitas espécies têm importância na pesca comercial e esportiva e outras são amplamente utilizadas por aquarofilistas (GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

O amplo número de espécies que constituem a família Characidae compreendem diferentes subfamílias, muitos gêneros eram incluídos na subfamília Tetragonopterinae. Entretanto, por não existirem evidências de que esta subfamília fosse monofilética, Lima et al. (2003), listaram 88 desses gêneros como sendo do grupo *Incertae Sedis*, incluindo 620 espécies. Dentre estes gêneros estão *Hyphessobrycon*, *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Hemigrammus* e *Bryconamericus*. Atualmente, a subfamília Tetragonopterinae é composta por apenas duas espécies *Tetragonopterus argenteus* e *Tetragonopterus chalceus* (REIS et al., 2003).

## 1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *BRYCONAMERICUS*

O gênero *Bryconamericus* é um dos menos diversificados da família Characidae, com ampla distribuição na América Central e do Sul (VARI; SIEBERT, 1990), sendo pouco conhecido taxonomicamente e constituído por 51 espécies de acordo com Lima et al. (2003). Posteriormente, outras cinco espécies foram descritas: *B. ecai* e *B. patriciae*, Silva, 2004 do Sul do Brasil, *B. turiuba*, Langeani, Lucena, Pedrini e Tarelho-Pereira, 2005 da bacia do alto Rio Paraná, Brasil, *B. cinarucoense* n. sp. e *B. singularis* n. sp. Román-Valencia, Taphorn e Ruiz-C, 2008, rio Cianuroco, Venezuela, aumentando, assim, para 56 espécies válidas. As espécies deste gênero são muito semelhantes entre si, diferindo apenas em pequenos detalhes, sendo que os padrões de coloração são invariáveis.

Oriccoli e Bennemann (2006), estudando a dieta de *Bryconamericus iheringii* (Boulenger, 1887) em riachos da bacia do Rio Tibagi/PR, verificaram que esta espécie alimenta-se em toda a coluna de água: na superfície consome sementes e insetos terrestres; no meio, algas filamentosas; e no fundo, detritos e quironomídeos, ingerindo junto, sedimento em grande quantidade.

Segundo Silva (2004), *Bryconamericus* é um gênero polifilético com muitos grupos de espécies. Este autor reconheceu três grupos de espécies na América do Sul, baseado principalmente na posição e forma dos dentes maxilares: grupo *exodon* que inclui *B. exodon* Eigenmann, 1907 e *B. stramineus* Eigenmann, 1908 e ocorrem no sistema rio Paraná – Paraguai, rio São Francisco e sistema do rio Uruguai; grupo *microcephalus* composto por *B. ornaticeps* Bizerril e Peres-Neto, 1995 e *B. tenuis* Bizerril e Auraujo, 1992 estas espécies ocorrem em rios costeiros do Atlântico entre o Paraná e o Estado do Rio de Janeiro e o grupo *iheringii* incluindo todas as espécies encontradas na região sul da América do Sul, sendo que *B. patriciae* e *B. ecai* pertencem a este último grupo.

## 1.3 CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS SOBRE O GÊNERO *BRYCONAMERICUS*

Neste grupo de peixes existem poucos dados citogenéticos, entretanto, o número diplóide 52 parece ser relativamente característico no gênero *Bryconamericus*, sendo que a única espécie que apresentou  $2n=54$  foi *Bryconamericus* sp. E, analisada por Wasko e

Galetti Jr. (1998), com significativas variações na macro e microestrutura cariotípica neste grupo de peixes.

Wasko e Galetti Jr. (1998) estudaram quatro espécies de *Bryconamericus* sp. e todas apresentaram diferentes fórmulas cariotípicas, sendo que *Bryconamericus* sp. B do rio Piracicaba/SP apresentou dois citótipos.

Paintner-Marques et al. (2002a) estudando *Bryconamericus* aff. *exodon*, coletados no Ribeirão Três Bocas/PR, também encontraram dois citótipos e observaram, no citótipo II, um heteromorfismo de tamanho no primeiro par de cromossomos metacêntricos, em alguns indivíduos. Segundo estes autores estas variações podem estar relacionadas a rearranjos cromossômicos, tais como inversões pericêntricas, que parecem exibir um importante papel na evolução cariotípica deste grupo de peixes.

Diferentes populações de *Bryconamericus* aff. *iheringii* foram analisadas por diversos autores e variações nas fórmulas cariotípicas tanto inter quanto intrapopulacionais foram observadas (Paintner-Marques et al., 2003; Capistano et al., 2008; Portela-Castro et al., 2008; Eberhardt et al., 2008 e Silva et al., 2010).

Portela-Castro et al. (2008) e Capistano et al. (2008) estudando esta espécie do rio Keller/PR encontraram dois citótipos. Variação maior foi observada em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do ribeirão Três Bocas/PR, onde Eberhardt (2008) encontrou quatro citótipos e, mais recentemente, Silva (2010) encontrou nesta mesma população mais outros dois citótipos. Eberhardt (2008), sugere que a existência de 4 citótipos em *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do ribeirão Três Bocas, devido a ocorrência de rearranjos do tipo inversões pericêntricas.

As espécies do gênero *Bryconamericus* apresentam padrões específicos de banda C, mostrando uma variabilidade na localização da heterocromatina, como observado por Wasko e Galetti Jr. (1998) em cinco populações de *Bryconamericus* sp. com blocos heterocromáticos distribuídos em regiões intersticiais, teloméricas e/ou centroméricas, sendo que uma delas apresentou pelo menos quatro braços de diferentes cromossomos, inteiramente heterocromáticos.

Paintner-Marques et al. (2003) analisando *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do rio Água da Floresta/PR, observaram blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas e teloméricas na maioria dos cromossomos. Portela-Castro et al. (2008), analisando esta mesma espécie do rio Keller/PR, detectaram a heterocromatina nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, em ambos citótipos, no entanto, as marcações teloméricas foram

mais evidentes em alguns pares cromossômicos. Com a utilização da técnica de banda-G com tripsina nesta mesma população, Portela-Castro et al. (2008), observaram várias bandas em regiões intersticiais de diferentes cromossomos do citótipo I e, no citótipo II, foram evidenciadas marcações no braço curto e/ou longo de vários pares cromossômicos e, ainda, algumas marcações intersticiais. Também foi evidenciado pelos mesmos autores um padrão de banda-R por incorporação de 5-BrdU, nos cromossomos do citótipo II de *Bryconamericus* aff. *iheringii*. Esse padrão mostrou, em algumas metáfases, o par 6 (submetacêntrico) heterocromático no braço curto (banda-C positivo) correspondente à região tardia de replicação.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) também são bastante variáveis neste grupo de peixes, podendo apresentar variações intra e interindividuais no número e localização de sítios de DNA ribossômicos, caracterizando *Bryconamericus* como um grupo com RONs múltiplas, como pode ser observado na tabela 1. Entretanto, em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Água da Floresta e do córrego Tatupeba, analisadas por Paintner-Marques et al. (2003) e por Capistano et al. (2008), respectivamente, foi evidenciado um sistema de RON simples.

Em *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do ribeirão Três Bocas, população estudada recentemente por Eberhardt (2008) e Silva (2010) foram encontrados tanto o sistema de RONs simples quanto o de RONs múltiplas entre os citótipos. Esta variabilidade de RONs entre os diferentes citótipos e mesmo dentro deles, segundo Eberhardt (2008), poderia sugerir a ocorrência de duas espécies diferentes de *Bryconamericus* vivendo em simpatria no mesmo local.

Fluorocromos base-específicos, tanto mitramicina como a cromomicina A<sub>3</sub> já foram utilizados em preparações cromossômicas do gênero *Bryconamericus*, para observação de regiões ricas em GC. Wasko (1996) analisando 5 espécies de *Bryconamericus* observou que as RONs eram positivas para o fluorocromo mitramicina, exceto em *Bryconamericus* sp. E. Paintner-Marques et al. (2002b, 2003) analisando *Bryconamericus* aff. *exodon* e *Bryconamericus* aff. *iheringii* observaram marcações fluorescentes CMA<sub>3</sub> positivas coincidentes com os cromossomos AgRONs.

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência, com sonda de DNAr 18S, utilizada por Paintner-Marques et al. (2002b, 2003) em *Bryconamericus* aff. *exodon* e *Bryconamericus* aff. *iheringii*, respectivamente, evidenciaram oito marcações teloméricas na primeira espécie, comprovando um sistema de RONs múltiplas e confirmou a presença de

apenas um par de cromossomos com cístrons ribossômicos na segunda espécie. Capistano et al. (2008) encontraram na população de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do córrego Maringá citótipo I, seis sítios fluorescentes do qual quatro corresponderam aos cromossomos AgRONS e na população do rio Kelller citótipo II, a FISH revelou dez sítios ribossômicos que incluíram marcações AgRONS. Os mesmos autores observaram na população do córrego Tatupeba citótipo III, apenas dois sinais fluorescentes confirmando um par AgRON.

A ocorrência de diferentes fórmulas cariotípicas (citótipos) e polimorfismos de RONS no gênero *Bryconamericus*, principalmente em *Bryconamericus* aff. *iheringii*, revelam que rearranjos cromossômicos tem tido um importante papel na evolução cariotípica neste gênero, mas que também é necessário um estudo taxonômico mais detalhado deste grupo de peixes e os dados citogenéticos constituem um importante instrumento para o estabelecimento de possíveis semelhanças entre as espécies deste gênero com outros caracídeos.

#### 1.4 SISTEMA HIDROGRÁFICO DA LAGUNA DOS PATOS

O Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos/RS, que é o local de coleta deste estudo, é a maior laguna litorânea localizada na América do Sul (TOLDO et al., 2006), estendendo-se por aproximadamente 240km com uma largura média de 40km, localizada paralelamente à costa Atlântica do estado do Rio Grande do Sul. A única saída para o Oceano Atlântico fica situada no extremo meridional da laguna, na cidade de Rio Grande. A Laguna dos Patos recebe uma contribuição de água doce de uma área de drenagem que cobre a metade do Estado do Rio Grande do Sul (TOLDO et al., 2006). As bacias do Lago Guaíba e, em um menor grau, a do rio Camaquã, são as fontes primárias de entrada de água (IRGANG et al., 2009).

De acordo com Carvalho et al. (2005), a grande dimensão da Laguna dos Patos e sua conexão com o mar fazem dela um recurso hídrico importante, sendo um local de refúgio e reprodução de diversas espécies de animais, sendo também utilizada para o turismo, lazer, entre outras atividades. Segundo Hartmann e Svaldi (2002), a pesca camaroeira na Laguna dos Patos é uma das atividades de maior importância econômica da região.

Arroios e riachos, como os encontrados no sistema da Laguna dos Patos, foram ressaltados por autores como Pessano et al. (2005), Azevedo et al. (2003), por serem

locais de reprodução de espécies que habitam leitos maiores de rios. Apesar da grande importância desse sistema hidrográfico muitos rios ou mesmo micro-bacias ainda não são estudadas e provavelmente estes locais abriguem novas espécies e informações importantes do ponto de vista científico (Ribeiro e Köhler, 2007).

Estudos citogenéticos foram recentemente iniciados neste local em alguns grupos de peixes como na família Pimelodidae, por Treco et al. (2008) que analisaram espécimes de *Pimelodus maculatus* e *Parapimelodus nigribarbis*; na família Characidae Rosa et al. (2009) e Pacheco et al. (2010) analisaram *Astyanax laticeps* e *Astyanax jacuhiensis*, respectivamente; na família Cichlidae Pires et al. (2010) realizaram estudos com *Geophagus brasiliensis*, *Gymnogeophagus gymnogenys* e *G. labiatus*; e na família Loricariidae Maia et al. (2010) estudaram exemplares de *Rineloricaria cadeae* e *R. strigilata*. Até o momento não existe nenhum dado citogenético no gênero *Bryconamericus* da Laguna dos Patos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização citogenética de peixes da espécie *Bryconamericus ecai*, coletados no Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos/RS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- analisar e comparar os diferentes cariótipos de *Bryconamericus ecai*;
- detectar as regiões organizadoras de nucléolos (RONS)
- analisar a distribuição e a composição de bases da heterocromatina;
- identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases G-C e A-T;
- localizar os cístrons ribossômicos 18S;
- contribuir com mais dados citogenéticos sobre este grupo de peixes para um melhor entendimento de suas relações evolutivas.

## **CAPÍTULO 1**

**OCORRÊNCIA SIMPÁTRICA DE QUATRO CITÓTIPOS E CROMOSSOMO  
EXTRA EM *BRYCONAMERICUS ECAI* SILVA, 2004 (CHARACIDAE):  
POLIMORFISMO DE DNAR 18S E COMPOSIÇÃO DE HETEROCROMATINA**

\* Este artigo será enviado à revista Micron

• **OCORRÊNCIA SIMPÁTRICA DE QUATRO CITÓTIPOS E CROMOSSOMO EXTRA EM *BRYCONAMERICUS ECAI* SILVA, 2004 (CHARACIDAE): POLIMORFISMO DE DNAR 18S E COMPOSIÇÃO DE HETEROCROMATINA**

Angélica Rossotti dos Santos<sup>1</sup>, Marceléia Rubert<sup>2</sup>, Lucia Giuliano-Caetano<sup>1</sup> e Ana Lúcia Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

### Resumo

No presente estudo foram analisados citogeneticamente exemplares de *Bryconamericus ecai* Silva, 2004 coletados no rio Forquetinha/RS, sendo evidenciada uma ampla diversidade cariotípica nesta espécie. Todos os indivíduos apresentaram  $2n=50$ , com diferentes fórmulas cariotípicas, resultando em quatro citótipos, sendo observado um macrocromossomo B no citótipo III. A heterocromatina foi visualizada distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos nos 4 citótipos e também em um par com marcação intersticial no citótipo IV. A coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI revelou banda C rica em pares de bases AT nos citótipos I, II e III, sendo observado um par com heterocromatina GC rica nos citótipos II e III. O citótipo IV apresentou heterocromatina CMA<sub>3</sub> e DAPI positivas. A impregnação pelo nitrato de prata, a hibridação *in situ* e a coloração por fluorocromos evidenciou um sistema múltiplo de sítios AgRONS, DNAr 18S e CMA<sub>3</sub>, respectivamente, nos citótipos I, III e IV, com variabilidade tanto inter quanto intraindividual no número e localização destes sítios. O citótipo II apresentou apenas um par AgRON coincidente com o DNAr 18S e CMA<sub>3</sub>, indicando um sistema simples. O presente trabalho corrobora com os demais autores quanto a variabilidade cariotípica deste grupo de peixes e com os dados citogenéticos observados em *Bryconamericus ecai*, pode-se inferir que provavelmente esteja ocorrendo mais de uma espécie, vivendo em simpatria, no rio Forquetinha/RS.

**Palavras-chaves:** Bandamento cromossômico. Citogenética. FISH. Variabilidade cariotípica.

## INTRODUÇÃO

De acordo com Lima et al. (2003), o gênero *Bryconamericus* é pouco conhecido taxonomicamente e inclui 51 espécies válidas que habitam uma variedade de ecossistemas de água doce em toda América Central e do Sul. Posteriormente, outras cinco espécies foram descritas: *B. ecai* e *B. patriciae* Silva, 2004 do Sul do Brasil, *B. turiuba* Langeani, Lucena, Pedrini e Tarelho-Pereira, 2005 da bacia do alto Rio Paraná, Brasil, *B. cinarucoense* n. sp. e *B. singularis* n. sp Román-Valencia, Taphorn e Ruiz-C, 2008, rio Cianuroco, Venezuela, totalizando 56 espécies descritas, até o momento.

Silva (2004) reconheceu três grupos de *Bryconamericus* na América do Sul, baseando-se, principalmente, na posição e forma dos dentes maxilares: grupo *exodon* que inclui *B. exodon* Eigenmann, 1907 e *B. stramineus* Eigenmann, 1908 e ocorrem no sistema rio Paraná – Paraguai, rio São Francisco e sistema do rio Uruguai; grupo *microcephalus* composto por *B. ornaticeps* Bizerril e Peres-Neto, 1995 e *B. tenuis* Bizerril e Auraujo, 1992, que ocorrem em rios costeiros do Atlântico entre o Paraná e o Estado do Rio de Janeiro e o grupo *iheringii* incluindo todas as espécies encontradas na região sul da América do Sul, sendo que *B. patriciae* e *B. ecai* pertencem a este último grupo.

O número diplóide 52 parece ser relativamente característico no gênero *Bryconamericus*, apesar de existirem poucos dados citogenéticos, com uma única exceção, *Bryconamericus* sp. E, analisada por Wasko e Galetti Jr. (1998), que possui  $2n=54$ , sendo significativas as variações estruturais neste grupo de peixes (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

As espécies do gênero *Bryconamericus* apresentam padrões específicos de banda C, mostrando uma variabilidade na localização da heterocromatina, sendo evidenciadas em regiões intersticiais, teloméricas e/ou centroméricas (Wasko e Galetti Jr. 1998; Paintner-Marques et al., 2003; Capistano et al., 2008; Portela-Castro et al., 2008).

A ocorrência de múltiplas regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) é característico do gênero *Bryconamericus* (Wasko et al., 1996; Wasko e Galetti Jr., 1999; Paintner-Marques et al., 2002a; Capistano et al., 2008) entretanto, RONS simples já foram evidenciadas em duas populações de *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Boulenger, 1887) por Paintner-Marques et al. (2003) e Capistano et al. (2008).

A coloração com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, GC específico, foi realizada por Paintner-Marques et al. (2002b, 2003) em preparações cromossômicas de *Bryconamericus* aff. *exodon* e *Bryconamericus* aff. *iheringii*, respectivamente, evidenciando marcações

fluorescentes coincidentes com as AgRONS. Estes mesmos autores, utilizando a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência com sonda de DNAr 18S, confirmaram um sistema múltiplo e simples de RONS nestas mesmas espécies, assim como Capistano et al. (2008) analisando três outras populações de *Bryconamericus aff. iheringii*.

Devido a grande variabilidade cromossômica observada neste grupo de peixes o objetivo deste trabalho foi analisar as características citogenéticas convencionais e moleculares de uma população de *Bryconamericus ecai*, visando contribuir com mais informações para o esclarecimento da evolução cariotípica neste gênero.

## MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram analisados 13 indivíduos de *Bryconamericus ecai* Silva, 2004, sendo 5 machos, 6 fêmeas e 2 de sexo indefinido, (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**a) coletados no rio Forquetinha/RS (29°24'22.4"S/52°03'19.2"W), pertencente ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS (figura 1b).

### ***Coloração convencional:***

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a técnica de obtenção direta (Bertollo et al., 1978) e corado com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8). A estimulação mitótica foi realizada através da injeção prévia, nos animais, de solução de fermento biológico, descrita por Lee e Elder (1980). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), como comumente utilizado em peixes (Bertollo et al., 1983; Morelli et al., 1983; Portela et al., 1988, entre outros). O número fundamental (NF) foi calculado considerando os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço.

### ***Bandamento cromossômico:***

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (RONS) foram detectadas pela impregnação com nitrato de prata (Howell e Black, 1980). O padrão de distribuição da

heterocromatina foi determinado de acordo com a técnica de banda C com Giemsa após tratamentos com HCL 0.1 M, Ba (OH)<sub>2</sub> e 2XSSC (Sumner, 1972) e com formamida 50%, substituindo o Ba(OH)<sub>2</sub> da técnica anterior (Fernández et al., 2002). As bandas ricas em G-C e A-T foram detectadas com Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), respectivamente, de acordo com Schweizer (1980). As lâminas foram coradas com 0.5 mg/mL CMA<sub>3</sub> por 1 hora, lavadas em água destilada e sequencialmente coradas com 2µg/mL DAPI por 15 minutos. As lâminas foram montadas com um meio composto de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7.0) 1:1, mais 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

### **Hibridação Fluorescente in situ (FISH):**

A Hibridação Fluorescente *in situ* foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986), com modificações. A sonda de DNAr 18S foi obtida a partir de *Prochilodus argenteus* (Prochilodontidae) Spix & Agassiz, 1829 (Hatanaka e Galetti Jr., 2004), foi marcada com biotina-14-dATP por *nick translation*. As lâminas foram tratadas com 50 µL de mistura de hibridação contendo 100 ng de sonda marcada (7,5 µL), formamida 50% (30 µL), sulfato de dextrano 50% (12 µL), 20xSSC (10,5 µL). O mix de hibridação foi denaturado a 80°C, por 10 minutos e a hibridação foi realizada *overnight* a 37°C em câmara úmida. Após a hibridação as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 5 minutos, em 1 x PBS e 1 x PBD (20xSSC, Triton 100, leite em pó desnatado e água destilada qsp 100; pH 7,0), todos a 45°C. A detecção do sinal foi feita utilizando 5 µL de FITC (1:100) e 45 µL de BSA (5%) e para amplificar o sinal foi utilizado 40 µL de solução de amplificação (1,0 µL anti-avidina-biotina conjugada e 39 µL de 1xPBD). As lâminas foram montadas com 25 µL da solução de DABCO (1,4-diazabicyclo (2.2.2)- octane (2,3%), 20 mM Tris HCl, pH 8.0, (2%) e glicerol (90%), em água destilada), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM e 1 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL). As imagens foram obtidas com o fotomicroscópio Leica DM 4500 B, equipado com câmera DFC 300FX e o *software* 4.0 Leica IM50.

## RESULTADOS

### **Coloração Convencional**

Todos os indivíduos analisados de *Bryconamericus ecai* apresentaram número diplóide igual a 52 entretanto, foram observadas diferentes fórmulas kariótípicas, caracterizando 4 citótipos: citótipo I com  $10m+10sm+8st+24a$  e número fundamental (NF) igual a 80, observado em 3 exemplares (23%), sendo dois machos e uma fêmea (**Erro! Fonte de referência não encontrada.a**); citótipo II com  $10m+14sm+12st+16a$  e NF=88, observado em 4 exemplares (31%), 2 machos, 1 fêmea e 1 indeterminado (**Erro! Fonte de referência não encontrada.b**); citótipo III com  $14m+12sm+8st+18a$  e NF=86, em 4 exemplares (31%), 2 fêmeas, 1 indeterminado, 1 macho (**Erro! Fonte de referência não encontrada.c**) e citótipo IV com  $10m+24sm+14st+4a$  e NF=100, em 2 exemplares (15%), 2 fêmeas, (**Erro! Fonte de referência não encontrada.d**).

Foi observada uma diferença de tamanho entre os cromossomos homólogos do primeiro par metacêntrico nos citótipos I, II e III, como destacado na figura 2 a, b e c.

Em um espécime de *Bryconamericus ecai* do citótipo III foi detectado um cromossomo acessório de tamanho grande, do tipo submetacêntrico, em 26 das 32 metáfases analisadas perfazendo 80% (**Erro! Fonte de referência não encontrada.c**– box).

### **Banda C corada com Giemsa e fluorocromos**

A heterocromatina em *Bryconamericus ecai* foi localizada na região pericentromérica da maioria dos cromossomos nos citótipos I, II e III (**Erro! Fonte de referência não encontrada.a, b e c**). O cromossomo acessório observado no citótipo III, apresentou heterocromatina na região pericentromérica e terminal do braço curto na coloração com Giemsa, (**Erro! Fonte de referência não encontrada.c** - box). No citótipo IV foram evidenciados blocos heterocromáticos em algumas regiões pericentroméricas e terminais e intersicial dos cromossomos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.d**).

Pela coloração do bandamento C com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI foi possível evidenciar heterocromatina DAPI<sup>+</sup> nas regiões pericentroméricas e terminais da maioria dos cromossomos do citótipo I (**Erro! Fonte de referência não encontrada.i**); no citótipo II foram observadas bandas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal do braço curto de um par de cromossomos, provavelmente correspondente às RONS, e marcações DAPI<sup>+</sup> pericentroméricas na região terminal do braço curto e longo de vários cromossomos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.f e 3j**); no citótipo III marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> foram evidenciadas na porção terminal do braço curto de um par de cromossomos e DAPI<sup>+</sup> na região

pericentromérica de alguns cromossomos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.g** e 3k), no cromossomo acessório foi observada apenas marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região terminal do braço curto e no citótipo IV foram observados sinais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em dois pares de cromossomos na região terminal do braço curto e em um par de cromossomos na região intersticial (**Erro! Fonte de referência não encontrada.h** – cabeça de setas); neste citótipo também foi possível observar sinais DAPI<sup>+</sup> na região pericentromérica de alguns cromossomos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.l**).

### **Regiões organizadoras de nucléolos, FISH e fluorocromos**

Os exemplares analisados neste trabalho apresentaram variação quanto ao tipo cromossômico e localização das RONS nos quatro citótipos. No citótipo I foram observadas de 2 a 4 RONS com variação inter e intraindividual, localizadas na porção terminal do braço curto de cromossomos meta, submeteta, subtelo e acrocêntricos e no braço longo de um cromossomo submetacêntrico, com um total de 9 cromossomos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.a**).

No citótipo II foi observado apenas um par de cromossomos subteloacêntricos marcados pela prata, na região terminal do braço curto (**Erro! Fonte de referência não encontrada.d**).

No citótipo III foram observadas de 2 a 3 AgRONS, com variação inter e intraindividual, na porção terminal do braço curto de um cromossomo metacêntrico de tamanho grande, um cromossomo metacêntrico de tamanho médio e um cromossomo subteloacêntrico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.g**).

No citótipo IV houve apenas variação interindividual de 2 a 3 AgRONS na porção terminal do braço curto de um par de cromossomos metacêntricos e um cromossomo subteloacêntrico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.j**).

No citótipo I a hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S revelou, em todas as metáfases analisadas, quatro cromossomos portadores dos cístrons ribossômicos, localizados na região terminal do braço curto de um par de cromossomos metacêntricos e em um cromossomo acrocêntrico e no braço longo de um cromossomo submetacêntrico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.b**).

No citótipo II apenas um par de cromossomos portadores dos sítios ribossômicos 18S foi observado (**Erro! Fonte de referência não encontrada.e**).

No citótipo III foi possível visualizar até seis cromossomos portadores do DNAr 18S, com variação intra e interindividual, sendo um cromossomo metacêntrico, um submetacêntrico, um subtlocêntrico e um par acrocêntrico na porção terminal do braço curto e um cromossomo metacêntrico na região terminal do braço longo (**Erro! Fonte de referência não encontrada.h**).

No citótipo IV dois cromossomos apresentaram sinais fluorescentes, sendo um cromossomo metacêntrico e um subtlocêntrico, ambos na região terminal do braço curto (**Erro! Fonte de referência não encontrada.k**).

A coloração CMA<sub>3</sub>, evidenciou um maior número de marcações positivas em relação às AgRONS nos citótipos II, III e IV, com variação tanto intra quanto interindividual nas diferentes fórmulas cariotípicas. No citótipo I foram observadas marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> no braço curto de um par de cromossomos metacêntricos, um cromossomo subtlocêntrico e um acrocêntrico e em ambos os braços de um cromossomo submetacêntrico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.c**).

No citótipo II marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> foram visualizadas no braço curto de um par de cromossomos subtlocêntricos e um par de acrocêntricos e marcação terminal no braço longo de um cromossomo metacêntrico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.f**).

No citótipo III também foram visualizadas marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> no braço curto de um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio e em um par de cromossomos subtlocêntricos, no braço longo de um cromossomo submetacêntrico grande e em ambos os braços de um cromossomo metacêntrico e de um acrocêntrico grande (**Erro! Fonte de referência não encontrada.i**).

No citótipo IV foram observados até 10 cromossomos com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, sendo 8 com marcações terminais no braço curto e um par com marcação intersticial (**Erro! Fonte de referência não encontrada.l**).

## DISCUSSÃO

O número diplóide de 52 encontrado nos exemplares de *Bryconamericus ecai* do rio Forquetinha é característico do gênero, como já descrito por outros autores (tabela 1), com exceção apenas de *Bryconamericus* sp. E, do córrego Avoadeira/MT, estudado por Wasko e Galetti Jr. (1998), que apresentou 54 cromossomos. Estes mesmos autores acreditam

que  $2n=52$  seja um caráter primitivo no gênero *Bryconamericus* e que tenha ocorrido pelo menos uma fissão cêntrica dando origem ao cariótipo  $2n=54$ .

Calcagnotto et al (2005), analisando sequências de genes nuclear e mitocondrial de alguns Characiformes descreveram o gênero *Knodus*, que possui número haplóide igual a 26 (Scheel, 1973 apud Oliveira et al., 1988), como grupo irmão de *Bryconamericus*, o que poderia suportar a hipótese acima citada, de que  $2n=52$  seja um caráter primitivo neste gênero. Entretanto, Javonillo et al (2010), não corroboram os dados de Calcagnotto et al. (2005), considerando o gênero *Bryconamericus* como um grupo polifilético.

Embora haja conservação no número diplóide de *Bryconamericus*, a ocorrência de citótipos já foi observada por outros autores em diferentes espécies e/ou populações do gênero (Paintner-Marques et al., 2002a; Capistano et al., 2008; Portela-Castro et al., 2008), assim como confirmado no presente estudo. Essa diversidade de fórmula cariotípica leva a mudanças no número fundamental (NF), sugerindo que rearranjos cromossômicos, tais como inversões pericêntricas estejam ocorrendo entre os indivíduos de *B. ecai* ou, até mesmo, que possa ocorrer mais de uma espécie no rio Forquetinha.

Pela observação dos citótipos I, II e III na população estudada pode-se sugerir que o citótipo III ( $14m+12sm+8st+18a$ ) originou o citótipo II a partir de 4 inversões em cromossomos metacêntricos originando dois submetacêntricos e dois acrocêntricos ( $10m+14sm+12st+16a$ ). E o citótipo II teria que sofrer 8 inversões em cromossomos submeta e subtelo-cêntricos dando origem a cromossomos acrocêntricos no citótipo I ( $10m+10sm+8st+24a$ ). No entanto, para originar o IV ( $10m+24sm+14st+4a$ ), todos os outros citótipos teriam que passar por mais de um evento de rearranjo, o que seria pouco provável, portanto este último citótipo, poderia ser considerado como pertencente a uma outra espécie de *Bryconamericus*, que estaria vivendo em simpatria com *B. ecai* no rio Forquetinha.

O heteromorfismo observado no primeiro par de cromossomos metacêntricos de *B. ecai*, nos citótipos I, II e III, também foi encontrado em *Bryconamericus* aff. *exodon* do ribeirão Três Bocas/PR analisada por Paintner-Marques et al. (2002a), que sugeriram que este heteromorfismo pode ter ocorrido devido a uma inversão pericêntrica com a perda de um segmento ou mesmo deleção em um dos homólogos, o que também pode ter ocorrido nos exemplares de *B. ecai*. A ausência desse heteromorfismo nos exemplares do citótipo IV reforça a idéia de que eles sejam uma outra espécie do gênero.

Além das diferenças estruturais encontradas, foi observada a ocorrência de um macrocromossomo acessório em um indivíduo de *Bryconamericus ecai* do citótipo III sendo esta a primeira descrição no gênero. Carvalho et al. (2008) relataram, na família

Characidae, a presença de cromossomos supranumerários ou Bs em 5 gêneros: *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Metynnis*, *Oligosarcus* e *Piabina*, sendo a maior ocorrência no gênero *Astyanax*. A presença deste cromossomo extra em *B. ecai*, somada à ocorrência de citótipos indica uma evolução divergente neste grupo de peixes, confirmando a variabilidade cariotípica em *Bryconamericus*.

O cromossomo acessório de *Bryconamericus ecai* apresentou-se parcialmente heterocromático, em regiões centromérica e terminal, como evidenciado em diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* (Vicente et al., 1996; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997 e Fernandes e Martins-Santos, 2005) e em *Moenkhausia sanctafilomenae* (Portela-Castro et al., 2001), dentro da família Characidae. A heterocromatina terminal deste cromossomo mostrou-se rica em pares de bases GC, após tratamento da banda C com CMA<sub>3</sub>. Poucos são os relatos sobre composição de bases em cromossomos supranumerários, entretanto, Venere et al. (1999), Abucarma e Martins-Santos (2001) e Carvalho et al. (2010) analisando *Leporinus* sp, *Rhamdia branneri* e *Iheringichthys labrosus*, respectivamente, também observaram sinais CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> relacionados à heterocromatina dos cromossomos supranumerários ou Bs nestas espécies.

A variação cariotípica também foi observada levando-se em conta o padrão de distribuição da heterocromatina em *B. ecai*, sendo característico para cada citótipo ou grupos de citótipos. Os citótipos I, II e III são similares entre si, possuindo várias marcações pericentroméricas, enquanto que o citótipo IV apresenta uma quantidade reduzida de heterocromatina. De acordo com Wasko e Galetti Jr. (1998), as espécies do gênero *Bryconamericus* não revelam um padrão na distribuição da heterocromatina e cada espécie pode ser caracterizada por um padrão específico de bandas-C. Portela-Castro et al. (2008) analisando *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Keller/PR, não conseguiram diferenciar os dois citótipos encontrados pelo padrão de bandas-C entretanto, ao utilizarem a técnica de banda G estes autores observaram diferenças entre esses citótipos.

Após a coloração da banda C com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI foi possível observar uma variação maior entre os citótipos em relação à composição da heterocromatina. Os citótipos I e II apresentaram-se bastante semelhantes, com a heterocromatina pericentromérica e terminal da maioria dos cromossomos sendo DAPI+, portanto rica em pares de bases AT; além disso, o citótipo II apresentou um par de cromossomos com heterocromatina terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, coincidente com o par da RON, rica em bases GC.

O citótipo III também apresentou heterocromatina DAPI<sup>+</sup> em porções terminais, mas numa quantidade menor que os citótipos I e II, sendo também observado um par com marcação terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.

O citótipo IV foi o que apresentou maior quantidade de cromossomos com heterocromatina terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e na região intersticial de um par cromossômico, fato este não observado nos outros citótipos; também foi evidenciada heterocromatina DAPI<sup>+</sup> em poucos cromossomos. Portanto, o citótipo IV mostrou a composição da heterocromatina muito diferente dos demais, rica tanto em pares GC quanto AT, reforçando o fato que os exemplares deste citótipo podem pertencer a outra espécie.

No gênero *Bryconamericus* é característica a ocorrência de um sistema de AgRONS múltiplas (tabela 1). Em *B. ecai* do rio Forquetinha foi observada variabilidade de RONS nos citótipos I, III, IV que pode ser decorrente da inatividade dessas regiões na intérfase precedente ou que rearranjos cromossômicos, como transposições e/ou translocações, resultariam na dispersão de genes ribossômicos, como sugerido por Galetti Jr. et al. (1995), Castro et al. (1996) e Mantovani et al. (2000). Esta mesma variabilidade já foi observada em *Bryconamericus* aff. *iheringii* por Capistano et al. (2008) e em *Bryconamericus* aff. *exodon* por Paintner-Marques et al. (2002b).

O citótipo II de *B. ecai* mostrou apenas um par AgNOR, confirmado pela FISH e coincidente com CMA<sub>3</sub>, como evidenciado por Paintner-Marques et al. (2003) em outra população de *Bryconamericus* aff. *iheringii*. As demais marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> observadas podem estar relacionadas à heterocromatina.

Nos citótipos I e III também foi observada uma variabilidade intra e interindividual dos sítios de DNAr 18S e CMA<sub>3</sub>, havendo uma correspondência com as AgRONS, entretanto, nem todos apresentaram homologia e nem todas as RONS mostraram-se presentes após a FISH. O mesmo resultado foi evidenciado no citótipo IV, mas somente variação interindividual, entretanto um maior número de cromossomos com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> foi observado. Ferro et al. (2001) também observaram variabilidade de sítios de DNAr 18S em *Astyanax scabripinnis* e sugeriram que sinais de tamanho pequeno poderiam apresentar baixa fluorescência, não podendo ser detectados ou que diferenças reais poderiam estar ocorrendo entre os indivíduos desta espécie. Estas mesmas hipóteses poderiam explicar a variação tanto de sítios CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e DNAr 18S em *Bryconamericus ecai*.

O acentuado polimorfismo cromossômico observado entre os exemplares de *Bryconamericus ecai* somado aos dados da literatura, demonstram que rearranjos cromossômicos, especialmente inversões pericêntricas, tem um papel importante na evolução

cariotípica deste grupo de peixes, mostrando que sua evolução ocorreu de modo divergente. Pode-se inferir também, que provavelmente esteja ocorrendo mais de uma espécie de *Bryconamericus*, vivendo em simpatria no rio Forquetinha/RS.

### Referências

Abucarma M., Martins-Santos, I.C., 2001. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguazu basin. *Cytologia*. 66(3), 299-306.

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*. 1 (2), 103-120.

Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. 1983. Multiple Sex Chromosomes in the Genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*. 48, 1-12.

Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. 2005. Relationship among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylog. and Evolution*. 36, 135-153.

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.

Carvalho, R.A., Laudicina, A., Giuliano-Caetano, L., Martins-Santos, I.C., Dias, A.L. 2010. Cytogenetic analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). *Braz. J. Biol.* 70(3), 631-636.

Castro, J., Viñas, A., Sánchez, L., Matínez, P. 1996. Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag- and CMA<sub>3</sub>-staining, and fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 75, 234-239.

Fernandes, C.A., Martins-Santos, I.C. 2005. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes os *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). *Genetica*. 124, 301-306.

Fernández, R., Barrágan, M.J.L., Bullejos, M., Marchal, J.A., Díaz De La Guardia, R., Sánchez, A. 2002. New C-band protocol by heat denaturacion in the presence of formamide. *Hereditas*. 137, 145-148.

Ferro, D.A.M., Néo, D.M., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*. 110, 55-62.

Galetti Jr., P.M., Mestriner, C.A., Monaco, P.J., Rasch, E.M. 1995. Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome research*, 3, 285-290.

Hatanaka, T., Galetti Jr., P.M. 2004. Mapping of 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 organizer regions with the protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia*, 36,1014-1015.

Javonillo, R., Malabarba, L.R., Weitzman, S.H., Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. 54, 498-511.

Lee, M.R. e Elder, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenet. Cell. Genect.* 52: 36-40. 1980.

Lima, F.C.T., Malabarba, L.R., Buckup, P.A., Silva, J.F.P., Vari, R.P., Harold, H., Benine, R., Oyakawa, O., Pavanelli, C.S., Menezes, N.A., Lucena, C.A.S., Malabarba, M.C.S.L., Lucena, Z.M.S., Reis, R.E., Langeani, F., Cassati, L., Bertaco, V.A., Moreira, C., Lucinda, P.H.F. 2003. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J.R.C.J. (Eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. 1<sup>st</sup> edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS, pp. 106-169.

Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A., Moreira-Filho, O. 2000. Accentuated polymorfism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*. 109, 161-168.

Mizoguchi, S.M.H., Martins-Santos, I.C. 1997. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas*. 127, 249-253.

Morelli, S., Bertollo, L.A.C., Foresti, F., Moreira-Filho, O., Toledo-Filho S.A. 1983. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. *Caryologia*. 36(3), 235-244.

Paintner-Marques, T.R.P., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. 2002a. Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*. 67, 397-402.

Paintner-Marques, T.R.P., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. 2002b. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas*. 137, 107-112.

Paintner-Marques, T.R.P., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. 2003. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology*. 26(2), 145-149.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2934-2938.

Portela, A.L.B.S., Galetti Jr., P.M., Bertollo, L.A.C. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Rev. Bras. Genetica*. 11, 307-316.

Portela-Castro, A.L.B., Julio-Junior, H. F., Nishiyama, P.B. 2001. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná river of Brazil: Analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*. 110, 277-283.

Portela-Castro, A.L.B., Julio Jr, H.F., Santos, I.C.M., Pavanelli, C.S. 2008. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica*. 133(2), 113-118.

Scheel, J.J. 1973. Fish chromosomes and their evolution. Interval Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark. Apud: Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Britski, H.A., Almeida-Toledo Filho, S.A. 1988. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet.* 11(3), 577-624.

Silva, J.F.P. 2004. Two new species of *Bryconamericus Eigenmann* (Characiformes, Characidae) from Southern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 2, 55-60.

Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 27, 190-193.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75,304-306.

Venere, P.C., Miyazawa, C.S., Galetti Junior, P.M. 1999. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*. 22(3), 345-349.

Vicente, V. E., Moreira-Filho, O., Camacho, J.P.M. 1996. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B Chromosome in *Astyanax scabripinnis*. *Cytogenetic Cell Genet.* 74, 70-75.

Wasko, A.P., Venere, P.C., Galetti Jr., P.M. 1996. Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Brazilian Journal of Genetics*. 19(2), 225-230.

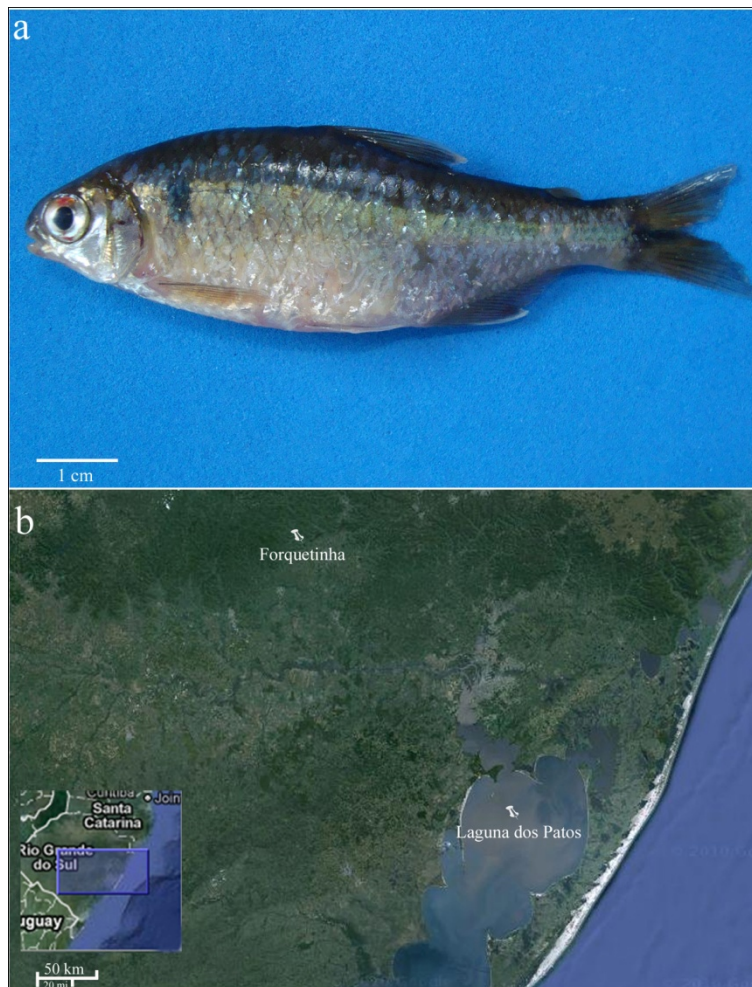
Wasko, A.P., Galetti Jr., P.M. 1998. Karyotype diversity in the neotropical fish (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios.* 94, 185-193.

Wasko, A.P., Galetti Jr., P.M. 1999. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). *Cytologia.* 64, 63-67.

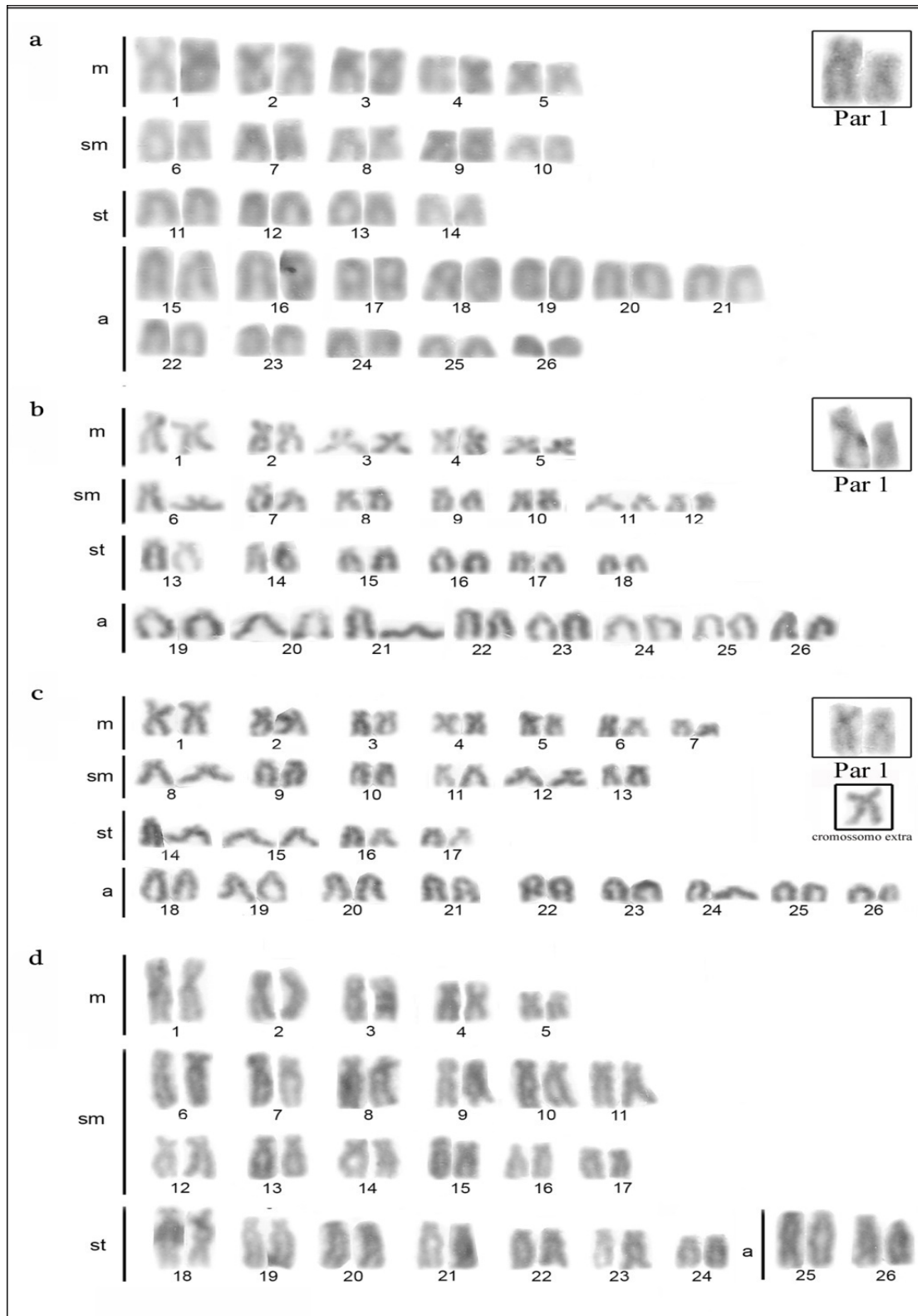
**Tabela 1** – Dados citogenéticos disponíveis no gênero *Bryconamericus* (2n=número diplóide, NF=número fundamental).

Espécie	Local	2n	Fórmula Cariotípica	NF	RON		FISH	Referência
					BC			
<i>B. stramineus</i>	rio Mogi-Guaçu	52	26m/sm+26st/a	78	-	-	-	Portela et al. (1988)
<i>Bryconamericus</i> sp. A	rio Piracicaba	52	6m+30sm+6st+10a	94	c, t	2-3	-	Wasko et al. (1996)
					c, t, i	2-3	-	Wasko e Galetti Jr. (1998, 1999)
<i>Bryconamericus</i> sp. B	rio Piracicaba	52	16m/sm+18st+18a	86	c, t	1-3	-	Wasko et al. (1996)
		52	6m+10sm+20st+16a	88	c, t, i	3-4	-	Wasko e Galetti Jr. (1998, 1999)
<i>Bryconamericus</i> sp. C	ribeirão Três Bocas - rio Tibagi	52	6m+18sm+14st+14a	90	c, t, i	4-6	-	Wasko e Galetti Jr. (1998, 1999)
<i>Bryconamericus</i> sp. D	córrego Avoadeira - rio Garças	52	8m+14sm+16st+14a	90	c, t, i	4	-	Wasko e Galetti Jr. (1998, 1999)
<i>Bryconamericus</i> sp. E	córrego Avoadeira - rio Garças	54	10m+16sm+22st+6a	102	c, t, i	-	-	Wasko e Galetti Jr. (1998)
<i>Bryconameris</i> aff. <i>exodon</i>	ribeirão Três Bocas	52	16m+12sm+6st+18a	86	-	2-5	8	Paintner-Marques et al. (2002a, 2002b)
		52	10m+24sm+6st+12a	92	-	2-5		Paintner-Marques et al. (2002a, 2002b)
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	rio Água da Floresta	52	8m+22sm+10st+12a	92	c, t	1 par	1 par	Paintner-Marques et al. (2003)
	córrego Maringá - rio Paranapanema	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	2-4	6	Capistano et al. (2008)
	rio Keller - rio Ivaí	52	8m+28sm+6st+10a	94	p, t	2-4	10	Capistano et al. (2008)
		52	12m+18sm+8st+14a	90	p, t	-	-	Portela-Castro et al. (2008)
	córrego Tatupeba - rio Ivaí	52	8m+20sm+8st+16a	88		1 par	1 par	Capistano et al. (2008)
<i>B. ecai</i>	rio Forquetinha – Laguna dos Patos	52	10m+10sm+8st+24a	80	t, p	2-4	4	*
		52	10m+14sm+12st+16a	88	P	1 par	1 par	*
		52	14m+12sm+8st+18a	90	P	2-3	6	*
		52	10m+24sm+14st+4a	100	t, p, i	2-3	2	*

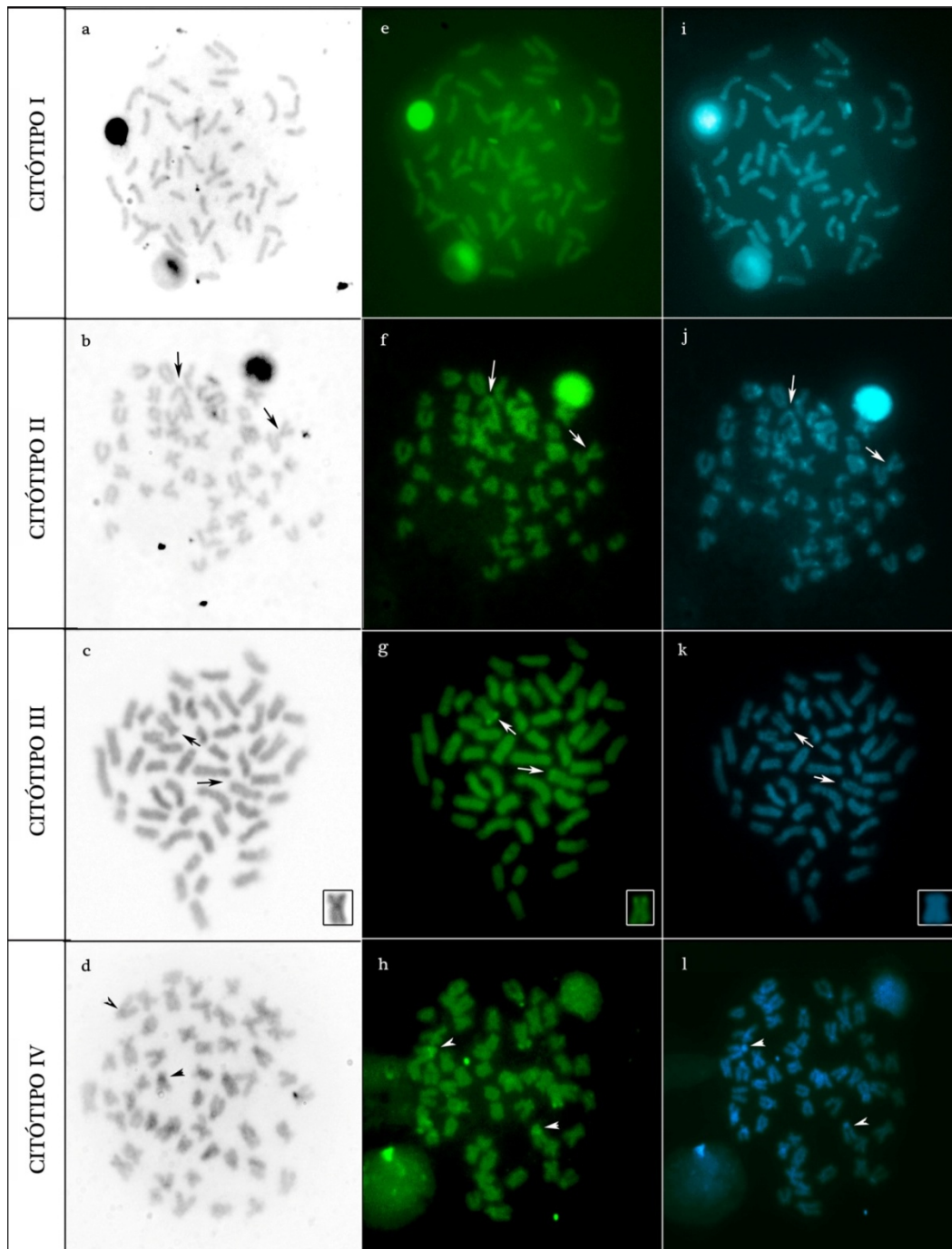
Legenda: c=centromérica; i=intersticial; p=pericentromérica; t=terminal; \*=presente estudo



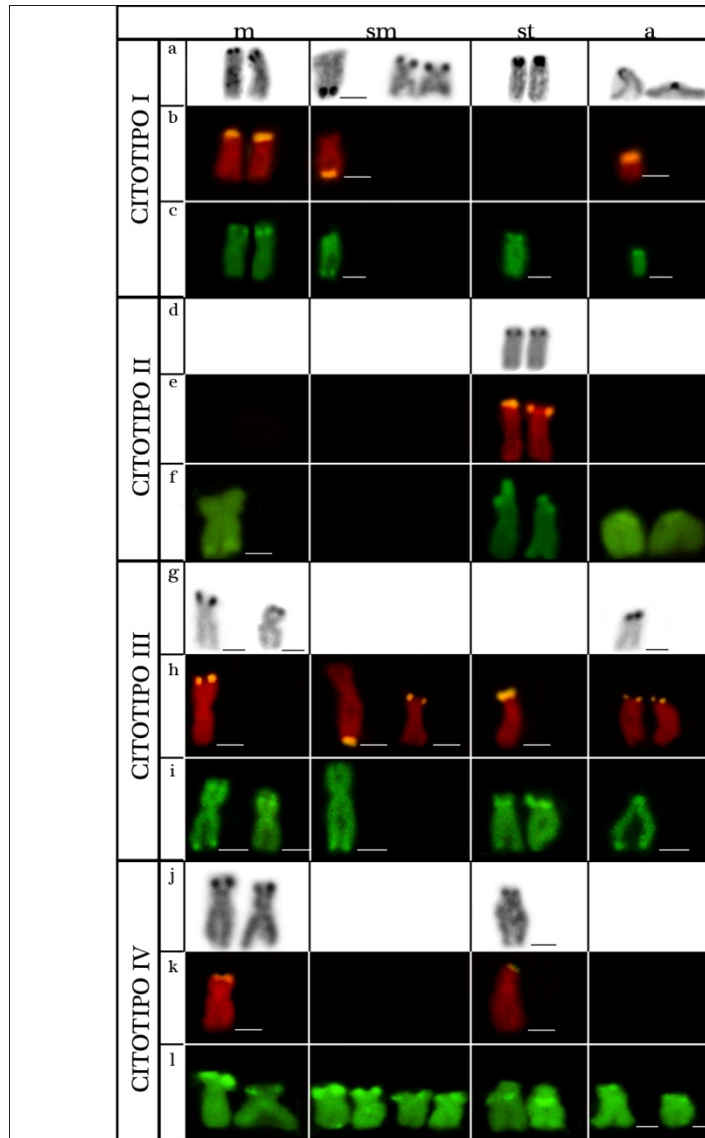
**Figura 1** – a) Exemplar de *Bryconamericus ecai* e b) local de coleta - rio Forquetinha, sistema hidrográfico da Laguna dos Patos/RS.



**Figura 2 –** Cariótipos de *Bryconamericus ecai*: (a) citótipo I; (b) citótipo II; (c) citótipo III; (d) citótipo IV. Em (c) cromossomo extra evidenciado no box; em (a), (b) e (c) o primeiro par de cromossomos metacêntricos com heteromorfismo de tamanho nos citótipos I, II e III, evidenciados nos boxes.



**Figura 3** – Metáfases somáticas dos diferentes citótipos de *Bryconamericus ecai*, submetidas à técnica de banda C: a-d) coradas com Giemsa; e-h) coradas com CMA<sub>3</sub>; i-l) coradas com DAPI. Em (c) cromossomo B parcialmente heterocromático, com heterocromatina terminal e pericentromérica, representado no box; em (g) e (k) cromossomo acessório, no box, com heterocromatina terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, respectivamente. As setas em (b) e (c) indicam cromossomos portadores dos sítios AgRONS nos citótipos II e III; as setas em (f) e (g) indicam os sítios AgRONS, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e DAPI<sup>-</sup> em (j) e (k); e as cabeças de setas em (h) indicam cromossomos com heterocromatina intersticial no citótipo IV, sendo positivas para os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI em (h) e (l) respectivamente.



**Figura 4** – Cromossomos de *Bryconamericus ecai* submetidos à impregnação de  $\text{AgNO}_3$ , hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S e fluorocromo  $\text{CMA}_3$ , representando os quatro citótipos. Em (a), (b), (c) variabilidade de sítios AgRONS, DNAr18S e  $\text{CMA}_3^+$  no citótipo I, respectivamente. No citótipo III (g, h, i) e citótipo IV (j, k, l) variabilidade destes mesmos sítios. Em (d), (e), (f) correspondência de 1 par AgRON, DNAr 18S e  $\text{CMA}_3^+$  no citótipo II e em (f) evidência de variabilidade de sítios  $\text{CMA}_3^+$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Todos os indivíduos de *Bryconamericus ecai* apresentaram número diplóide igual a 52, sendo evidenciados diferentes fórmulas cariotípicas que resultaram em 4 citótipos: citótipo I - 10m+10sm+8st+ 24a e NF=80; citótipo II - 10m+14sm+12st+16a e NF=88; citótipo III - 14m+12sm+12st+14a e NF=90 e citótipo IV - 10m+26sm+12st+4a e NF=100. Tais diferenças podem ser devidas a rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas, exceto o citótipo IV.

2. No citótipo III foi observada a presença de um cromossomo supranumerário de tamanho grande, em um indivíduo e parcialmente heterocromático, sendo esta a primeira descrição para o gênero.

3. A técnica de Banda C + Giemsa evidenciou a presença da heterocromatina na região terminal e pericentromérica de alguns cromossomos nos citótipos I, II e III e heterocromatina pericentromérica, terminal e intersticial no citótipo IV.

4. A técnica de Banda C + fluorocromos possibilitou melhor diferenciação entre os citótipos. O citótipo I apresentou heterocromatina rica em pares de bases AT; os citótipos II e III mostraram um par de cromossomos com heterocromatina CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e a maioria dos cromossomos DAPI<sup>+</sup>; o cromossomo B mostrou somente a heterocromatina terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. O citótipo IV foi o que mais se diferenciou dos demais, apresentando blocos terminais CMA<sub>3</sub> e DAPI positivos e marcações CMA<sub>3</sub> intersticiais.

5. Os citótipos I, III, IV apresentaram variabilidade inter e/ou intraindividual de AgRONS decorrente da inatividade dessas regiões na interfase precedente ou de rearranjos cromossômicos, como transposições e/ou translocações, que resultariam na dispersão dos genes ribossômicos. Nestes mesmos citótipos também foi observada uma variabilidade intra e/ou interindividual dos sítios de DNAr 18S e CMA<sub>3</sub> decorrente da baixa fluorescência dos pequenos sinais destes sítios ou, então, que diferenças reais possam estar ocorrendo entre os exemplares desta população de *Bryconamericus ecai*.

6. O citótipo II de *Bryconamericus ecai* mostrou apenas um par AgRON, confirmado pela FISH e coincidente com CMA<sub>3</sub>. As demais marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> observadas podem estar relacionadas à heterocromatina

7 Os dados obtidos evidenciam uma grande variabilidade cromossômica entre os exemplares de *Bryconamericus ecai*, confirmando que inversões pericêntricas tiveram um papel importante na evolução cariotípica deste grupo de peixes, mostrando que

esta ocorreu de modo divergente. Pode-se inferir também, que esteja ocorrendo mais de uma espécie de *Bryconamericus*, vivendo em simpatria no rio Forquetinha/RS.

## REFERÊNCIAS

- ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguaçú river. **Cytologia**. 66(3): 299-306. 2001.
- AZEVEDO, C.; PESSANO, E.; TOMASSONI, D.; QUEROL, M.V.; QUEROL, E. Diversidade específica, densidade e biomassa da ictiofauna da nascente do arroio Felizardo, bacia do rio Uruguai médio, Uruguaina, RS, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguiana (1): 35-45. 2003.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 1 (2): 103-120. 1978.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Multiple Sex Chromosomes in the Genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**. 48: 1-12. 1983.
- BUCKUP, P.A. Sistemática e Biogeografia de Peixes de Riachos. pp. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO (eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VI. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro. 91-138. 1999.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationship among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylog. and Evolution*. 36, 135-153. 2005
- CASTRO, J.; VIÑAS, A.; SÁNCHEZ, L.; MATÍNEZ, P. Characterization of na atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag- and CMA<sub>3</sub>-staining, and fluorescente *in situ* hibridization. **Cytogenet. Cell Genet**. 75: 234-239. 1996.
- CAPISTANO, T.G.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO JR., H.F. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 31(1): 203-207. 2008.
- CARVALHO, L.; LACERDA, C.; GRIEP, G. Mapa de sensibilidade ambiental da Lagoa dos Patos e região costeira oceânica do Rio Grande do Sul, Brasil: histórico e perspectivas. **3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**. 2005.
- CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**. 72: 1907-1932. 2008.

CARVALHO, R.A.; LAUDICINA, A.; GIULIANO-CAETANO, L.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Cytogenetic analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Pimelodidae). **Braz. J. Biol.** 70(3): 631-636. 2010.

EBERHARDT, G.N. **Estudos cromossômicos em *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae) do ribeirão Três Bocas, PR.** 2008. 25 f. **Monografia de Bacharelado.** Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes os *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). **Genetica.** 124: 301-306. 2005

FERNÁNDEZ, R.; BARRÁGAN, M. J. L.; BULLEJOS, M.; MARCHAL, J. A.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. E. SÁNCHEZ, A. New C-band protocol by heat denaturacion in the presence of formamide. **Hereditas.** 137: 145-148. 2002.

FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica.** 110: 55-62. 2001.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da Planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes.** 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 241p. 2007.

GALETTI JR., P.M.; MESTRINER, C.A.; MONACO, P.J.; RASCH, E.M. Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chromosome Research.** 3: 285-290.1995.

HARTMANN, C; SVALDI, A.D. Localização das redes de pesca de camarão (saquinho) utilizando aerofotos georreferenciadas: região estuarina da Laguna dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica,** Rio Grande, 24(1): 5-10. 2002.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica.** 122: 239-244. 2004.

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

IRGANG, B.E.; GASTAL JR., C.V.S.; PHILBRICK, C.T.; NOVELO, A. A ocorrência inédita de uma Podostemaceae nas costas de uma laguna (Laguna dos Patos) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Pesquisa série Biologia.** 15(2): 7-12. 2003.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L.R.; WEITZMAN, S.H.; BURNS, J.R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. 54, 498-511. 2010.

LEE, M.R. E.; ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. **Cytogenet. Cell. Genet.** 52: 36-40. 1980.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. *Genera incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, J.R.C.J. (eds) **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, 1<sup>st</sup> edn. Edipucrs, Porto Alegre, RS. 2003.

MAIA, T.P.A.; GIULIANO-CAETANO, L.; RODRIGUEZ, M.S.; RUBERT, M.; TAKAGUI, F.H.; DIAS, A.L. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyol. Res.** fevereiro. 2010.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and Nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica.** 109: 161-168. 2000.

MIZOGUCHI, S.M.H.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas.** 127: 249-253. 1997.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. **Caryologia.** 36(3): 235-244. 1983.

ORICOLLI, M.C.G.; BENNEMANN, S.T. Dieta de *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) em riachos da bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná. **Acta Sci. Biol. Sci.** 28(1): 59-63. 2006.

PACHECO, R.B.; GIULIANO-CAETANO, L.; JULIO JUNIOR, H.F.; DIAS, A.L. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology.** 8(3): 667-671. 2010.

PAINTNER-MARQUES, T.R.P.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia.** 67: 397-402. 2002a.

PAINTNER-MARQUES, T.R.P.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas.** 137: 107-112. 2002b.

PAINTNER-MARQUES, T.R.P.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic Characterization of a Population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. 26(2): 145-149. 2003.

PESSANO, E.F.C.; AZEVEDO, C.L.O.; QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E.; BRASIL, L.G.; CASTRO, L.R. B.; PINTO, T.B.; CORRÊA, F.V. Ictiofauna do arroio Quarai-Chico, bacia do médio rio Uruguai, no interior do Parque Estadual do Espinilho, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biotemas**. 18(2): 143 – 153. 2005.

PIRES, L. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic Characterization of *Geophagus brasiliensis* and Two Species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. **Folia biologica**. 58(1-2): 29-34. 2010.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 2934-2938. 1986.

PORTELA, A.L.B.S.; GALETTI JR., P.M.; BERTOLLO, L.A.C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae ( Pisces, Characidae). **Rev. Bras. Genética**. 11: 307-316. 1988.

PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO-JUNIOR., H. F.; NISHIYAMA, P.B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: Analisis of the synaptonemal complex. **Genetica**. 110: 277-283. 2001

PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO JR., H.F.; SANTOS, I.C.M.; PAVANELLI, C.S. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica**. 133(2): 113-118. 2008.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, J.R.C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, 1<sup>st</sup> edn. Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

RIBEIRO, M.F.; KÖHLER, A. Ictiofauna do rio Pardinho, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**. 19 (2): 37, 2007.

ROSA, R.; RUBERT, M.; MALABARBA, L.R.; MARTINS-SANTOS, I.C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) ( Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**. 7(4): 601-605. 2009.

SCHEEL, J.J. Fish chromosomes and their evolution. Interval Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark. 1973. Apud: Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Britski, H.A., Almeida-Toledo Filho, S.A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Rev. Brasil. Genet.** 11(3), 577-624. 1988.

- SILVA, J.F.P. Two new species of *Bryconamericus Eigenmann* (Characiformes, Characidae) from Southern Brazil. **Neotrop. Ichthyol.** 2: 55–60. 2004.
- SILVA, L.L.L. **Contribuição aos estudos cromossômicos de duas espécies de peixes da família characidae.** 2010. 67f. **Monografia de Bacharelado.** Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell. Genet.** 27: 190-193. 1980.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.** 75: 304-306. 1972.
- TOLDO, E. E. ALMEIDA JR., L. E. S. B. De; CORRÊA, I.C.S.; FERREIRA, E.R.; GRUBER, N.L.S. Wave prediction along Lagoa dos Patos coastline, southern Brazil. **Atlântica.** Rio Grande, 28(2): 87-95. 2006.
- TRECO, F.R.; MALABARBA, L.R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotropical Ichthyology.** 6(1): 87-92. 2008.
- VARI, R.P.; SIEBERT, D. J. A new unusually sexually dimorphic species of *Bryconamericus* (Pisces: Ostariophysi: Characidae) from the Peruvian Amazon. **Proc. Biol. Soc. Wash.** 103: 516-524. 1990.
- VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.S.; GALETTI JUNIOR, P.M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genetics and Molecular Biology.** 22(3): 345-349. 1999.
- VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B Chromosome in *Astyanax scabripinnis*. **Cytogenetic Cell Genet.** 74: 70-75. 1996.
- WASKO, A.P. **Estudos citogenéticos no gênero *Bryconamericus* (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonomica evolutiva.** 1996. 167 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- WASKO, A.P.; VENERE, P.C.; GALETTI JR., P.M. Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. **Brazilian Journal of Genetics.** 19(2): 225-230. 1996.
- WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios.** 94: 185-193. 1998.
- WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). **Cytologia.** 64: 63-67. 1999.