



Universidade Estadual de Londrina

---

Renata da Rosa

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES  
POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (PISCES,  
CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**

---

**Londrina  
2006**



**Universidade Estadual de Londrina**

**Instituto Agrônomo do Paraná**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

Renata da Rosa

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES  
POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (PISCES,  
CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**

---

**Londrina  
2006**

Renata da Rosa

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE  
*Hoplias malabaricus* (PISCES, CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano

Londrina  
2006

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

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

R788e Rosa, Renata da.  
Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias labaricus* (Characiformes, Erythrinidae) / Renata da Rosa. –  
Londrina, 2006.  
100f.: il.

Orientador: Lucia Giuliano Caetano.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular) –  
Universidade Estadual de Londrina, 2006.  
Inclui Bibliografia.

1. Characiformes – Teses. 2. Cromossomos sexuais – Teses. 3.  
Citogenética animal – Teses. 4. Biologia molecular – Teses. I. Vidotto,  
Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

Renata da Rosa

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE  
Hoplias malabaricus (PISCES, CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profª Drª **Lucia Giuliano Caetano**  
Universidade Estadual de Londrina

Profº Dr. **Luiz Antonio Carlos Bertollo**  
Universidade Federal de São Carlos

Profª Drª **Ana Lúcia Dias**  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de fevereiro de 2006.

**O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.**

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, por conceder tantas graças à minha vida e por estar comigo em todos os momentos, me auxiliando nas horas boas e difíceis, me fortalecendo cada vez mais em sua fé.

Aos meus pais **Celomar e Tânia**, pelo amor, dedicação, compreensão dados a mim, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e por serem os melhores pais do mundo. Amo vocês...

Aos meus irmãos **Ricardo e Rodrigo**, que mesmo estando longe sempre estiveram perto, enchendo de alegria os meus dias e me aturando nos momentos de chatice.

Ao meu namorado **Carlos**, por ter tornado essa batalha mais leve, iluminando meus dias com amor, felicidade, compreensão e amizade.

À minha grande amiga **Angélica**, por me aturar várias vezes pelo telefone e na sua casa em Maringá... Loira, sinto muito sua falta...

À **Sandra**, por ter se revelado uma grande amiga e companheira de laboratório. Foi muito bom te conhecer...

À querida amiga **Marceléia**, que por vários anos está comigo, desde a universidade trabalhando ao meu lado na citogenética...

Às minhas colegas de república **Talita e Patrícia**, pelas risadas, encrencas que passamos juntas durante esses anos, e pelo bom relacionamento que tivemos nesse tempo maravilhoso.

Ao pessoal do laboratório de Citogenética de Peixes da UEL: **Treco, Tatiana, Vivian, Larissa, Andressa, Helen, Jéssica, Robson, Rafael e Ana Cláudia**, pelos momentos de trabalho e principalmente de descontração, tornando nosso laboratório muito mais alegre.

Aos colegas de classe, em especial **Rodrigo, Nelci, Francine e Magda**, pelos momentos alegres mesmo durante as disciplinas puxadas.

À minha orientadora **Dr<sup>a</sup> Lucia**, por me dar a oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, e por me auxiliar em tudo o que precisei, além de se revelar uma querida amiga. Muito obrigada por tudo!

À professora **Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia**, pela convivência, pelos ensinamentos e dicas, pela amizade e pelos momentos de alegria no laboratório.

Ao professor e amigo **Dr. Vladimir**, por ter me iniciado cientificamente e me auxiliado todo esse tempo.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

E à **Universidade Estadual de Londrina**, pelo apoio e suporte durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

As traíras, *Hoplias malabaricus*, apresentam uma grande distribuição pela América do Sul, sendo a espécie tipo da região de Suriname. Dentre os representantes da família Erythrinidae, são os que possuem maior número de estudos citogenéticos, revelando uma grande variação cariotípica, com sete citótipos descritos até o momento, e diferentes tipos de sistemas sexuais. Essas variações ocorrem entre animais de bacias hidrográficas diferentes e também em simpatria. No presente trabalho foram analisados citogeneticamente e morfometricamente seis população de *H. malabaricus* pertencentes à região média do rio Paranapanema: a) bacia do rio Claro, UNOPAR – Tamarana/PR; b) EPUEL – Estação de piscicultura da UEL – Londrina/PR; c) rio Vermelho – Bela Vista do Paraíso/PR; d) Rancho Alegre/PR; e) Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR; f) rio Paranapanema – Iepê/SP. Na população da UNOPAR foram encontrados dois citótipos em simpatria, com  $2n = 40$  cromossomos e  $2n = 42$  cromossomos. Dois indivíduos não apresentaram definição quanto ao número diplóide, sendo observado 38,24% das células com 41 cromossomos, e 41,12% das células com 42 cromossomos, caracterizando um mosaico cromossômico. A população da EPUEL apresentou  $2n = 42$  cromossomos M/SM para machos e fêmeas com sistema sexual simples do tipo XX/XY. As populações do sítio rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema, apresentaram  $2n = 39$  cromossomos para os machos e  $2n = 40$  cromossomos para fêmeas, demonstrando um sistema sexual múltiplo do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ . A impregnação por nitrato de prata evidenciou RONS múltiplas, variando de 3 até 9 cromossomos marcados. Todas as populações apresentaram uma distribuição semelhante da heterocromatina, principalmente na região centromérica da maioria dos cromossomos e telomérica em alguns. No sexto par cromossômico, um bloco corado que se inicia na região pericentromérica foi observado. Nas populações que apresentaram cromossomos sexuais múltiplos, esse cromossomo corresponde ao  $X_1$ . Nos machos do rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três

Bocas e Paranapanema, o cromossomo Y apresentou diferenças na quantidade e localização dos blocos heterocromáticos. A coloração das bandas-C com fluorocromo GC-específico evidenciou dois cromossomos com marcação próxima ao centrômero, em todas as populações, provavelmente o sexto par. As bandas centroméricas foram evidenciadas com fluorocromo AT-específico. A coloração com fluorocromo GC-específico evidenciou diferentes marcações entre as populações. A análise das variáveis canônicas dos dados morfométricos evidenciou a formação de grupos distintos. Os valores apresentaram 79,38% de proximidade ao eixo canônico 1, separando três grupos: (1) Ribeirão Três Bocas de (2) Rancho Alegre + Sítio Água da Mina + UNOPAR; e (3) EPUEL + rio Paranapanema. As medidas mais contrastantes foram o comprimento do osso maxilar (COM) e a distância pré-dorsal (DPD). Através das proporções corporais pode-se observar que os exemplares estudados diferem do exemplar da localidade tipo. Provavelmente, a morfologia deve ser influenciada pelo ambiente, como a presença ou não de corredeiras, forma do substrato, entre outros fatores, desta forma o padrão genético não será o único fator a influenciar na forma desta espécie. Os resultados obtidos tanto citogenéticos quanto morfológicos nos levam a sugerir a existência de espécies distintas no grupo *Hoplias malabaricus* do médio Paranapanema.

## ABSTRACT

Trahiras, *Hoplias malabaricus*, have a wide distribution through South America, being the type specie of Suriname. Among represents of family Erythrinidae, has a most number of cytogenetics studies, that reveal a great karyotypic variation, with seven cytotypes, and distinct types of sexual systems. This variation occur between animals of different hydrographic basins and also in sympatry. In this work were analyzed cytogeneticly and morphometricly six population of *H. malabaricus* belonging mean region of Parapanamena river: a) Claro river basin, UNOPAR – Tamarana/PR; b) EPUEL – UEL pisciculture station – Londrina/PR; c) farm Água da Mina – Bela vista do Paraíso/PR; d) Rancho alegre/PR; e) ribeirão Três Bocas – Londrina/PR; f) Paranapanema river – Iepê/SP. In population from UNOPAR were found two cytotypes in sympatry, with  $2n = 40$  chromosomes e  $2n = 42$  chromosomes. There was impossible to define the diploide number of two specimens, being observed 38,24% of cells with 41 chromosomes, and 41,12% of cells with 42 chromosomes, characterizing a genetic mosaic. EPUEL population presented  $2n = 42$  chromosomes for males and females with a XX/XY simple sexual system. The populations from Vermelho river, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas and Paranapanema river, presented  $2n = 39$  chromosomes to males and  $2n = 40$  chromosomes to females, showing a of  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  multiple sexual system. Silver staining showed multiple NORs, been observed 3 until 9 chromosomes marked. All populations had a similar heterochromatin distribution in the centromeric region in several chromosomes and close of telomérica region in some. It was observed one heterochromatic block in pericentromeric region on the sixth chromosomic pair, that corresponds to the  $X_1$  chromosome in populations with multiple sexual chromosome. In males of Vermelhor river, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas and Paranapanema, the Y chromosome showing differences in quantity and localization of heterochromatics blocks. C-band staining by GC-

specific fluorochrome indicated two marked chromosomes near centromere, in all population, probably the sixth pair, and when it was staining by AT-specific fluorochrome, the bands appeared in the centromeres. Staining by GC-specific fluorochrome showed different marks among populations. Canonic variables analysis in the morphometric dates formed distinct groups. Values presented 79,38% proximity in the canonic axle 1, that were separated in three groups: (1) ribeirão Três Bocas; from (2) Rancho Alegre + Vermelho river + UNOPAR; and (2) EPUEL + Paranapanema river. The most contrasting measurements was bony maxilar length and predorsal length. Through of corporal proportion we can observe that specimens studied are different of type locality specimen. Probably the morphology was be influenced for the environment, like presence or not of currents, substrate form, among others factors, this way genetic pattern don't is the only factor to influence in the specie form. Cytogenetic and morphological results lead us to propose the existence of different species into the group *Hoplias malabaricus* in mean Paranapanema.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I – Introdução

**Figura 1: *Hoplias malabaricus*..... 21**

### CAPÍTULO II - Identificação de mosaicismos cromossômico na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae).

**Figura 1: a) Cariótipo padrão  $2n = 42$  de seis exemplares de *H. malabaricus*; b) Cariótipo 41 cromossomos, encontrado em dois exemplares dessa espécie... 42**

**Figura 2: Histograma com a frequência dos números diplóides observados em *H. malabaricus*, evidenciando frequências similares para  $2n = 41$  e  $2n = 42$  cromossomos..... 43**

### CAPÍTULO III - Estudo citogenético em *Hoplias malabaricus* em condição de cultivo natural.

**Figura 1: Cariótipos dos exemplares de *H. malabaricus* da UNOPAR: a)  $2n = 40$  cromossomos; b)  $2n = 42$  cromossomos..... 56**

**Figura 2: Cariótipos dos exemplares da EPUEL: a) fêmea; b) macho..... 57**

**Figura 3: Metáfases de *H. malabaricus* impregnadas com nitrato de prata: a) UNOPAR; b) EPUEL. As setas indicam as RONS..... 58**

**Figura 4: Coloração com CMA<sub>3</sub>: a) UNOPAR; b) EPUEL; c) Bandamento-C; d) banda-C corada com CMA<sub>3</sub>; e) banda-C corada com DAPI..... 59**

**CAPÍTULO IV – Cromossomos Y distintos no sistema sexual  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* do médio Paranapanema**

- Figura 1:** Cariótipo dos exemplares de *H. malabaricus* da população do sítio Água da Mina: a) fêmea; b) macho..... 73
- Figura 2:** Cariótipos dos machos de *H. malabaricus*: a) Paranapanema; b) Rancho Alegre; c) ribeirão Três Bocas..... 74
- Figura 3:** Metáfases e núcleos de *H. malabaricus* marcados por  $AgNO_3$ : a e b) sítio Água da mina; c e d) Rancho Alegre; e e f) ribeirão Três Bocas; g e h) rio Paranapanema..... 75
- Figura 4:** Blocos GC-ricos evidenciados pela  $CMA_3$ : a) rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema; b) Rancho Alegre..... 76
- Figura 5:** a) Banda-C dos exemplares de *H. malabaricus* de diferentes populações; b) cromossomo Y dos machos do sítio Água da mina; c) cromossomo Y dos machos de Rancho Alegre; d) cromossomo Y dos machos do ribeirão Três Bocas; e) cromossomo Y dos machos do rio Paranapanema; f) banda-C corada com  $CMA_3$ ; g) banda-C corada com DAPI..... 77

**CAPÍTULO V - Citotaxonomia em diferentes populações de *Hoplias aff. malabaricus* da região média do rio Paranapanema.**

- Figura 1:** Gráfico resultante da análise das variáveis canônicas dos dados, demonstrando a formação de diferentes grupos: a) ribeirão Três Bocas (verde); b) Rancho Alegre (azul) + rio Vermelho (rosa) + UNOPAR (marrom); e c) EPUEL (preto) + rio Paranapanema (vermelho)..... 92

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO I – Introdução</b> .....	<b>14</b>
1 A Família Erythrinidae.....	15
2 Cromossomos sexuais e polimorfismos em peixes.....	17
3 A espécie <i>Hoplias malabaricus</i> .....	20
3.1 Características biológicas.....	20
3.2 Aspectos citogenéticos.....	22
4 Locais de estudo.....	25
4.1 O rio Paranapanema.....	25
4.2 A bacia do rio Tibagi.....	26
5 Objetivos.....	28
5.1 Objetivo Geral.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
6 Referências Bibliográficas.....	29
<b>CAPÍTULO II - Identificação de mosaicismos cromossômico na espécie <i>Hoplias Malabaricus</i> (Pisces, Characiformes, Erythrinidae)</b> .....	<b>35</b>
Introdução.....	37
Materiais e Métodos.....	38
Resultados.....	38
Discussão.....	39
Referências Bibliográficas.....	44
<b>CAPÍTULO III - Estudo citogenético em <i>Hoplias malabaricus</i> em condição de cultivo natural</b> .....	<b>47</b>
Introdução.....	49
Materiais e Métodos.....	50
Resultados.....	51
Discussão.....	52

Referências Citadas.....	60
<b>CAPÍTULO IV – Cromossomos Y distintos no sistema sexual <math>X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y</math> em <i>Hoplias malabaricus</i> coletados no médio Paranapanema.....</b>	<b>63</b>
Introdução.....	65
Materiais e Métodos.....	66
Resultados.....	67
Discussão.....	69
Referências Bibliográficas.....	78
<b>CAPÍTULO V - Citotaxonomia em diferentes populações de <i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> da região média do rio Paranapanema.....</b>	<b>81</b>
Introdução.....	83
Materiais e Métodos.....	84
Resultados.....	86
Discussão.....	87
Literatura Citada.....	95
<b>CAPÍTULO VI – Conclusões.....</b>	<b>97</b>

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### 1 A Família Erythrinidae

Os animais pertencentes à Ordem Characiformes são, dentre os Ostariophysis, os peixes com maior diversidade morfológica. Eles apresentam um grande variedade do formato do corpo, estruturas maxilares, dentição e anatomia interna. Essa diversidade morfológica, associada com outros fatores, tem sido uma fonte valiosa de informações quanto a questão filogenética. Porém, essa amplitude da variação morfológica também dificulta os estudos sobre a ordem, já que se estima que ela seja composta por mais de 1300 espécies. Os parentescos da ordem são pobremente conhecidos, e devido a esse fato a monofilia de muitos grupos é incerta. Porém, sabe-se que uma evolução convergente é comum, e as classificações destes animais são feitas então com base em revisões sobre a descrição das famílias (NELSON, 1994).

A família Erythrinidae é relativamente pequena entre os Characiformes. Seus representantes, em geral, são predadores de hábito carnívoro. Apresentam o corpo grosso, nadadeira caudal arredondada, dentes caniniformes na maxila superior e inferior, alguns muito pequenos no palato e algumas vezes sobre a língua. Não possuem nadadeira adiposa nem fontanela (BRITSKI *et al.*, 1988). A família Erythrinidae é composta por três gêneros: *Erythrinus* Scopoli, 1777; *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903 (GODOY, 1975), distribuídas na região neotropical e endêmicas às Américas do Sul e Central. *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* são conhecidos popularmente por “jejú”. O gênero *Hoplerythrinus* é composto por três espécies: *H. cinereus* Gill, 1858; *H. gronovii* Valenciennes, 1847; e *H. unitaeniatus* Agassiz, 1829, que possuem uma ampla distribuição na região neotropical, com hábito de vida mais sedentário e não migrador, formando populações

isoladas, muitas vezes em lagos e/ou lagoas marginais (TRECO *et al.*, 2002). É um gênero facilmente distinguível dos demais da família por apresentar uma mancha em forma de ponto na região postero-dorsal do opérculo e uma listra preta ao longo do corpo. O gênero *Erythrinus* é representado pelas espécies *E. erythrinus* Bloch & Schneider, 1801 e *E. kessleri* Steindachner, 1876; e distribuem-se na América do Sul e nos rios brasileiros do estado da Bahia, respectivamente (OYAKAWA, 2003; BERTOLLO *et al.*, 2004).

O gênero *Hoplias* se distingue dos outros dois da família por apresentar dentes caninos no maxilar e na porção anterior e posterior do dentário. Possuem a nadadeira ventral com oito raios e a anal com 10 a 12 raios (BRITSKI *et al.*, 1988). De acordo com Oyakawa (2003), o gênero *Hoplias* é composto por nove espécies: *H. aimara* Valenciennes, 1847; *H. brasiliensis* Agassiz, 1829; *H. lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908; *H. macrophthalmus* Pellegrin, 1902; *H. malabaricus* Bloch, 1974; *H. microcephalus* Agassiz, 1829; *H. microlepis* Günther, 1864; *H. patana* Valenciennes, 1847 e *H. teres* Valenciennes, 1847. Destas, cinco são encontradas no Brasil: *H. brasiliensis*, *H. lacerdae*, *H. macrophthalmus*, *H. malabaricus* e *H. microcephalus*. A distinção entre *H. malabaricus* e *H. lacerdae* pode ser feita com base na região gular, onde em *H. malabaricus* a linha dentária converge na forma de “V” invertido, convergindo na região anterior, enquanto que em *H. lacerdae* estas linhas são aproximadamente paralelas e não se concentram na região anterior (BRITSKI, 1972 apud BERTOLLO *et al.*, 1978). Além disso, a presença ou ausência de denticulos na língua também é um caráter diferencial entre as duas espécies, onde *H. malabaricus* possui língua provida de placas ósseas com dentes diminutos (BRITSKI *et al.*, 1988).

## 2 Cromossomos sexuais e polimorfismos em peixes

Para investigar as bases genéticas envolvidas na determinação do sexo em peixes, várias abordagens têm sido utilizadas, como análises de segregação de genes marcadores ligados ao sexo, da proporção sexual em cruzamentos intra e interespecíficos, inferências através de poliploidia artificial, através de animais que sofreram reversão sexual natural e induzida, análises citológicas dos cromossomos e da cromatina (PRINCE, 1982 apud MOLINA, 1995), e estudos moleculares (NAKAYAMA *et al.*, 1994). De acordo com Moreira-Filho *et al.* (1993), as pesquisas sobre cromossomos sexuais têm aumentado nos últimos anos com a descrição de vários sistemas em diferentes espécies. Diferentemente dos mamíferos e das aves, onde os sistemas XY e ZW aparentam ter surgido apenas uma vez, os cromossomos sexuais em peixes podem ter se originado várias vezes (GALETTI Jr. *et al.*, 1995a apud JESUS, 1996).

Segundo Guerra (1988), embora a determinação do sexo seja sempre devido à ação de genes, nas espécies que apresentam cromossomos sexuais diz-se que há uma determinação cromossômica do sexo. Há famílias de peixes de água doce, como Cichlidae e Curimatidae, que não apresentaram, em muitos estudos realizados até o presente, cromossomos sexuais detectáveis (MOLINA, 1995). Essas duas famílias apresentam um padrão conservativo de evolução cariotípica, existindo, na maioria das vezes, uma constância no número cromossômico e fundamental.

Os primeiros estudos de cromossomos sexuais em peixes neotropicais foram feitos em *Hoplias* (BERTOLLO *et al.*, 1978), *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO, 1978 apud JESUS, 1996) e *Leporinus* (GALETTI Jr., 1979 apud JESUS, 1996). Já em 1993, Moreira-Filho *et al.* apresentaram para a mesma ictiofauna 31 casos de cromossomos sexuais

citologicamente diferenciados, onde aproximadamente 50% destes casos correspondiam à heterogametia feminina. Oliveira e Foresti (1994) descreveram a ocorrência de 34 espécies com apenas 35% de heterogametia masculina e o restante feminina. Estudos realizados por Centofante *et al.* (2002) evidenciaram 55 ocorrências de heteromorfismo sexual nos peixes neotropicais, sendo que 64% delas eram representadas por heterogametia feminina e 36% por heterogametia masculina, e dentre estes casos, oitenta por cento correspondiam a sistemas sexuais simples (77% ZZ/ZW e 23% XX/XY).

Existem espécies que podem apresentar variações cromossômicas entre diferentes células do indivíduo, entre indivíduos diferentes da mesma população, ou também entre populações diferentes da mesma espécie. Entende-se como polimorfismo cromossômico a existência de duas ou mais formas diferentes para um mesmo cromossomo, que contribui para a variação cariotípica natural das espécies, sendo que esse conceito se aplica tanto a uma população isolada quanto a uma espécie, um gênero. Essas variações podem estar relacionadas ao número diplóide ou à estrutura cromossômica (GUERRA, 1988). De acordo com Fenocchio (1987), três características do polimorfismo são observadas: é um fenômeno intrapopulacional; envolve variações observáveis direta ou indiretamente; e, deve se apresentar em proporções determinadas.

Com relação à evolução, os rearranjos cromossômicos podem ser desvantajosos, vantajosos ou neutros. Se o rearranjo for vantajoso ou neutro, poderia ser fixado na população e transmitido às progênes futuras, causando variações intrapopulacionais ou polimorfismos (BEZERRA, 2002). De acordo com Bertollo (1994), nos peixes neotropicais, as variações interpopulacionais são descritas em muitos grupos, e isso tem sido relacionado com a estrutura da população. Desse modo, espécies que constituem populações

mais limitadas e sedentárias estariam propensas a apresentar um maior grau de variação, comparando-se com aquelas que formam populações grandes e de maior mobilidade.

Giuliano-Caetano e Bertollo (1988) descreveram a presença de polimorfismos estruturais, com modificações da macroestrutura, em *Hoplerythrinus unitaeniatus* do rio Negro, Manaus (AM). Nessa espécie foi encontrado um cariótipo basal com  $2n = 48M-SM$ . As variações observadas foram a nível intrapopulacional e houve a manutenção do número diplóide com mais três citótipos distintos:  $46M-SM + 2A$ ;  $46M-SM + 2A$ , sendo esses cromossomos acrocêntricos de tamanhos diferentes; e,  $47M-SM + 1A$ . Com relação a esses citótipos encontrados, esses polimorfismos podem ser resultantes de inversões pericêntricas, já que são as mais comuns envolvidas em arranjos cromossômicos que resultam em cromossomos acrocêntricos a partir de cromossomos meta ou submetacêntricos (GIULIANO-CAETANO, 1986). Além disso, outros relatos de variações estruturais são encontrados em *Pimelodus* (DIAS, 1987), *Corydoras* (OLIVEIRA *et al.*, 1986), *Erythrinus erythrinus* (BERTOLLO *et al.*, 2004), entre outros.

Além das alterações morfológicas, outro tipo de variação está relacionado com o número cromossômico. Os polimorfismos numéricos são conseqüências de vários fenômenos, nos quais se destacam os rearranjos Robertsonianos, a poliploidização e a presença de cromossomos supranumerários (FENOCCHIO, 1987). Os rearranjos Robertsonianos foram descritos pela primeira vez por Robertson, em 1916, onde se pode supor uma origem por fusão de centrômeros fraturados e fusões dessas partes, que possibilita a formação de cromossomos monocêntricos, dicêntricos ou acêntricos (GIULIANO-CAETANO, 1998). Também são encontradas as situações onde a microestrutura do cariótipo mostra-se polimórfica. Como exemplo a descrição de RONS polimórficas em *Prochilodus*

*lineatus* (GOMES *et al.*, 1994), variando em tamanho, e também o polimorfismo de bandas C em *Astyanax scabripinnis* (MANTOVANI *et al.*, 2000).

### 3 A espécie *Hoplias malabaricus*

#### 3.1 Características biológicas

As traíras, *Hoplias malabaricus* (Fig. 1), são peixes carnívoros, predadores e apresentam uma grande distribuição pela América do Sul. Habitam de preferência ambientes lênticos de reservatórios e remansos de tributários, normalmente associada a vegetação aquática (BRITTO, 2003). Estudos comportamentais realizados por Benneman *et al.* (2000) revelaram que esses animais são separados dos demais grupos de peixes da bacia do rio Tibagi por não apresentar atividades no período diurno, as quais se acentuam do anoitecer para o período noturno, atingindo o máximo ao amanhecer.

*H. malabaricus* possui o corpo alongado e roliço. Sua língua apresenta placas ósseas com dentes diminutos, sendo áspera ao tato. As manchas corporais são irregulares, onde a parte inferior da cabeça apresenta-se marmoreada. Há de três a quatro listras na face, divergindo do olho para trás, e no corpo quatro ou cinco faixas transversais inconspícuas inclinadas. As nadadeiras dorsal, anal e caudal também possuem listras, porém escuras alternadas com claras, e as nadadeiras peitorais e ventrais são manchadas (BRITSKI *et al.*, 1988). São animais de médio porte (20-50 cm), não migradores, com fecundação externa, desova parcelada e apresentando cuidado parental. A coloração corporal varia de parda a marrom. A boca é terminal com um leve prognatismo, e possuem portanto, dentes cônicos. (BRITTO, 2003).



Figura 1. *Hoplias malabaricus*

### 3.2 Aspectos Citogenéticos

Os estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* iniciaram-se em 1978 com Bertollo *et al.* com a espécie *Hoplias lacerdae*. Desde então, vários estudos têm sido realizados, buscando decifrar as razões que levam a grandes variações genéticas entre os indivíduos do gênero. Bertollo *et al.* (1979) estudaram duas populações alopátricas de *Hoplias malabaricus* (Vale do Rio Doce e rio Juquiá), encontrando um número diplóide de 42 cromossomos e a presença de um sistema sexual simples do tipo XX/XY. Algumas variações morfológicas foram encontradas entre as duas populações, mas não foram suficientes para diferenciá-las sistematicamente. Segundo Born e Bertollo (2000) o cromossomo X, nesse caso, contém cístrons ribossomais e podem ser polimórficos quanto ao tamanho.

Bertollo *et al.* (1983) analisaram exemplares do gênero *Hoplias* provenientes dos estados de São Paulo (São Carlos) e do Mato Grosso (Aripuanã). A primeira população apresentou um número diplóide de  $2n = 40$  cromossomos para fêmeas e 39 cromossomos para os machos. Já na população do Mato Grosso foi identificado um número diplóide de 40 cromossomos para fêmeas e 41 cromossomos para machos. Deste modo, dois novos tipos de sistemas sexuais múltiplos puderam ser evidenciados,  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  e  $XX/XY_1Y_2$  respectivamente. Estudos posteriores realizados por Lopez e Fenocchio (1994) revelaram a presença de dois citótipos diferentes em *H. malabaricus*,  $2n = 40$  cromossomos M/SM e 42 cromossomos M/SM. Nesse caso, não houve a presença de cromossomos sexuais.

As análises feitas em exemplares pertencentes à treze populações, provenientes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras e uma do Suriname, revelaram a presença de dois citótipos, ambos com 40 cromossomos M/SM para machos e fêmeas. A diferença entre esses citótipos se deve ao tamanho relativo do primeiro par cromossômico.

Em um dos citótipos esse par é maior e seguido dos demais cromossomos do complemento. Já no outro isso não ocorre, eles são equivalentes. Essa diferença de tamanho não pode ser explicada pelo processo de heterocromatinização, pois a distribuição da heterocromatina constitutiva foi similar em ambos os citótipos (BERTOLLO *et al.*, 1997b).

Bertollo *et al.* (2000) realizaram um grande estudo avaliando dados de trinta e seis localidades distintas, sendo trinta e duas no Brasil, duas na Argentina, uma no Uruguai e outra no Suriname. Sete citótipos gerais foram caracterizados para *H. malabaricus*. Citótipo A:  $2n = 42$  cromossomos M/SM em ambos os sexos, com uma grande distribuição do nordeste ao sudeste do Brasil, Uruguai e Argentina. Citótipo B:  $2n = 42$  cromossomos M/SM para os dois sexos, porém esse citótipo apresentou sistema sexual simples do tipo XX/XY (BERTOLLO *et al.*, 1979). Citótipo C:  $2n = 40$  cromossomos M/SM, sem aparente dimorfismo sexual cromossômico. Citótipo D:  $2n = 40$  cromossomos M/SM para fêmeas e 39 para machos, evidenciando um sistema de determinação cromossômica do sexo,  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  (BERTOLLO *et al.*, 1983). Citótipo E: número diplóide igual ao citótipo A, contudo, o primeiro par de cromossomos é de grande tamanho, e ocorre a presença de um cromossomo acrocêntrico no par número 6. Não foram realizados estudos citogenéticos em fêmeas dessa localidade. Citótipo F:  $2n = 40$  cromossomos M/SM sem diferenciação cromossômica sexual. Ocorre uma grande diferença de tamanho entre o primeiro par cromossômico e o restante, onde ele é relativamente maior (BERTOLLO *et al.*, 1997b). Citótipo G: ocorre a presença de 40 cromossomos nas fêmeas e 41 nos machos. Esse heteromorfismo corresponde a um sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> (BERTOLLO *et al.*, 1983).

Algumas espécies de peixes apresentam as Regiões Organizadoras de Nucléolos localizadas em apenas um par de cromossomos, caracterizando o tipo simples,

como as espécies de Curimatidae (VENERE *et al.* apud MARGARIDO, 2000), de Parodontidae (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984), e de Salminae e Bryconinae (MARGARIDO e GALETTI JR, 1999). Outras espécies apresentam RONS múltiplas, que são caracterizadas por se localizarem em mais de um par de cromossomos, como em *Oligosarcus paranensis* (RUBERT *et al.*, 2003). Vários estudos realizados em *Hoplias malabaricus* demonstraram a existência de múltiplas regiões organizadoras de nucléolos, sendo estas localizadas principalmente em regiões teloméricas (DERGAM e BERTOLLO, 1990; LOPEZ e FENOCCHIO, 1994; LOPES *et al.*, 1998). Um caso especial foi relatado por Bertollo (1996), onde foram encontrados de 1 a 10 cromossomos marcados, sendo que de 1 a 3 cromossomos apresentaram as RONS em ambos os telômeros. Além disso, em Erythrinidae há uma característica que dificulta a análise das RONS, pelo tamanho reduzido, em alguns casos assemelhando-se a pequenos pontos.

As seqüências de DNAr 18S são utilizadas para inferir a filogenia entre as espécies. Born e Bertollo (2000), utilizando sondas de DNAr 18S, detectaram em *H. malabaricus* a presença de 10 cromossomos portando os sítios responsáveis pela transcrição desse tipo de RNA 28S-5,8S e 18S. Nesses cromossomos marcados, incluiu-se também o cromossomo X. Já os cístrons de DNAr 5S foram localizados intersticialmente em um único par cromossômico e independente dos sítios 18S.

Em peixes como os Anostomidae (GALETTI JR *et al.*, 1991), a distribuição da heterocromatina constitutiva tem sido uma ferramenta importante para a compreensão da organização dos cariótipos. De acordo com Dergam e Bertollo (1990), os Characiformes apresentam uma predominância de bandas-C pericentroméricas. Isso foi confirmando em *Hoplias malabaricus*, cujos representantes apresentam além da região pericentromérica, as regiões teloméricas de alguns cromossomos com blocos heterocromáticos (DERGAM e

BERTOLLO *op cit.*; LOPEZ e FENOCCHIO, 1994; BERTOLLO *et al.*, 1997a, 1997b; BORN e BERTOLLO, 2001). Outra forma de caracterização cromossômica são os padrões criados por bandas-G e bandas de replicação. Segundo Bertollo *et al.* (1997a) elas permitem a identificação de cromossomos  $X_1$  e Y e também a origem dos rearranjos que ocorreram na origem deste sistema sexual ( $X_1X_2Y$ ).

## **4 Locais de Estudo**

### **4.1 O rio Paranapanema**

O rio Paranapanema é um dos importantes afluentes da margem esquerda do rio Paraná. Ele nasce na vertente ocidental da Serra da Paranapiacaba, no município de Capão Bonito, Estado de São Paulo, e está inserido na bacia do Alto Paraná. O rio Paranapanema possui uma extensão de aproximadamente 600 km, com orientação geral leste-oeste. Ao longo de sua extensão possui um desnível aproximado de 500 m. Devido a esse motivo, em 1958 começou o aproveitamento do rio para a geração de energia elétrica (DUKE ENERGY, 2003).

Em uma extensão de 392,9 km, o rio Paranapanema forma a fronteira do Estado dos Paraná com o Estado de São Paulo. Juntamente com seus afluentes da margem sul, abrange 55530 km<sup>2</sup>. A altura média das margens é de 4 metros. Estes padrões são formados por sedimentos soltos do quaternário, que repousam sobre rasos terraços de rochas eruptivas e muitas vezes acompanham o rio como campos de inundação ou várzeas, evidenciando freqüentemente pequenas lagoas ou pântanos (MAACK, 2002).

## 4.2 A bacia do rio Tibagi

O rio Tibagi é o principal afluente do rio Paranapanema, e suas nascentes estão localizadas nos Campos Gerais, a oeste da escarpa devoniana. Seu percurso abrange aproximadamente 550 km, em direção sul-norte, onde a velocidade máxima das águas em todas as corredeiras é, em média, de 3,2 m/s (MAACK, 2002). A bacia do rio Tibagi abrange o primeiro, o segundo e o terceiro planaltos paranaenses, possuindo 65 tributários principais (MEDRI *et al.*, 2002). Seus principais formadores encontram-se na região de Ponta Grossa com os rios Imbituva, Garaúna, Iapó, entre outros. O rio Tibagi apresenta curso norte indo desaguar no rio Paranapanema, cortando o estado do Paraná em quase toda sua extensão no sentido sul-norte (ARTONI; ALMEIDA in DITZEL; SAHR, 2001). A limitação da bacia ocorre ao norte pela bacia do rio Paranapanema; a leste pelas bacias dos rios Cinzas e Itararé; a sudeste pela bacia do rio Ribeira; ao sul pela do rio Iguaçú; a oeste pela bacia do rio Ivaí e a noroeste pela bacia do rio Pirapó. Durante o curso do rio ocorrem vários saltos e cachoeiras. No total somam-se aos saltos 91 cachoeiras e corredeiras. As corredeiras mais importantes têm origem nas transposições do rio (MEDRI *et al.*, 2002).

O curso do rio Tibagi apresenta uma diferença de nível de 792 m entre o nascimento e a desembocadura. Fortes correntes são predominantes nas localidades de Telêmaco Borba, Sapopema e Londrina. A fauna íctia encontrada no rio Tibagi é semelhante à do rio Piquiri, em especial das localidades mais rápidas. As espécies de alto nível trófico, como *Acestrorhynchus lacustris*, *Serrasalmus spilopleura* e *Hoplias malabaricus*, predominam na região entre Londrina e Sertanópolis. Nessa região também ocorre uma diminuição da diversidade e da riqueza de espécies, que provavelmente se deve à transição de um ambiente lótico a um semilótico (BENNEMANN *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Bennemann e Shibatta (2002) relatam a presença de 17 espécies na região de Sertanópolis. Em ordem decrescente de abundância essas espécies foram *Moenkhausia intermédia*, *Astyanax altiparanae*, *Schizodon intermedius*, *Pimelodus maculatus*, *Plagioscion squamosissimus*, *Acestrorhynchus lacustris* e *Steindachnerina insculpta*. As espécies encontradas em menor abundância foram *Serrasalmus spilopleura*, *Iherigichthys labrosus*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Hoplias malabaricus*, *Schizodon nasutus*, *Pinirampus pirinampu*, *Rhinodoras dorbignyi*, *Metynnis maculatus* e *Prochilodus lineatus*.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar citogeneticamente e morfometricamente os espécimes de *Hoplias malabaricus* da bacia do médio Paranapanema, comparando animais provenientes de regiões naturais com aqueles coletados em ambientes de cultivo.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (1) Caracterizar o número e a macroestrutura cromossômica;
- (2) Determinar os cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolos;
- (3) Determinar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva;
- (4) Determinar as regiões cromossômicas coradas por fluorocromos GC- e AT-específicos;
- (5) Realizar a análise morfométrica dos exemplares;
- (6) Comparar os dados obtidos com os da literatura, caracterizando as populações do médio Paranapanema.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennemann ST, Silva-Souza AT & Rocha GRA. Composición icitofaunística em cinco localidades de la cuenca del rio Tibagi – Brasil. *Interciência* 20: 7-13, 1995.

Bennemann ST, Shibatta OA & Garavello JC. *Peixes do rio Tibagi – Uma abordagem ecológica*. Londrina: Ed. UEL, 2000, 62pp.

Bennemann ST & Shibatta OA. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta AO & Pimenta, J.A. *A bacia do rio Tibagi*. Londrina-PR, 2002, 433-442.

Bertollo LAC, Takahashi CS & Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120, 1978.

Bertollo LAC, Takahashi CS & Moreira-Filho O. Karyotypic studies of two allopatric population of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* II: 17-37, 1979.

Bertollo LAC, Takahashi CS & Moreira-Filho O. Multiple sex chromosome in the genus *Hoplias* (Pisces: Erythrinidae). *Cytologia* 48: 1-12, 1983.

Bertollo LAC. Polimorfismos cromossômicos em peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, V, 1994, Botucatu. *Resumos...* Botucatu: Instituto de Biociências – UNESP, 1994, p. 51.

Bertollo LAC. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* 61: 75-81, 1996.

Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS & Cano J. The X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research* 5: 493-499, 1997a.

Bertollo LAC, Moreira-Filho O & Fontes MS. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n = 40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics*. 20: 237-242, 1997b.

Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS & Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613, 2000.

Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão J das N & Fenocchio AS. Chromosome evolution in the erythrinidae fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93: 228-233, 2004.

Bezerra DD. *Estudos citogenéticos populacionais em Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces - Erythrinidae). Análise da biodiversidade.*(2002). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Born GG & Bertollo LAC. An XX/XY sex chromosome in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8: 111-118, 2000.

Born GG & Bertollo LAC. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. *Genetica* 110: 1-9, 2001.

Britski HÁ, Sato Y & Rosa ABS. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco.*3.ed. Brasília: CODEVASF, 1988, p. 54-55.

Britto SGC. *Peixes do rio Paranapanema.* São Paulo: Horizonte geográfico, 2003. p.48.

Centofante L, Bertollo LAC & Moreira-Filho O. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55: 139-150, 2002.

Dergam JA & Bertollo LAC. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 13: 755-766, 1990.

Dias AL. *Análises citogenéticas de peixes da família Pimelodidae (Pisces – Siluriformes).* (1987). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Ditzel CHM & Sahr CLL. *Espaço e Cultura: Ponta Grossa e os Campos Gerais*. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2001. 518p.

Duke Energy. *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo: Editora Horizonte Geográfico, 2003. 112p.

Fenocchio AS. *Polimorfismo cromossômico em Rhamdia hilarii (Pisces, Pimelodidae)*. (1987). Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

Galetti Jr. PM & Foresti F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenetic Cell Genetic* 43: 43, 1986.

Giuliano-Caetano L. *Estudo citogenético em Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces – Erythrinidae) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras*. (1986). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Giuliano-Caetano L & Bertollo LAC. Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). *Revista Brasileira de Genética* 11: 299-306, 1988.

Giuliano-Caetano L. *Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de Rineloricaria latirostris (Pisces, Loricariinae)*. (1998). Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Godoy MP. *A família Erythrinidae*. In: *Peixes do Brasil, subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu*. v.3. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975.

Gomes EA, Oliveira C & Foresti F. Herança de regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae). Análise de duas famílias. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, V, 1994, Botucatu. *Resumos...* Botucatu: Instituto de Biociências – UNESP, 1994, p. 59.

Guerra MS. *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 142p.

Jesus CM. *Contribuições aos estudos citogenéticos da família Parodontidae (Pisces, Characiformes)*. (1996). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal São Carlos – São Carlos.

Lopes PA, Alberdi AJ, Dergam JA & Fenocchio AS. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey River (Province of Corrientes, Argentina). *Copeia* 2: 485-487, 1998.

Lopez PA & Fenocchio AS. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). *Cytobios* 80: 217-221, 1994.

Maack R. *Geografia física do Estado do Paraná*. 3ª edição. Curitiba: Imprensa Oficial, 2002, p. 320-361.

Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA & 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.

Margarido VP & Galetti Jr PM. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 22: 357-361, 1999.

Margarido VP. *Uma contribuição à citogenética de Anostomidae, com ênfase na variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos no gênero Leporinus (Pisces, Characiformes)*. (2000). Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Medri ME, Bianchini E, Shibatta AO & Pimenta, JA. *A bacia do rio Tibagi*. Londrina-PR, 2002.

Molina WF. *Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero Leporinus (Pisces, Anostomidae)*. (1995). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Galetti Jr. PM. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26: 564-568, 1984.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Galetti Jr. PM. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *P. hiliarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125, 1993.

Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Schart M & Chourrout D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103: 31-39, 1994.

Nelson JS. *Fishes of the world*. 3.ed. New York: Jhon Wilry Sons, 1994, p. 600.

Oliveira C & Foresti F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, V, 1994, Botucatu. *Resumos...* Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1994, p.6.

Oyakawa OT. *Family Erythrinidae (Trahiras)*. In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Reis RE, Kullander SO & Ferrari Jr. CJ. Porto Alegre, EDIPUCS, 2003, p. 238-240.

Rubert M, Rosa R & Margarido VP. Estudos citogenéticos em *Oligosarcus paranensis* (Pisces, Characidae, Acestrorhynchinae) coletados no rio das Tuna/Piquiri. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XII, 2003, Foz do Iguaçu. *Resumos...* Foz do Iguaçu: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2003, p.9.

Treco FR, Lorscheider CA & Margarido VP. Descrição cariotípica de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) coletados no rio Paraná (Guaíra-PR). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Resumos...* Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002, p.29.

## **CAPÍTULO II**

**IDENTIFICAÇÃO DE MOSAICISMO CROMOSSÔMICO NA ESPÉCIE *Hoplias***

***malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).\***

\* Este artigo será submetido à publicação na revista Caryologia.

**IDENTIFICAÇÃO DE MOSAICISMO CROMOSSÔMICO NA ESPÉCIE *Hoplias malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).**

**Renata da Rosa e Lucia Giuliano-Caetano**

Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

CEP 86051-990, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná, Brasil, (e-mail: giuliano@uel.br).

**RESUMO**

Foram analisados citogeneticamente oito exemplares pertencentes à espécie *Hoplias malabaricus*, provenientes da estação de piscicultura da UNOPAR, a qual faz parte do sistema hídrico rio Claro, da bacia do rio Tibagi. Na maioria dos animais foi encontrado um citótipo formado por 42 cromossomos do tipo meta/submetacêntrico. Em dois exemplares, um macho e uma fêmea, não foi possível determinar um número diplóide típico. Foram evidenciadas diferentes linhagens celulares para esses animais, sendo que o número cromossômico predominante variou entre 41(38,24%) e 42 (41,12%) cromossomos. O cariótipo com  $2n = 41$  apresentou três cromossomos, um grande, um médio e um pequeno sem homólogo, enquanto que a linhagem de células com  $2n = 42$  cromossomos, apresentou o cariótipo formado por cromossomos m/sm, formando pares de homólogos. Os resultados obtidos demonstram a existência de um mosaico cromossômico nesses exemplares de *H. malabaricus*, não descrito anteriormente.

**Palavras-chave:** Alterações cromossômicas, Mosaicismo, *Hoplias malabaricus*.

## INTRODUÇÃO

Entende-se por mosaicismos a presença de duas ou mais populações de células de diferentes complementos cromossômicos (VERMA; BABU, 1995). Os mosaicos são muitas vezes confundidos com quimeras, porém diferem destas por serem originados a partir de um único zigoto (SANTELICES, 2004).

Tais alterações são passíveis a todos os tipos de organismos desde esponjas até plantas marinhas (SANTELICES, op cit). Os relatos mais comuns dessas aberrações são em humanos, com descrições de mosaicos  $4n/2n$  (ALONSO *et al.*, 2002),  $2n/3n$  (GOLUBOVSKY, 2003),  $46XX/46XY$  (NIU *et al.*, 2002), entre outros. Segundo GOLUBOVSKY (2003), através de uma primeira análise detalhada feita por FISH, detectou-se que 48,1% dos embriões em estágios de pré-implantação são mosaicos.

Em peixes, as variações intraindividuais foram primeiro relatadas por Ohno *et al.* (1965), porém não houve a confirmação de mosaicismos, já que as células analisadas pertenciam a tecidos somáticos diferentes.

Estudos recentes em *Trichomycterus paolence*, confirmaram a presença de mosaicismos nos peixes neotropicais. Os animais analisados apresentaram cariótipos com números diplóides de 54, 55, 56 e 57 cromossomos (TORRES *et al.*, 2002).

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente exemplares da espécie *Hoplias malabaricus* provenientes da estação de piscicultura da UNOPAR.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Oito exemplares de *H. malabaricus* (5 fêmeas e 3 machos) provenientes da Estação de piscicultura da UNOPAR (Universidade do Norte do Paraná – bacia rio Tibagi, Paraná, Brasil), foram estudados. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células renais e submetidos à técnica de *air drying* (BERTOLLO *et al.*, 1978) e por cultura de linfócitos (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1988). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a relação dos braços (LEVAN *et al.*, 1964).

## RESULTADOS

Os estudos citogenéticos realizados nos exemplares de *H. malabaricus* pertencentes à Estação de Piscicultura da UNOPAR, revelaram, em seis animais, um cariótipo formado por 42 cromossomos do tipo meta/submetacêntrico, em machos e fêmeas (Fig. 1a).

Em dois exemplares, um macho e uma fêmea, não foi possível determinar um único número diplóide característico. Foi evidenciado a ocorrência de diferentes linhagens celulares, sendo que os números cromossômicos predominantes foram 41 (38,24%) e 42 (41,12%) cromossomos. Essa variação pode ser verificada na tabela 1 e figura 2.

O cariótipo com  $2n = 41$  apresentou três cromossomos, um grande, um médio e um pequeno sem homólogos (Fig.1b). A linhagem de células com  $2n = 42$  cromossomos, apresentou o cariótipo formado por cromossomos M/SM, todos com seus respectivos pares.

## DISCUSSÃO

A espécie *Hoplias malabaricus*, pertencente à família Erythrinidae, está distribuída na maioria dos rios do continente sulamericano (OYAKAWA, 2003). Benneman *et al.* (2000), destacam que esse grupo mostra um comportamento distinto dos demais grupos de peixes da bacia do rio Tibagi por não apresentar atividades no período diurno, sendo estas verificadas crescendo do anoitecer para o período noturno, atingindo o máximo ao amanhecer.

Dentro do complexo *H. malabaricus*, uma característica extremamente importante é a ocorrência de uma diversidade cromossômica. Até o momento, sete citótipos são descritos para a espécie, com número diplóide variando de 39 a 42 cromossomos, sendo que alguns dos citótipos exibem diferenças cromossômicas entre os sexos (BERTOLLO *et al.*, 2000).

Giuliano-Caetano e Bertollo (1988) descreveram a presença de um polimorfismo cromossômico estrutural, em *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (Erythrinidae) do rio Negro, Manaus (AM). As variações observadas foram a nível intrapopulacional e houve a manutenção do número diplóide com mais três cariótipos distintos, exibindo cromossomos acrocêntricos, não observados no cariótipo padrão dessa população. Esse polimorfismo pode ser resultante de inversões pericêntricas, já que são as mais comuns envolvidas em arranjos cromossômicos que resultam em cromossomos acrocêntricos a partir de cromossomos meta ou submetacêntricos (GIULIANO-CAETANO, 1986).

Ainda dentro da mesma família, uma diversidade cromossômica é encontrada também em *Erythrinus erythrinus*, com a formação de quatro grupos com citótipos distintos. Dentro desses grupos, três apresentaram sistemas sexuais e dois grupos com

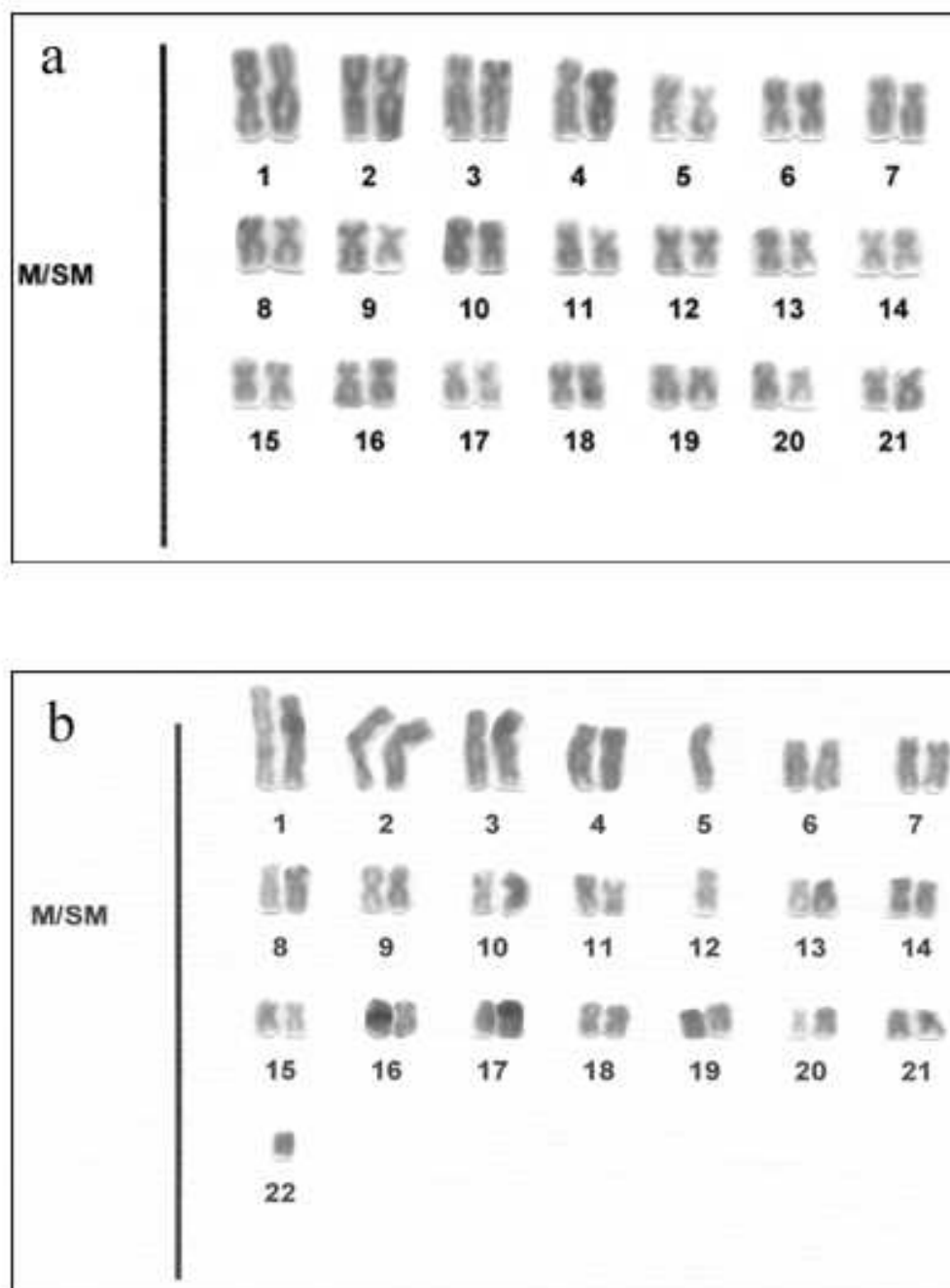
cromossomos Bs (BERTOLLO *et al.*, 2004). Outros relatos de variações estruturais são encontrados em *Pimelodus* (DIAS, 1987), *Corydoras* (OLIVEIRA *et al.*, 1988), entre outros.

Além das alterações na morfologia cromossômica, outro tipo de variação está relacionada com o número cromossômico, que pode se originar por motivos, entre os quais se destacam os rearranjos Robertsonianos, a poliploidização e a presença de cromossomos supranumerários (FENOCCHIO, 1987). Assim, por exemplo, as triploidias naturais, já foram relatadas em diversas espécies de peixes. Em *Astyanax scabripinnis* esse tipo de alteração foi observada com ocorrência simultânea de cromossomos-B (MAISTRO *et al.*, 1994). Giuliano-Caetano e Bertollo (1990) descreveram a presença de um triplóide dentro da família Erythrinidae, em exemplar pertencente à espécie *Hoplerythrinus unitaeniatus*, proveniente do rio Negro (AM).

O número cromossômico diplóide básico encontrado para a população estudada no presente trabalho foi de 42 cromossomos M/SM, sem distinção cromossômica entre os sexos, corroborando o citótipo A descrito por Bertollo *et al.* (2000). Porém, a alta frequência de celular com distintos números diplóides, em dois exemplares, direciona para a existência de um mosaico genético formado por duas linhagens celulares, contendo 41 e 42 cromossomos onde o cariótipo formado por 41 cromossomos apresenta três cromossomos sem homólogos.

Torres *et al.* (2002), analisando exemplares de *Trichomycterus paolence* provenientes do estado de São Paulo, verificaram uma drástica reorganização do cariótipo dessa espécie, com números cromossômicos variando de 54 a 57 cromossomos no tecido renal. Nesses cariótipos foi observada a presença de cromossomos de tamanho normal e microcromossomos, provavelmente resultante de quebras cromossômicas com a formação de fragmentos acêntricos perdidos durante o ciclo celular. Por sua vez, a ausência de

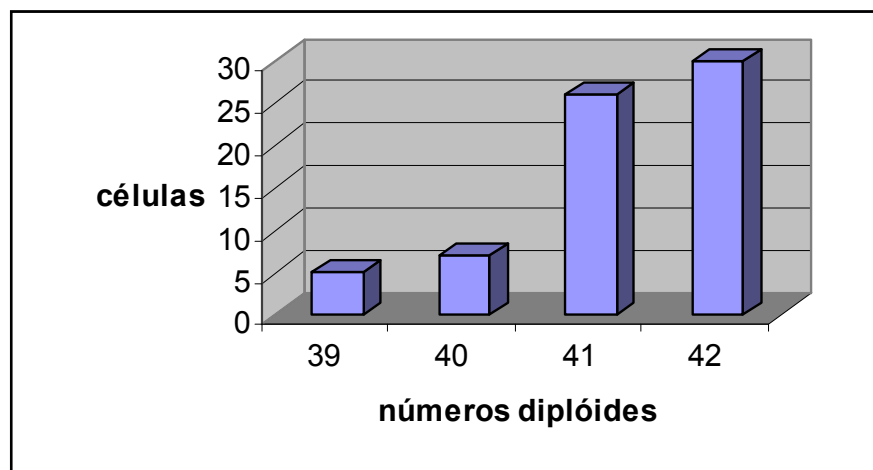
cromossomos inteiros nos mosaicos de *Hoplias malabaricus*, pode ter resultado de uma não-disjunção durante as divisões mitóticas pós-zigóticas, a exemplo do que foi proposto para *Trichomycterus davisi* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2000).



**Figura 1:** a) Cariótipo padrão  $2n = 42$  de seis exemplares de *H. malabaricus*; b) Cariótipo 41 cromossomos, encontrado em dois exemplares dessa espécie.

**Tabela 1:** Frequência dos número diplóides nos exemplares mosaicos.

Número do animal e sexo	Números diplóides				Total de células analisadas
	39	40	41	42	
2614 (fêmea)	3	4	11	18	36
2616 (macho)	2	3	15	12	32
Total	5	7	26	30	68
%	7,35	10,29	<b>38,24</b>	<b>44,12</b>	100

**Figura 2:** Histograma com a frequência dos números diplóides observados em *H. malabaricus*, evidenciando frequências similares para  $2n = 41$  e  $2n = 42$  cromossomos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO L., MELARAGNO I., BORTOLAI A., TAKENO S. and BRUNONI D., 2002. – *Tetraploid/diploid mosaicism: case report and review of the literature*. *Annales de Génétique* 45: 177-180.

BENNEMANN S.T., SHIBATTA O.A. and GARAVELLO J.C., 2000. – *Peixes do rio Tibagi – Uma abordagem ecológica*. Ed. UEL, Londrina, 62pp.

BERTOLLO L.A.C., TAKAHASHI C.S. and MOREIRA-FILHO O., 1978. – *Cytotaxonomic considerations on Hoplias lacerdae (Pisces, Erythrinidae)*. *Braz. J. Genet.* 1: 103-120.

BERTOLLO L.A.C., BORN G.G., DERGAM J.A., FENOCCHIO A.S. and MOREIRA-FILHO O., 2000. – *A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, Hoplias malabaricus. Karyotypic survei, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations*. *Chromosome Research* 8: 603-613.

BERTOLLO L. A.C., OLIVEIRA C., MOLINA W. F., MARGARIDO V. P., FONTES M. S., PASTORI M. C., FALCÃO J. DAS N. and FENOCCHIO A. S., 2004. – *Chromosome evolution in the erythrinidae fish, Erythrinus erythrinus (Teleostei: Characiformes)*. *Heredity* 93: 228-233.

BORIN L.A. and MARTINS-SANTOS I.C. 2002. – *Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in Trichomycterus davisi (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguazu River basin in Brazil*. *Genetics and Molecular Biology* 23: 605-607.

DIAS A.L., 1987. – *Análises citogenéticas de peixes da família Pimelodidae (Pisces – Siluriformes)*. MSc Dissertation. Universidade Federal de São Carlos, SP. 117 pp.

FENOCCHIO A.S. and BERTOLLO L.A.C., 1988. – *A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture*. *Rev. Bras. Genet.* 11: 847-852. 71pp.

FENOCCHIO A.S., 1987. – *Polimorfismo cromossômico em Rhamdia hilarii (Pisces, Pimelodidae)*. MSc Dissertation. Universidade de São Paulo, SP.

GIULIANO-CAETANO L. and BERTOLLO L.A.C., 1988. – *Karyotype variability in Hoplerethrinus unitaeniatus (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, State of Amazonas)*. *Rev. Bras. Genet.* 11: 299-306.

GIULIANO-CAETANO L. and BERTOLLO L.A.C., 1990. – *Karyotypic variability in Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of natural triploidy*. Rev. Bras. Genet. 13: 231-237.

GIULIANO-CAETANO L., 1986. – *Estudo citogenético em Hoplerythrinus unitaeniatus (Pisces – Erythrinidae) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras*. MSc Dissertation. Universidade Federal de São Carlos, SP. pp. 1-84.

GOLUBOVSKY M. D., 2003. – *Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning*. Human Reproduction 18: 236-242.

LEVAN A., FREDGA K. and SANDBERG A.A., 1964. – *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. Hereditas 52: 201-220.

MAISTRO E.L., DIAS A.L., FORESTI F., OLIVEIRA C. and MOREIRA-FILHO O., 1994. – *Natural triploidy in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes*. Caryologia, 47: 233-239.

NIU D.M., PAN C.C., LIN C.Y., HWANG B.T. and CHUNG M., 2002. – *Mosaic or chimera? Revisiting and old hypothesis about the cause of the 46,XX/46XY hermaphrodite*. The J. of Pediatrics 140: 732-735.

OHNO S., STENIUS C., FAISST E. and ZENZES M.T., 1965. – *Post-zygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (Salmo irideus Gibbons)*. Cytogenetics 4: 117-129.

OLIVEIRA C., ALMEIDA-TOLEDO L.F. and FORESTI F., 1988. – *Supranumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in Corydoras aeneus (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae)*. Caryologia 41: 227-236.

OYAKAWA O.T., 2003. – *Family Erythrinidae (Trahiras)*. In: R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferrari Jr. (Eds), “Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America”, p. 238-240. EDIPUCRS, Porto Alegre.

SANTELICES B., 2004. – *Mosaicism and chimerism as components of intraorganismal genetic heterogeneity*. J. Evol. Biol. 17: 1187-1188.

SHIMADA A. and SHIMA A., 2001. – *High incidence of mosaic mutations induced by irradiating paternal germ cells of the medaka fish, Oryzias latipes*. Mut. Res. 495: 33-42.

TORRES R.A., FORESTI F. and OLIVEIRA C., 2002. – *Occurrence of karyotypical mosaicism in Trichomycterus paolence (Teleostei, Trichomycteridae)*. Caryologia 55: 283-287.

VERMA R.S. and BABU A., 1995. – *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, McGraw-Hill, USA, 419pp.

## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDO CITOGENÉTICO EM *Hoplias malabaricus* EM CONDIÇÃO DE CULTIVO NATURAL.\***

\* Este artigo será submetido ao periódico Environmental Biology of Fishes.

## ESTUDO CITOGENÉTICO EM *Hoplias malabaricus* EM CONDIÇÃO DE CULTIVO NATURAL.

**Renata da Rosa<sup>1</sup>, Mauro Caetano Filho<sup>2</sup> & Lucia Giuliano-Caetano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380, caixa postal 6001, cep 86051-990 (e-mail: [giuliano@uel.br](mailto:giuliano@uel.br))

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina.

**Palavras-chave:** *Hoplias malabaricus*, simpatria, sistema sexual, XX/XY.

### RESUMO

Foram estudadas espécimes de *H. malabaricus* provenientes de duas estações de piscicultura: UNOPAR (Universidade do Norte do Paraná) e EPUEL (Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina). Para os espécimes da UNOPAR evidenciou-se a ocorrência de dois citótipos em simpatria, com  $2n = 40$  e  $2n = 42$  cromossomos M/SM. Os espécimes da EPUEL apresentaram um número diplóide de  $2n = 42$ , cromossomos com sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY. Foram localizadas RONS múltiplas em até três cromossomos, na região telomérica do braço longo nas duas populações, e a coloração com CMA<sub>3</sub> demonstrou diferentes marcações entre populações. A distribuição da heterocromatina foi semelhante nos espécimes das duas localidades, sendo encontrada principalmente na região pericentromérica, da maioria dos cromossomos e telomérica em alguns pares. Bandas-C, coradas com CMA<sub>3</sub>, evidenciaram dois sítios GC-ricos no braço longo, próximo ao centrômero, em todos os espécimes. Bandas-C coradas com DAPI, evidenciaram a natureza AT-rica da maioria das heterocromatinas.

## INTRODUÇÃO

As traíras, *Hoplias malabaricus*, são peixes carnívoros e predadores. Habitam de preferência ambientes lênticos de reservatórios e remansos de tributários, normalmente associada a vegetação aquática (Britto, 2003). Junto com os demais peixes da família Erythrinidae, estão inteiramente restritos à América do Sul, e distribuem-se na maioria das bacias hidrográficas desta região, enquanto que, as demais espécies do gênero *Hoplias* estão restritas à pequenas áreas. Além disso, representam uma importante fonte de alimento (Oyakawa, 2003).

Vários estudos citogenéticos têm sido realizados para entender a grande diversidade cariotípica da espécie. Tal diversidade cariotípica se associa a diferentes sistemas de cromossomos sexuais, e está refletida em sete citótipos distintos: A)  $2n = 42$  cromossomos M/SM; B)  $2n = 42$  cromossomos M/SM com sistema sexual simples do tipo XX/XY; C)  $2n = 40$  cromossomos M/SM; D)  $2n = 40$  cromossomos M/SM para fêmeas e 39 para machos, com sistema sexual  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ; E)  $2n = 42$  cromossomos com o primeiro par de cromossomos de grande tamanho e a presença de um cromossomo acrocêntrico no par número 6; F)  $2n = 40$  cromossomos M/SM sem diferenciação cromossômica sexual com uma grande diferença de tamanho para os dois primeiros pares cromossômicos; G)  $2n = 40$  cromossomos nas fêmeas e 41 nos machos, ou seja, correspondente a um sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> (BERTOLLO *et al.*, 2000). Dentre esses, o sistema XX/XY é o mais raro, sendo descrito apenas para a população do Parque Florestal do Rio Doce (Born & Bertollo, 2000) e no primeiro planalto do rio Iguaçu (Lemos *et al.*, 2002).

Outra característica importante é a ocorrência de diferentes citótipos em simpatria. Nove populações de *H. malabaricus* já estudadas apresentaram duas formas

diferentes de citótipos em áreas sobrepostas, sem descrição de formas híbridas. Dentre essas populações foram evidenciados em simpatria os citótipos A e F (1 população), C e F (1 população), E e G (1 população), A e D (2 populações), C e G (2 populações), e A e C (2 populações) (Bertollo et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi analisar citogeneticamente exemplares de *H. malabaricus* coletados em ambientes de cultivo, caracterizando possíveis diferenças cariotípicas encontradas nesses animais submetidos ao isolamento em tanques.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram analisados citogeneticamente 21 exemplares de *H. malabaricus*, provenientes de reservatórios de pisciculturas pertencentes a UNOPAR (Universidade do Norte do Paraná), Tamarana, Paraná(15 exemplares); e EPUEL (Estação de piscicultura da Universidade Estadual de Londrina), Londrina, Paraná (8 exemplares);

Para a obtenção das metáfases foram utilizadas as técnicas de *air drying* (Bertollo et al., 1978) e cultura de linfócitos (Fenocchio & Bertollo, 1988). Os estudos cariotípicos seguiram Levan et al. (1964), com algumas modificações. As regiões organizadoras de nucléolos foram evidenciadas por meio da técnica de impregnação pela prata (Howell & Black, 1980). Os sítios GC-ricos foram localizados pela Cromomicina A<sub>3</sub> (Christian et al., 1998). O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi determinado pela técnica de Sumner (1972), coradas com Giemsa e com fluorocromos AT e GC-específicos, DAPI e CMA<sub>3</sub> respectivamente.

## RESULTADOS

Para a população da UNOPAR foram encontrados dois citótipos em simpatria. Sete exemplares (6 fêmeas e 1 macho) apresentaram número diplóide de  $2n = 40$  cromossomos m/sm sem diferenciação sexual (Fig. 1a), enquanto que seis exemplares (4 fêmeas e 2 machos) apresentaram número diplóide de  $2n = 42$  cromossomos m/sm, para machos e fêmeas (Fig.1b). Dois exemplares, um macho e uma fêmea, não apresentaram definição do número diplóide.

A população da EPUEL apresentou um número diplóide de  $2n = 42$  cromossomos m/sm, para machos e fêmeas. Os machos apresentaram o quinto par cromossômico do tipo metacêntrico e sem homólogo enquanto que nas fêmeas isto não foi observado, caracterizando um sistema sexual do tipo XX/XY (Fig.2).

A impregnação por nitrato de prata evidenciou três cromossomos marcados telomericamente em ambas populações (Fig.3).

A coloração com fluorocromo GC-específico ( $CMA_3$ ) evidenciou diferentes marcações entre as populações. Na população da UNOPAR, um cromossomo apresentou uma forte banda no braço curto, próximo ao centrômero, e quatro cromossomos com marcas biteloméricas (Fig.4a). Na população da EPUEL foi observada uma banda pericentromérica em dois cromossomos submetacêntricos (Fig.4b).

A distribuição da heterocromatina foi semelhante nas duas populações, sendo encontrada principalmente na região centromérica da maioria dos cromossomos e telomérica em alguns. No quinto par cromossômico uma banda maior fortemente corada que se inicia na região pericentromérica foi observada em todos os citótipos (Fig.4c).

As bandas-C coradas com fluorocromo GC-específico (CMA<sub>3</sub>) evidenciaram dois cromossomos marcados no braço longo, pericentromericamente, nas duas populações (Fig. 4d). Bandas centroméricas e teloméricas AT-ricas foram evidenciadas com o fluorocromo DAPI (Fig. 4e).

## DISCUSSÃO

A grande diversidade existente dentro da espécie *H. malabaricus*, com sete citótipos caracterizados até o momento, faz com que haja a discussão sobre a existência de um complexo de espécies (Bertollo et al., 2000). Os números diplóide encontrados para a população da UNOPAR corroboram os dados obtidos por Bertollo et al. (1997) onde foram analisados exemplares com  $2n = 40$  cromossomos, e por Lopez & Fenocchio (1994) onde foram encontradas populações com números diplóides de  $2n = 40$  e  $42$  cromossomos.

Vários estudos dentro da ordem Characiformes revelam a existência de diferentes cariótipos em simpatria, tanto entre espécies diferentes do mesmo gênero, como em *Schizodon borelli* e *S. isognathum* (Martins & Galetti Jr, 1998) quanto em animais da mesma espécie, como é o caso de *Astyanax scabripinnis* (Souza et al., 1995, Maistro et al., 2000). A população da UNOPAR apresentou dois citótipos em simpatria,  $2n = 40$  cromossomos e  $2n = 42$  cromossomos M/SM. A ocorrência de citótipos em simpatria em *H. malabaricus* é relatada na literatura, sendo descrita em nove populações, ao longo do território brasileiro e na Argentina. Dentre essas populações, duas apresentaram o mesmo caso do presente trabalho, uma no igarapé Mindú em Manaus/AM e outra no rio Aguapey, Corrientes/Argentina (Lopes et al., 1998, Bertollo et al., 1997, 2000). Em nenhuma das descrições foram encontrados

híbridos, desta forma, é provável que entre elas deva existir algum tipo de isolamento reprodutivo, o que é um forte aspecto quanto a caracterização de espécies diferentes.

A ocorrência de sistemas sexuais é uma característica comum em *H. malabaricus*. Porém, dentre esses sistemas sexuais, apenas as populações do Parque Florestal do rio Doce e do primeiro planalto do rio Iguaçu, descritas até o momento, apresentaram um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY (Bertollo et al., 1979, Born & Bertollo, 2000, Lemos et al., 2002). O mesmo foi observado para a população da EPUEL, onde os machos apresentaram um heteromorfismo cromossômico, com o quinto par formado por um cromossomo metacêntrico de tamanho médio (X) e um submetacêntrico pequeno (Y), sendo esse ambiente lântico também, mas com um volume de água muito menor.

Segundo Bertollo et al. (1996), os Erythrinidae em geral apresentam as RONS localizadas em mais de um par cromossômico, com exceção do grupo *lacerdae*, sendo que em *H. malabaricus* ocorre uma predominância dessas seqüências em regiões teloméricas. Assim como Bertollo et al. (op cit.), Lopez & Fenocchio (1994) também observaram RONS em ambos os telômeros de alguns cromossomos e, Lopes et al. (1998) observou, além das RONS múltiplas, uma única metáfase com apenas um cromossomo marcado terminalmente. Todos os espécimes de *H. malabaricus*, da população da EPUEL e os dois citótipos da UNOPAR, estudados no presente trabalho, apresentaram as RONS múltiplas, localizadas terminalmente em três cromossomos. Citótipos com 40 cromossomos M/SM estudados por Bertollo et al. (1997) apresentaram até seis cromossomos marcados terminalmente, e os com 42 cromossomos sem diferenciação sexual e com sistema XX/XY apresentaram até sete cromossomos marcados terminalmente e em ambos os telômeros (Born & Bertollo, 2001).

Essa variação no número está relacionada com a atividade das proteínas nucleolares na intérfase precedente. Porém, a variação também quanto à localização dessas

RONs nos três gêneros da família, demonstra que essas regiões passaram por muitas mudanças durante sua evolução cariotípica (Bertollo, 1996). Estudos realizados por Born & Bertollo (2000) por meio da técnica de FISH, revelaram a presença de até 10 cromossomos marcados pela sonda de DNAr 18S, evidenciando sítios adicionais não detectados pela impregnação por nitrato de prata, inclusive no cromossomo X.

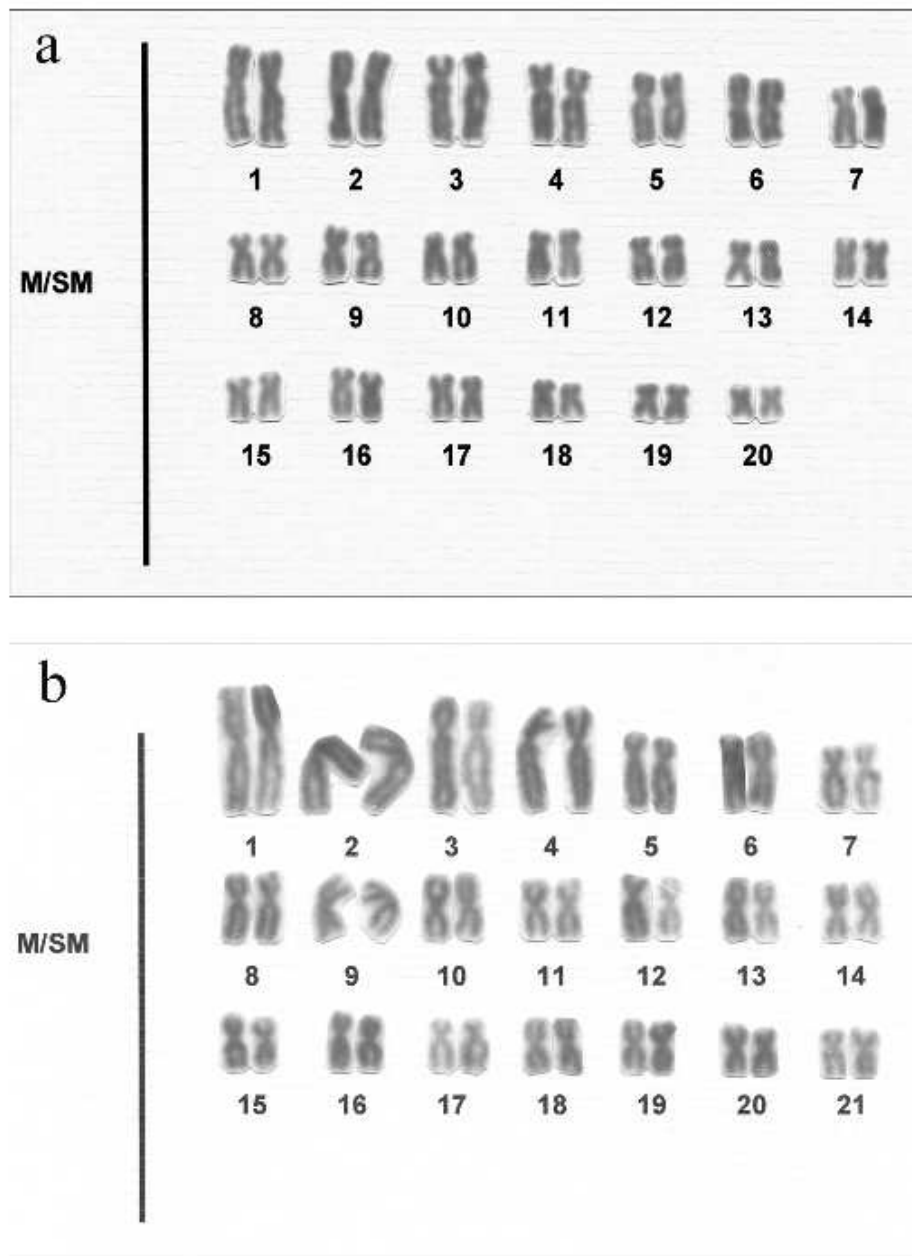
Em muitos peixes, é comum que as regiões organizadoras de nucléolos sejam ricas em GC, e postula-se que isso ocorra devido à posição intercalar da heterocromatina com as RONs (Pendás et al., 1993). Nos exemplares da população da UNOPAR, um cromossomo apresentou uma forte banda no braço curto, próximo ao centrômero, e quatro cromossomos com marcas biteloméricas. Provavelmente essa marca única seja resultante de uma pequena amplificação dessa região já existente. As marcas teloméricas são discretas e podem ter alguma relação com as RONs, porém, na população da EPUEL foi observada uma marca pericentromérica em dois cromossomos submetacêntricos não sendo coincidente com os cromossomos portadores das RONs. Estudos realizados por Vicari et al. (2005), em *H. malabaricus* provenientes dos rios Iguaçu, Tibagi (região centroeste do estado do Paraná), Ivaí e Ribeira, demonstram a existência de dois sítios  $CMA_3^+$ , semelhantes ao encontrados no presente trabalho para a população da EPUEL.

A predominância de bandas-C+ nas regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos e teloméricas em alguns, nos representantes de *H. malabaricus* das populações da UNOPAR e da EPUEL, corrobora os dados existentes na literatura (Bertollo et al., 1997), porém, o cromossomo X da população da EPUEL apresentou apenas uma forte banda heterocromática na região pericentromérica, diferentemente da população 42 XX/XY já estudada por outros autores, que apresentava uma forte banda terminalmente no braço longo (Born & Bertollo, 2000, 2001). De acordo com Dergam & Bertollo (1990) os Characiformes

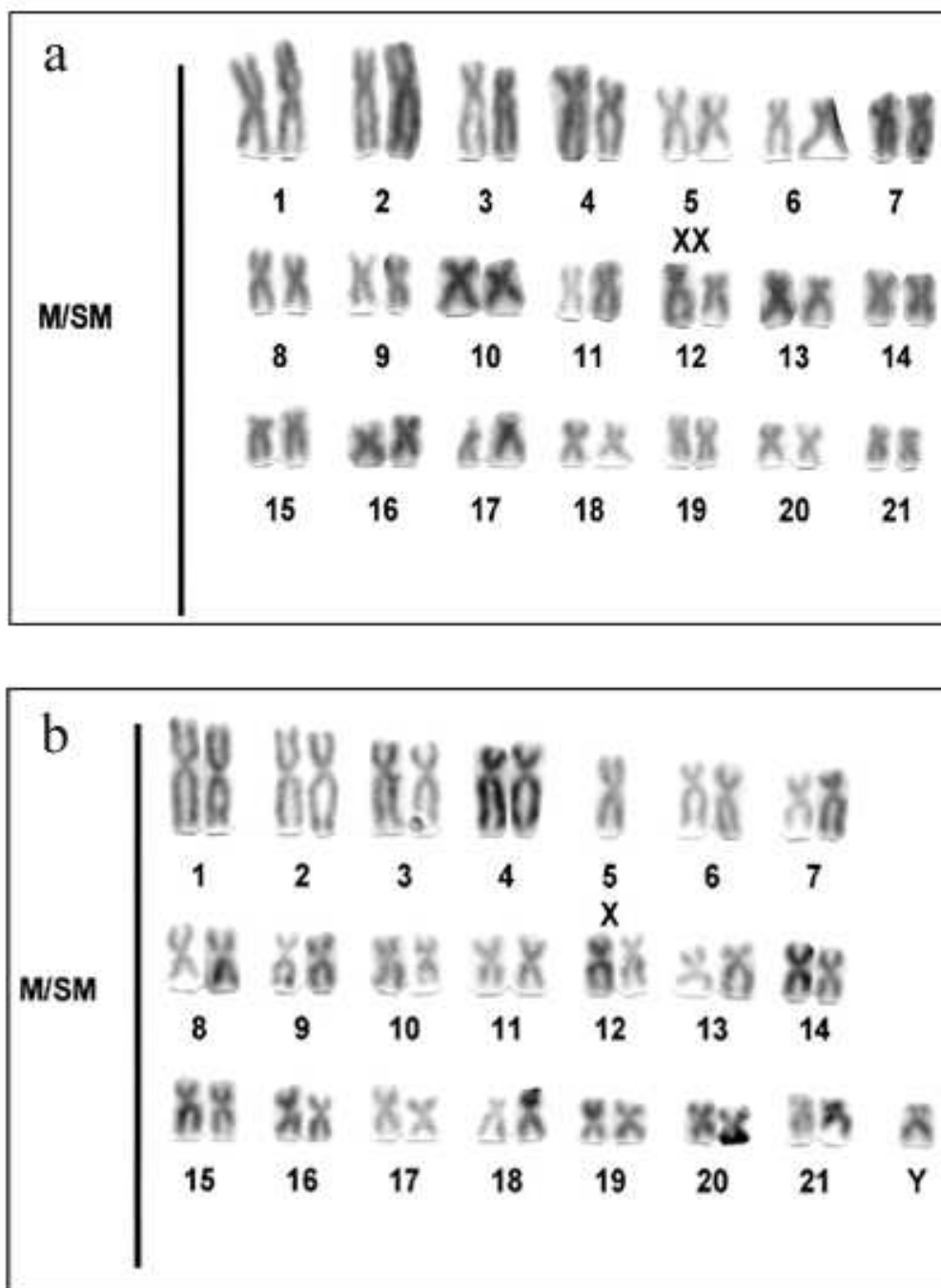
apresentam, em geral, uma predominância de bandas-C pericentroméricas, e, em peixes como os Anostomidae (Galetti Jr et al., 1991, Artoni et al., 1999), a distribuição dessa heterocromatina tem sido uma ferramenta importante para a compreensão da organização dos cariótipos.

A natureza química dessas bandas-C vem sendo analisada pela coloração com fluorocromos base-específicos. Deste modo, bandas que aparentemente são homogêneas pela coloração convencional, podem ser classificadas como GC ou AT-ricas, ou então como neutras. A coloração da banda-C com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou apenas duas bandas GC-ricas. Já a coloração com fluorocromo DAPI evidenciou quase todas as bandas pericentroméricas e alguma teloméricas sendo AT-ricas. Isso demonstra que, em ambas as populações ocorre uma predominância da heterocromatina rica em AT. Swarça et al. (2003) aplicando a mesma combinação de banda-C e fluorocromos em *Steindachneridion* sp. e *Ramdia quelen* verificaram que o pré-tratamento com hidróxido de bário relaxa a estrutura da cromatina e aumenta a afinidade dos fluorocromos a essas regiões.

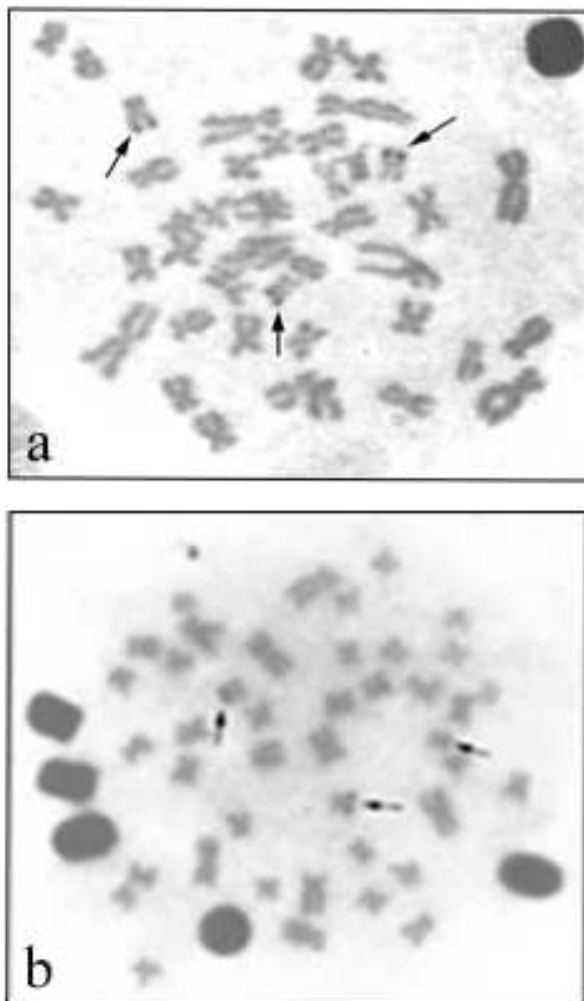
Os resultados encontrados no presente trabalho, demonstram a existência de diferentes citótipos de *H. malabaricus* na bacia do rio Tibagi, que permitem evidenciar dois citótipos em simpatria para uma população e outra com sistema sexual XX/XY, reforçando a idéia de que elas são espécies diferentes.



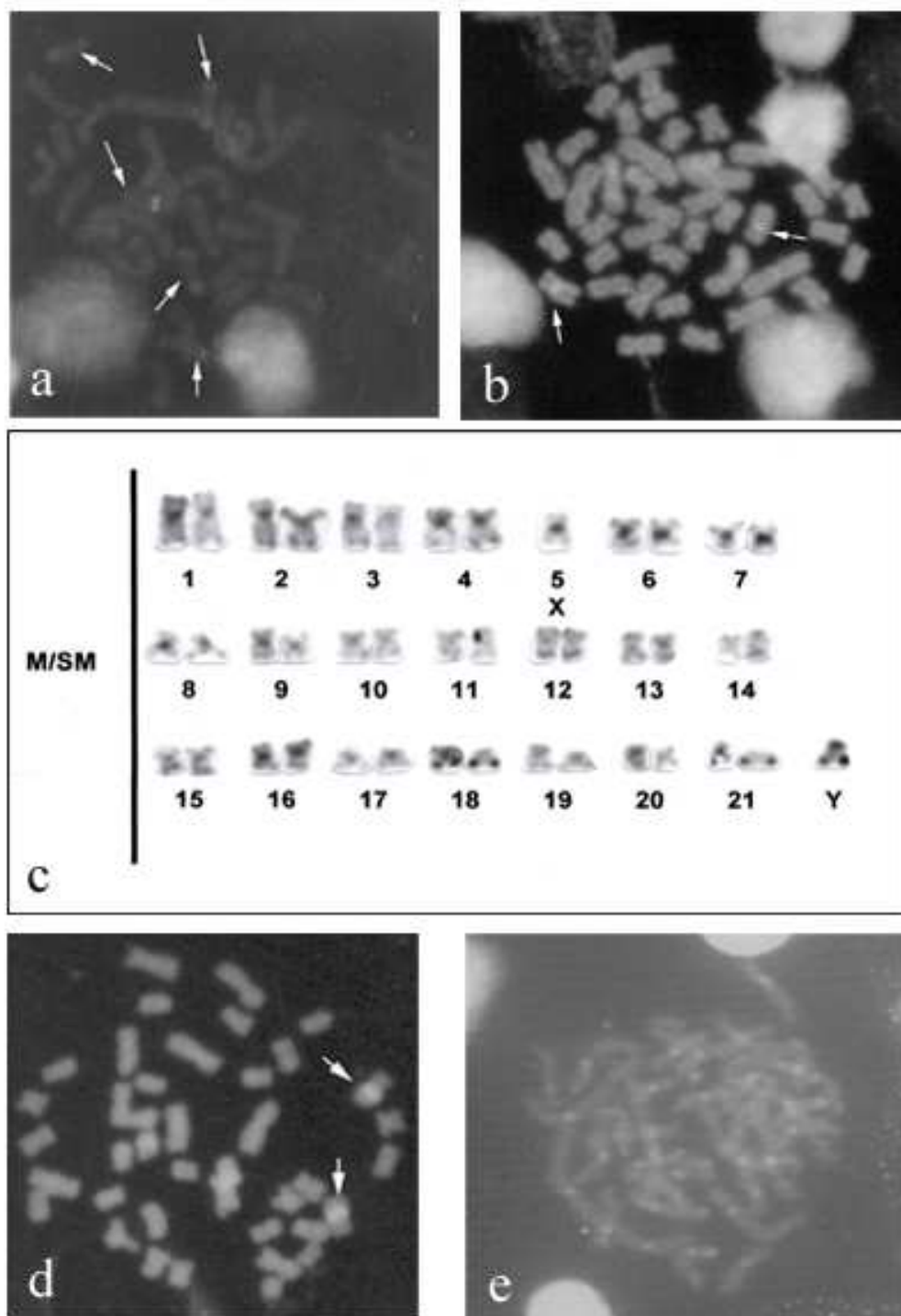
**Figura 1:** Cariótipos dos exemplares de *H. malabaricus* da UNOPAR: a)  $2n = 40$  cromossomos; b)  $2n = 42$  cromossomos.



**Figura 2:** Cariótipos dos exemplares da EPUEL: a) fêmea; b) macho.



**Figura 3:** Metáfases de *H. malabaricus* impregnadas com nitrato de prata: a) UNOPAR; b) EPUEL. As setas indicam as RONS.



**Figura 4:** Coloração com CMA<sub>3</sub>: a) UNOPAR; b) EPUEL; c) Bandamento-C; d) banda-C corada com CMA<sub>3</sub>; e) banda-C corada com DAPI.

## REFERÊNCIAS CITADAS

Artoni, R.F., W. F. Molina, L. A. C. Bertollo & P. M. Galetti Jr. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 22: 39-44.

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

Bertollo, L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1979. Karyotypic studies of two allopatric population of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* II: 17-37.

Bertollo, L.A.C. 1996. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* 61: 75-81.

Bertollo, L.A.C., O. Moreira-Filho & M.S. Fontes. 1997. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with  $2n = 40$  chromosomes. *Brazilian Journal of Genetic* 20: 237-242.

Bertollo, L.A.C., G.G. Born, J.A. Dergam, A.S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survei, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613.

Born, G.G. & L.A.C. Bertollo. 2000. An XX/XY sex chromosome in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*. 8: 111-118.

Born, G.G. & L.A.C. Bertollo. 2001. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. *Genetica* 110: 1-9.

Britto, S.G.C. 2003. Peixes do rio Paranapanema. Horizonte geográfico, São Paulo. 48pp.

Christian, A., E. McNeil, J. Robinson, R. Drabek, S. LaRue, C. Waldren & J. Bedford. 1998. A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82: 172-179.

Cuadrado, A. & N. Jouve. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-Triticale. *Chromosome Research* 2: 231-338.

Dergam, J.A. & L.A.C. Bertollo. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetic* 13: 755-766.

Fenocchio, A.S. & L.A.C. Bertollo. 1988. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética* 11: 847-852.

Galetti Jr., P.M., C.A. Mestriner, P.C. Venere & F. Foresti. 1991. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenetic Cell Genetic* 31: 116-121.

Heslop-Harrison, J.S., T. Schwarzacher, K. Ananthawat-Jonsson, A.R. Leitch, M. Shi & I.J. Leitch. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 106-109.

Howell, W.M. & D.A. Black. 1980. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

Levan, A., K. Fredga & A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Lopes, P.A., A.J. Alberdi, J.A. Dergam & A.S. Fenocchio. 1998. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey River (Province of Corrientes, Argentina). *Copeia* 2: 485-487.

Lopez, P.A. & A.S. Fenocchio. 1994. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). *Cytobios* 80: 217-221.

Maistro, E. L., C. Oliveira & F. Foresti. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 365-369.

Martins, C. & P. M. Galetti Jr. 1998. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. *Genetics and Molecular Biology* 21: 355-360.

Oyakawa, O.T. 2003. Family Erythrinidae (Trahiras). pp. 238-240. In: R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferrari Jr. (eds). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, EDIPUCRS, Porto Alegre.

Pendás, A.M., P. Morán & E. Garcia-Vázquez. 1993. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet* 63: 128-130.

Souza, I. L., O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) Complex II. Different cytotypes living in sympatry. *Cytologia* 60: 273-281.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

Swarça, A. C., A. S. Fenocchio, M. M. Cestari & A. L. Dias. 2003. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119: 87-92.

Vicari, M. R., R. F. Artoni & L. A. C. Bertollo. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology* 28: 103-110.

## **CAPÍTULO IV**

**CROMOSSOMOS Y DISTINTOS NO SISTEMA SEXUAL  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  EM  
DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* DO MÉDIO  
PARANAPANEMA.\***

\* Este artigo será submetido ao periódico Heredity

**CROMOSSOMOS Y DISTINTOS NO SISTEMA SEXUAL  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* DO MÉDIO PARANAPANEMA.**

**Renata da Rosa e Lucia Giuliano-Caetano**

Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

CEP 86051-990, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná, Brasil, (e-mail: giuliano@uel.br).

*Palavras-chave:* **sistemas sexuais, cromossomo Y, heterocromatinização, *Hoplias malabaricus*.**

*RESUMO*

Quatro populações de *H. malabaricus* provenientes da bacia do médio Paranapanema foram estudadas citogeneticamente. Em todas as populações, o número diplóide encontrado foi de  $2n= 40$  cromossomos M/SM para fêmeas e  $2n= 39$  cromossomos M/SM para machos, evidenciando um sistema sexual múltiplo do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ . As análises por impregnação pela prata revelaram RONS múltiplas com variação intra e inter populacional. A coloração com CMA<sub>3</sub> evidenciou diferentes quantidades de blocos GC-ricos entre as populações: um par cromossômico com um bloco intersticial nas populações do rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema; e três cromossomos com blocos intersticiais na população de Rancho Alegre. Os blocos heterocromáticos evidenciados pelo bandamento-C localizaram-se na região centromérica de todos os cromossomos e telomérica de alguns. Um par cromossômico apresentou uma forte banda no braço longo, a partir do centrômero, evidenciando o cromossomo X<sub>1</sub>. O cromossomo Y de Rancho Alegre apresentou grandes blocos heterocromáticos, do rio Vermelho pequenos blocos heterocromáticos e, as duas outras populações não apresentaram blocos intersticiais. Nas quatro populações apenas um par cromossômico apresentou bandas C/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, o restante das bandas centroméricas são AT-ricas. Através da morfologia e da estrutura química do cromossomo Y foi possível diferenciar as populações.

## INTRODUÇÃO

Há muito para se saber sobre a determinação sexual em peixes. Existem famílias de peixes de água doce, como Cichlidae e Curimatidae, que não apresentam, em muitos estudos realizados até o presente, cromossomos sexuais visíveis, sendo que essas famílias demonstram uma constância no número cromossômico e fundamental, exibindo um padrão conservativo de evolução cariotípica (Molina, 1995; Martins *et al.*, 1995).

De acordo com Moreira-Filho *et al.* (1993) as pesquisas sobre cromossomos sexuais tem aumentado nos últimos anos com a descrição de vários sistemas em diferentes espécies. A grande diversificação entre os peixes faz com que diferentes sistemas de determinação sexual sejam observados. Dentre os sistemas sexuais simples, são descritos os sistemas XX/XY para *Eigenmannia vierescens*, *Pseudotocinclus tietensis*, *Poecilia reticulata* e *Hoplias malabaricus*; e ZZ/ZW para várias espécies de Anostomidae, Characidae, uma espécie de Parodontidae, Prochilodontidae, Loricariidae e Poecilidae. Os sistemas sexuais múltiplos também são encontrados em diferentes espécies, sendo esses do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ,  $XX/XY_1Y_2$  e  $ZZ/ZW_1W_2$  (Almeida-Toledo e Foresti, 2001).

Na espécie *Hoplias malabaricus* ocorrem diferentes formas de diferenciação sexual cromossômica. Existem relatos de populações sem cromossomos sexuais detectáveis, sistemas sexuais simples do tipo XX/XY, e sistemas sexuais múltiplos dos tipos  $XX/XY_1Y_2$  e  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  (Bertollo *et al.*, 2000). É importante salientar que o sistema sexual XX/XY teria surgido por um processo de heterocromatinização na diferenciação dos homólogos, enquanto que os sistemas múltiplos provavelmente surgiram por rearranjos, como inversões pericêntricas e translocações (Bertollo *et al.* 1997; Almeida-Toledo e Foresti, 2001).

Neste trabalho, é demonstrada a estrutura cariotípica, a evidência de sistema de cromossomos sexuais e localização da heterocromatina em exemplares de *H. malabaricus*, pertencentes à diferentes localidades da bacia do médio Paranapanema.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas de *Hoplias malabaricus* foram feitas em quatro locais diferentes na bacia do médio Paranapanema: a) rio Vermelho – Bela Vista do Paraíso/PR (3 fêmeas e 2 machos); b) Rancho Alegre/PR (2 fêmeas e 2 machos); c) Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR (3 fêmeas e 2 machos); e d) rio Paranapanema – Iepê/SP (3 machos).

Os cromossomos metafásicos foram obtidos por meio das técnicas de *air drying* (Bertollo *et al.*, 1978) e cultura de linfócitos (Fenocchio e Bertollo, 1988). Os cromossomos foram caracterizados de acordo com Levan *et al.* (1964), com algumas modificações. A técnica de impregnação por nitrato de prata foi empregada para a localização das regiões organizadoras de nucléolos (Howell e Black, 1980). Os blocos GC-ricos foram evidenciados pela coloração com fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Christian *et al.*, 1994). O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi determinado pela técnica de Banda-C (Sumner, 1972). A natureza química das bandas-C foi determinada por meio da coloração com fluorocromos AT e GC-específicos, DAPI e CMA<sub>3</sub> respectivamente, após o bandamento-C.

## RESULTADOS

### *Coloração convencional por Giemsa*

As populações do rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema, apresentaram um número diplóide de  $2n = 40$  cromossomos para fêmeas e  $2n = 39$  cromossomos para os machos (Fig. 1), todos do tipo m/sm, caracterizando um sistema sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  (Fig. 2).

### *Impregnação pelo nitrato de prata*

Para a população do rio Vermelho foram localizados até 6 cromossomos marcados terminalmente. Os núcleos apresentaram até 5 nucléolos evidenciados (Fig. 3a e b, respectivamente). Nos exemplares pertencentes à população de Rancho Alegre até 5 cromossomos apresentaram-se impregnados pela prata. Nesta população os núcleos apresentaram até 9 marcas (Fig. 3c e d, respectivamente). Na população do ribeirão Três Bocas também foram evidenciados até 5 cromossomos marcados, porém os núcleos apresentaram até 7 nucléolos evidenciados (Fig. 3e e f, respectivamente). Nos indivíduos do rio Paranapanema foram localizadas 9 marcas teloméricas em 9 cromossomos, os núcleos apresentaram 13 marcas impregnadas pela prata (Fig. 3g e h, respectivamente).

### *Fluorocromos base-específicos*

Nas populações do rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema foi observada uma marca pericentromérica em dois cromossomos submetacêntricos (Fig. 4a). Já na população de Rancho Alegre, foram observados três cromossomos submetacêntricos com marcas pericentroméricas (Fig. 4b).

### *Bandamento-C*

Todas as populações apresentaram uma distribuição semelhante da heterocromatina. Esta se concentrou principalmente na região centromérica da maioria dos cromossomos e telomérica em alguns. Todas as populações apresentaram, no braço longo do sexto par cromossômico, um bloco maior fortemente corado que se inicia na região pericentromérica. Este cromossomo corresponde ao  $X_1$ , enquanto que o  $X_2$  não apresentou nenhuma marcação que o caracterizasse, sendo apenas evidenciado por meio de sua forma e tamanho (Fig. 5a).

Nos machos da população do rio Vermelho o cromossomo Y apresentou pequenos blocos heterocromáticos nos telômeros, centrômeros e no braço longo (Fig. 5b). Os machos de Rancho Alegre, apresentaram o cromossomo Y com uma forte banda no braço curto próxima ao centrômero, e duas bandas uma relativamente grande e outra menor no braço longo (Fig. 5c). Nos machos do ribeirão Três bocas e do rio Paranapanema as bandas no cromossomo Y foram apenas pericentroméricas (Fig. 5d e e).

A coloração das bandas-C com fluorocromo GC-específico ( $CMA_3$ ) evidenciou dois cromossomos marcados no braço longo, próximo ao centrômero, em todas as populações (Fig. 5f). As demais bandas foram evidenciadas com fluorocromo AT-específico DAPI (Fig. 5g).

## DISCUSSÃO

Os dados citogenéticos apresentados neste trabalho, com a existência de um citótipo com  $2n = 40$  cromossomos para as fêmeas e 39 cromossomos para os machos, evidenciam um sistema sexual múltiplo do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ , de modo a concordar com o citótipo D encontrado em dez populações de *Hoplias malabaricus* já estudadas (Bertollo *et al.*, 2000). É importante lembrar que a fórmula cariotípica da população do ribeirão Três Bocas já havia sido descrita por Bertollo *et al.* (2000), porém não foram realizadas outras técnicas citogenéticas na mesma.

Outras espécies de peixes apresentam o mesmo tipo de sistema sexual. Dentro da ordem Gymnotiformes são relatados em *Eignmannia* (Almeida-Toledo *et al.*, 1984, 2000) e *Gymnotus* (Silva; Margarido, 2005). Outros casos ocorrem em *Brachyhyppopomus* e em uma espécie de Cyprinodontidae e de Goodeidae (Almeida-Todeldo; Foresti, 2001). Já na família Erythrinidae, além do gênero *Hoplias*, o mesmo tipo de sistema sexual foi evidenciado no gênero *Erythrinus*. De seis populações pertencentes à espécie *E. erythrinus* analisadas citogeneticamente, três apresentaram sistema sexual  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  (Bertollo *et al.*, 2004). Esses dados demonstram que esse tipo de determinação sexual é comum dentro da família.

Bertollo *et al.* (1997), por meio do estudo com bandas-C, G, e bandas de replicação, identificaram os rearranjos que permitiram a formação desse tipo de sistema sexual em *H. malabaricus*. Um evento de translocação foi associado com a origem do sistema sexual, onde o cromossomo Y apresentou similaridade com os cromossomos  $X_1$  e  $X_2$ .

Assim como em *Astyanax scabripinnis*, onde as RONS apresentam uma grande variação, tanto inter quanto intrapopulacional (Mizoguchi; Martins-Santos, 1998), os representantes das quatro populações de *H. malabaricus* da bacia do médio Paranapanema

apresentaram a mesma variação. Diferenças no número das RONS entre as populações reflete uma característica importante entre os representantes do gênero *Hoplias*, podendo variar entre indivíduos da mesma espécie com localização nas regiões teloméricas dos cromossomos. Variação no número, assim como uma constância dentro de certas populações, pode representar uma característica populacional (Bertollo, 1996).

A contagem dos nucléolos auxiliou na determinação das RONS, pois em alguns casos, como na população de Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema, o número maior de nucléolos em relação às RONS encontradas nas metáfases, indica sítios adicionais não evidenciados nos cromossomos metafásicos. Além disso, em Erythrinidae há uma característica que dificulta a visualização e conseqüente contagem das RONS, pois elas apresentam um tamanho reduzido que, em alguns casos, assemelham-se à pequenos pontos (Bertollo, 1996).

Segundo Schimid (1980), os fluorocromos GC-específicos em peixes e anfíbios, evidenciam as regiões organizadoras de nucléolos independentemente da atividade transcricional. Entretanto, outras seqüências cromossômicas ricas em sítios GC podem ser também evidenciadas por fluorocromos. Diferentemente de outras espécies de peixes como *Parodon* (Vicente *et al.*, 2001), *Apareiodon* (Jesus e Moreira-Filho, 2000), *Brycon* e *Salminus* (Margarido e Galetti Jr, 1999), entre outros, *H. malabaricus* não apresentou similaridade das RONS com os sítios ricos em GC. Esse sítios localizaram-se igualmente em dois cromossomos submetacêntricos nas populações do rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema. O mesmo foi observado em exemplares da mesma espécie provenientes dos rios Iguaçu, Tibagi (região centroeste do estado do Paraná), Ivaí e Ribeira (Vicari *et al.*, 2005). Na população de Rancho Alegre, foram observados três cromossomos

submetacêntricos com marcas pericentroméricas. Essa diferenciação, talvez possa ser proveniente de uma pequena amplificação de um segmento rico em GC pré-existente.

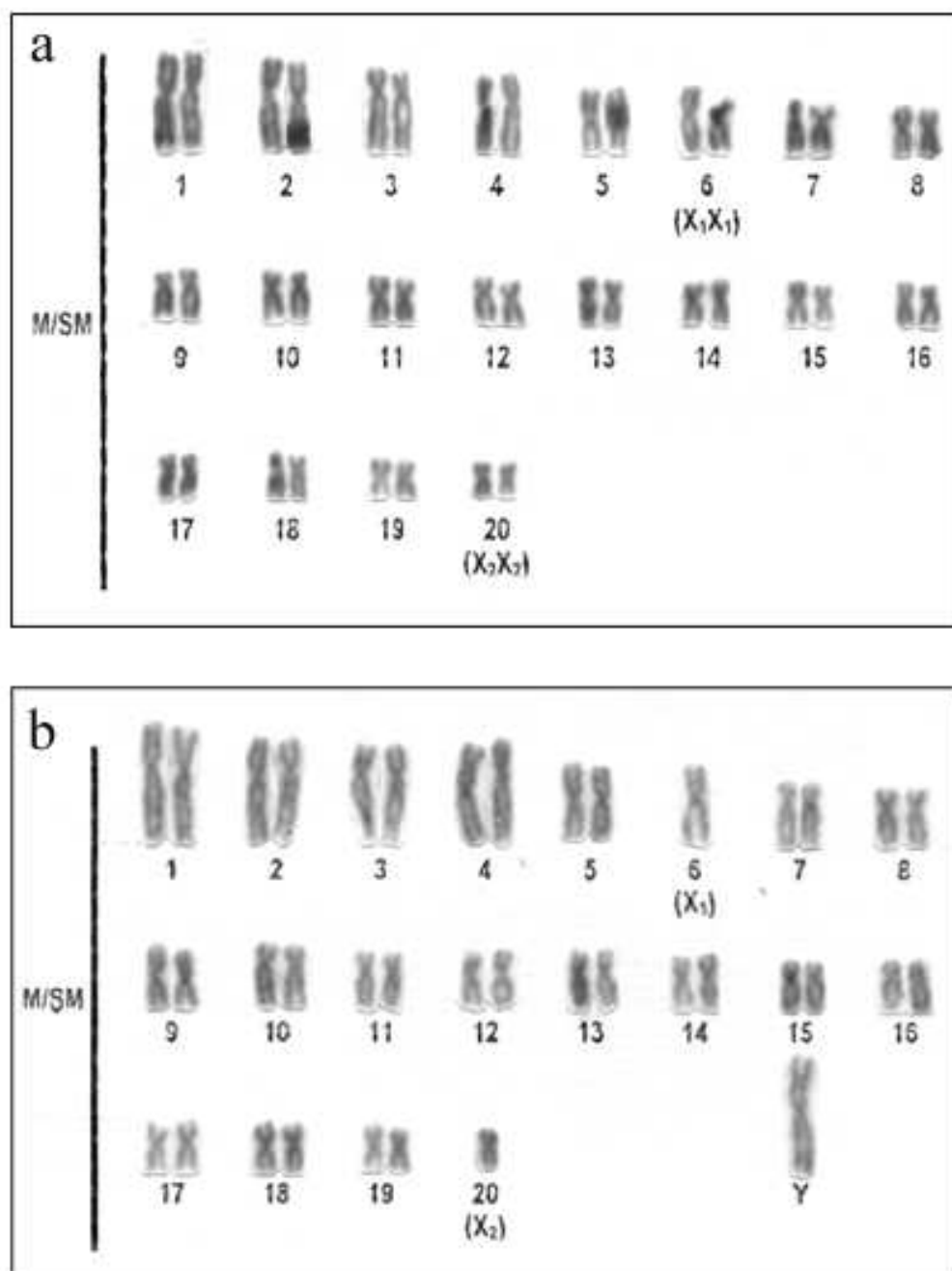
A heterocromatina é composta por um material densamente condensado tipicamente localizado nas regiões teloméricas e pericentroméricas dos eucariotos superiores (Zhimulev e Belyaeva, 2003). Isso foi observado para todas as populações de *H. malabaricus* do médio Paranapanema, sendo essas bandas bem evidentes nessas regiões. A localização dessas bandas corrobora outros estudos que revelam essa característica para a espécie. Nesse caso, as bandas teloméricas podem coincidir com as RONS, já que estas também são teloméricas e múltiplas (Bertollo *et al.*, 1997; Vicari *et al.*, 2003). A coloração da banda-C com o fluorocromo GC-específico CMA<sub>3</sub> evidenciou apenas duas bandas ricas em bases GC, já a coloração com fluorocromo DAPI evidenciou a maioria das bandas pericentroméricas e alguma teloméricas, ou seja, em todas as populações, as regiões pericentroméricas heterocromáticas são ricas em AT. Esse tipo de coloração vem sendo empregada para a determinação da natureza química dessas bandas, de modo a diferenciar bandas que são homogêneas quando observadas na coloração com Giemsa (Swarça *et al.*, 2003).

Todas as populações apresentaram uma forte banda heterocromática no sexto par cromossômico, que se inicia na região pericentromérica e prolonga-se pelo braço longo. Esse cromossomo corresponde ao X<sub>1</sub>. O padrão de distribuição da heterocromatina no cromossomo Y dos machos de Rancho Alegre, é semelhante ao descrito para a população do rio Mogi Guaçu (Bertollo *et al.*, 1997), com fortes blocos heterocromáticos distribuídos nas regiões centromérica e intersticiais. Na população do rio Vermelho, o cromossomo Y apresentou pequenos blocos heterocromáticos em ambos os braços, sendo no braço longo na posição intersticial e no braço curto próximo ao centrômero, além das bandas teloméricas. Este pode estar em início do processo de heterocromatinização. Os indivíduos do ribeirão

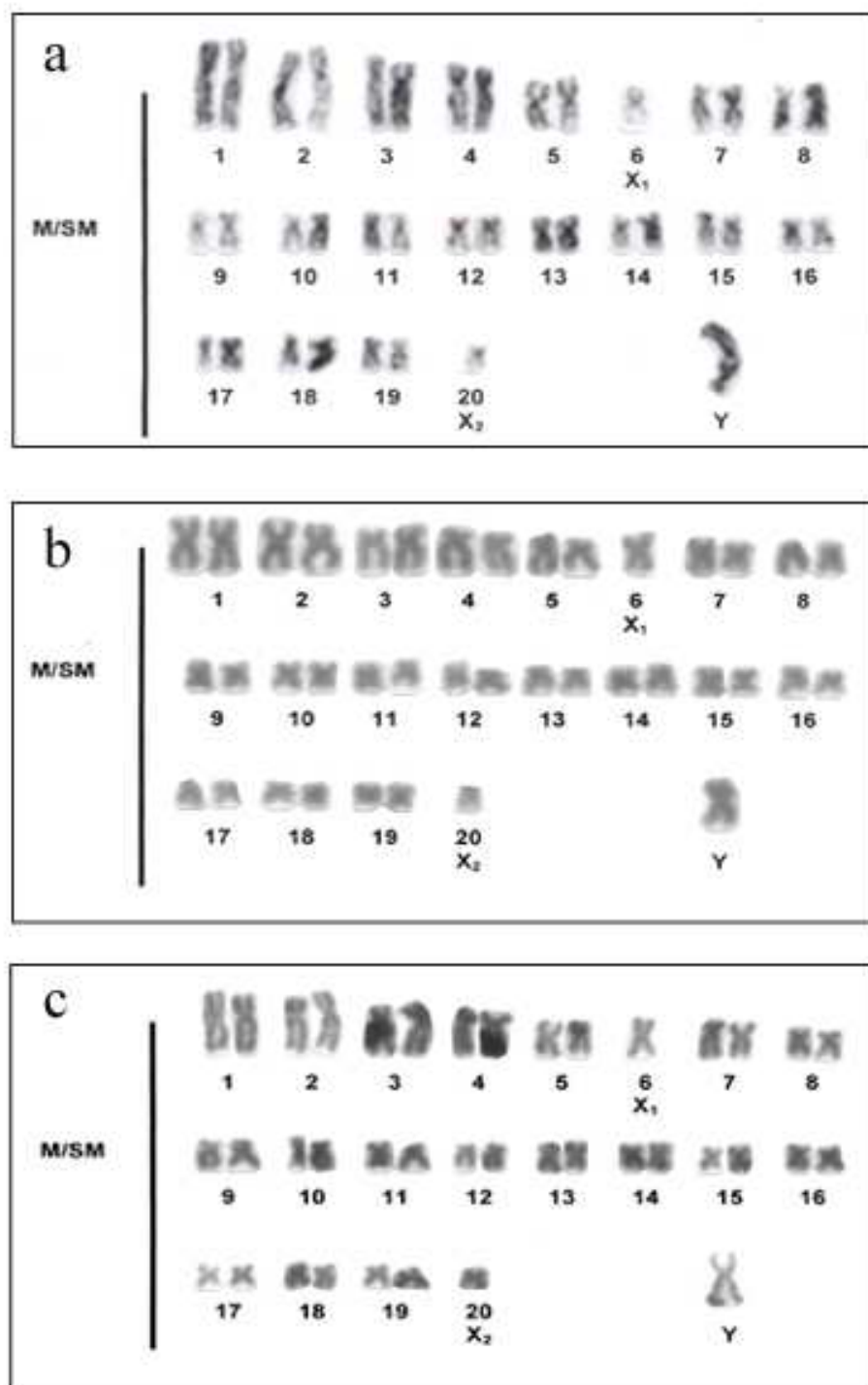
Três Bocas e do rio Paranapanema não apresentam blocos heterocromáticos nos braços do cromossomo Y, apresentando somente a marcação centromérica.

Os processos de heterocromatinização estão provavelmente associados com a diferenciação de sistemas sexuais. Várias famílias de peixes, com sistema ZZ/ZW apresentam essa heterocromatinização diferencial em cromossomos sexuais, dentre elas Anostomidae (Galetti Jr e Foresti, 1986), Loricariidae (Andreati *et al.*, 1993) e Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1993). No caso das populações de *H. malabaricus* analisadas, possivelmente o cromossomo Y esteja em processo de heterocromatinização diferenciado, onde a população de Rancho Alegre apresenta uma situação mais avançada e onde ribeirão Três Bocas e Paranapanema o processo não se iniciou.

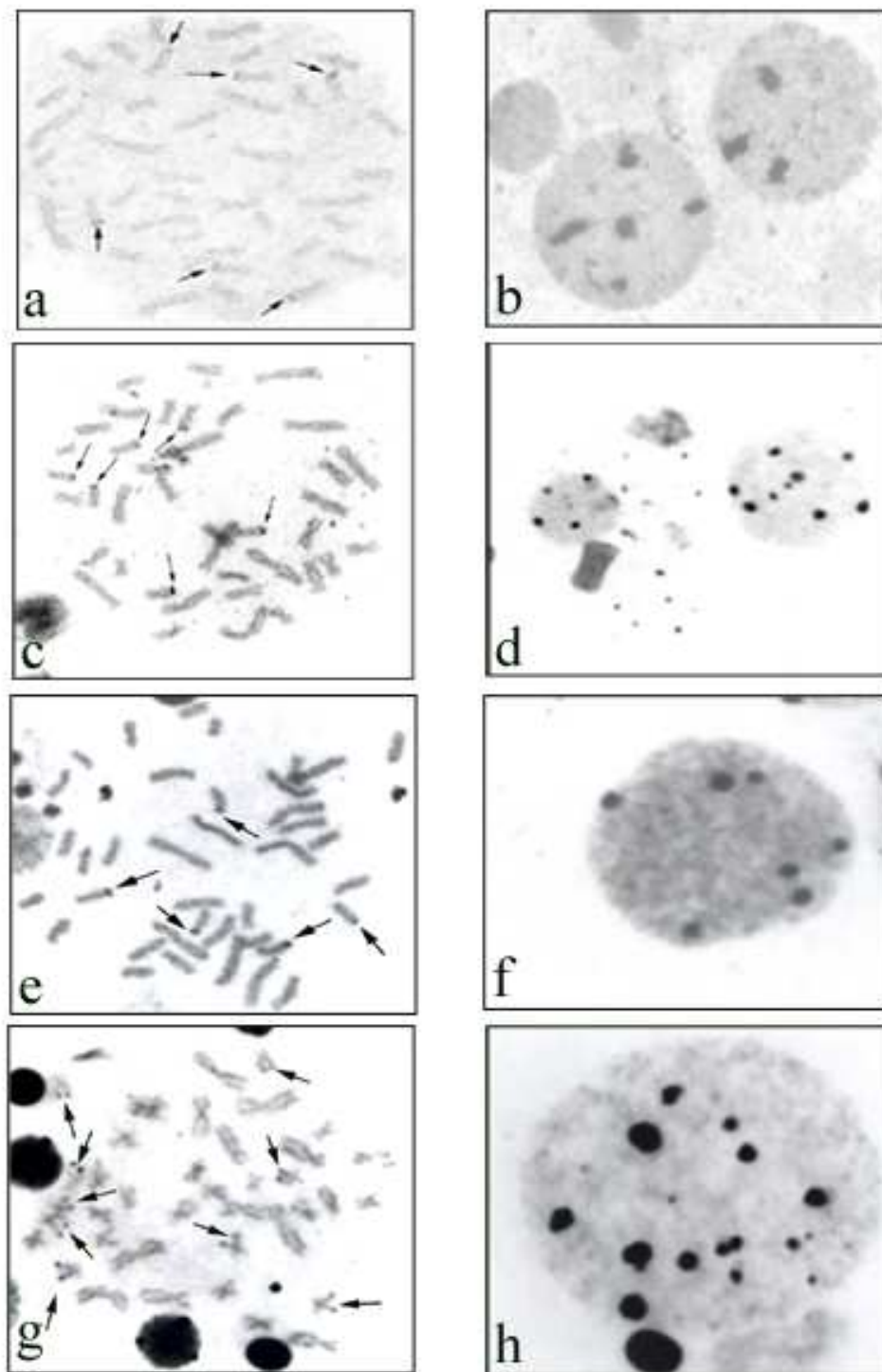
Por outro lado, as populações apresentam formas diferentes do cromossomo Y, devido principalmente a rearranjos estruturais ocorridos. Levando-se em consideração a distribuição da heterocromatina e a morfologia dos cromossomos Y observados, eles apresentaram diferenças bastante acentuadas, discriminando cada população.



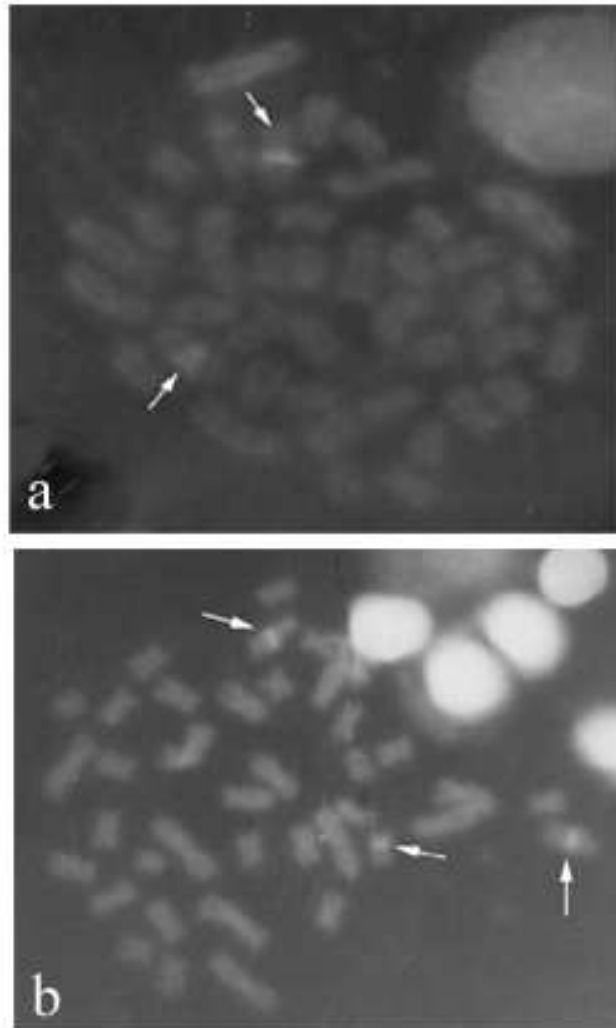
**Figura 1:** Cariótipo dos exemplares de *H. malabaricus* da população do rio Vermelho: a) fêmea; b) macho.



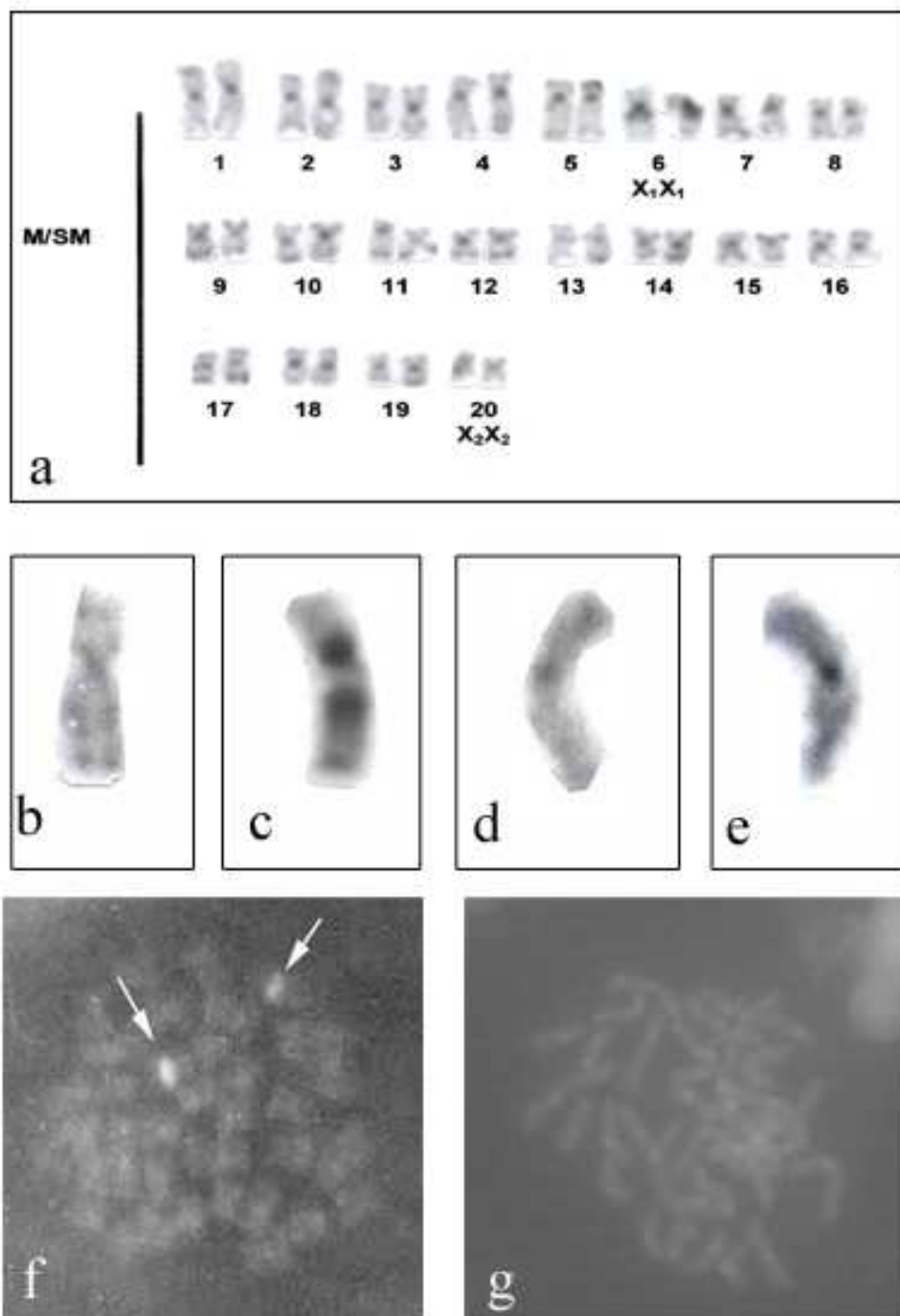
**Figura 2:** Cariótipos dos machos de *H. malabaricus*: a) Paranapanema; b) Rancho Alegre; c) ribeirão Três Bocas.



**Figura 3:** Metáfases e núcleos de *H. malabaricus* marcados por AgNO<sub>3</sub>: a e b) rio Vermelho; c e d) Rancho Alegre; e e f) ribeirão Três Bocas; g e h) rio Paranapanema.



**Figura 4:** Blocos GC-ricos evidenciados pela CMA3: a) rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema; b) Rancho Alegre.



**Figura 5:** a) Banda-C dos exemplares de *H. malabaricus* de diferentes populações; b) cromossomo Y dos machos do rio Vermelho; c) cromossomo Y dos machos de Rancho Alegre; d) cromossomo Y dos machos do ribeirão Três Bocas; e) cromossomo Y dos machos do rio Paranapanema; f) banda-C corada com CMA3; g) banda-C corada com DAPI.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1984). Complex Sex chromosome system in *Eigenmannia* sp (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica* 64: 165-169,

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA (2000). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma* 109: 197-200.

Almeida-Toledo LF, Foresti F (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111: 91-100.

Andreato AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1993). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW sex chromosome system, B-chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetic Cell Genetic* 63: 215-220.

Bertollo LAC (1996). The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* 61: 75-81.

Bertollo LAC, Born GG, Dergam JÁ, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survei, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613.

Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997). The X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research* 5: 493-499.

Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcão JN, Fenocchio AS (2004). Chromosome evolution in the erythinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93: 228-233.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* I: 103-120.

Christian A, McNeil E, Robinson J, Drabek R, LaRue S, Waldren C & Bedford J (1998). A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82: 172-179.

Cuadrado A, Jouve N (1994). Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-Triticale. *Chromosome Research* 2: 231-338.

Fenocchio AS, Bertollo LAC (1988). A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genetica* 11: 847-852.

Galetti Jr. PM, Foresti F (1986). Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenetic Cell Genetic* 43: 43.

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ (1991). *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 106-109.

Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

Jesus CM, Moreira-Filho O (2000). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia* 65: 397-402.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Margarido VP, Galetti Jr PM (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 22: 357-361.

Martins IC, Portella-Castro ALB, Julio-Jr HF (1995). Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Parana river. *Cytologia* 60: 223-231.

Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC (1998). Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). *Cytologia* 63: 259-265.

Molina WF (1995). Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Msc Thesis, Universidade Federal de São Carlos.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *P. hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125.

Schmid M (1980). Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.

Silva EB, Margarido VP (2005). Na  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73: 293-297.

Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2003). Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119: 87-92.

Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2005). Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology* 28: 103-110.

Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetic and Genome Research* 101: 24-28.

Vicente VE, Jesus CM, Moreira-Filho O (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three Parodon species (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 54: 365-369.

Zhimulev IF, Belyaeva ES (2003). Heterochromatin, position effect, and genetic silencing. *Russian Journal of Genetics* 39: 133-146.

## **CAPÍTULO V**

### **CITOTAXONOMIA EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Hoplias aff. malabaricus* DA REGIÃO MÉDIA DO RIO PARANAPANEMA.\***

\* Este artigo será submetido à revista Neotropical Ichthyology

**CITOTAXONOMIA EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Hoplias aff. malabaricus* DA REGIÃO MÉDIA DO RIO PARANAPANEMA.**

**Renata da Rosa<sup>1</sup>, Mauro Caetano-Filho<sup>2</sup>, Oscar Akio Shibatta<sup>2</sup> e Lucia Giuliano-Caetano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

CEP 86051-990, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná, Brasil (e-mail: giuliano@uel.br).

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal e Vegetal, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

**RESUMO**

Análises morfométricas foram feitas em 40 exemplares de *H. malabaricus* provenientes de seis populações diferentes da região média da bacia do Paranapanema. Também foram feitas medições em um exemplar proveniente do Suriname. Vinte variáveis morfológicas foram avaliadas. Com essas medidas foi realizada a análise das variáveis canônicas e a análise de proporções em relação ao comprimento padrão e ao comprimento da cabeça. As medidas mais contrastantes entre os exemplares foram o COM (comprimento do osso maxilar) e a DPD (distância pré-dorsal). A análise das variáveis canônicas evidenciou a formação de três grupos distintos formados por: (1) ribeirão Três Bocas; (2) Rancho Alegre + rio Vermelho + UNOPAR; e (3) EPUEL + rio Paranapanema. Os valores apresentaram 79,38% de proximidade ao eixo canônico 1. A análise da tabela de proporções evidenciou uma grande diferença entre as populações e destas com o do Suriname. O fato desta última apresentar-se diferente das demais reforça a idéia de que elas não pertencem à espécie *H. malabaricus*.

**Palavras-chave:** *Hoplias malabaricus*, complexo de espécies, morfometria, variáveis canônicas, proporções corporais.

## INTRODUÇÃO

A família Erythrinidae é relativamente pequena entre os Characiformes. Seus representantes, em geral, são predadores de hábito carnívoro. Apresentam o corpo grosso, nadadeira caudal arredondada, dentes caniniformes na maxila superior e inferior, alguns muito pequenos no palato e algumas vezes sobre a língua. Não possuem nadadeira adiposa nem fontanela (Britski *et al.*, 1988).

É uma família composta por três gêneros distribuídos na região neotropical e endêmicos à região neotropical: *Erythrinus* Scopoli, 1777; *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903. *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* são conhecidos popularmente por “jejus”. O gênero *Hoplerythrinus* é composto por três espécies: *H. cinereus* Gill, 1858; *H. gronovii* Valenciennes, 1847; e *H. unitaeniatus* Agassiz, 1829, que possuem uma ampla distribuição na região neotropical, com hábito de vida mais sedentário e não migrador, formando populações isoladas, muitas vezes em lagos e/ou lagoas marginais. É um gênero facilmente distinguível dos demais da família, por apresentar uma mancha em forma de ponto na região postero-dorsal do opérculo e uma listra preta ao longo do corpo. O gênero *Erythrinus* é representado pelas espécies *E. erythrinus* Bloch & Schneider, 1801 e *E. kessleri* Steindachner, 1876; e distribuem-se na América do Sul e nos rios brasileiros do estado da Bahia, respectivamente (Oyakawa, 2003; Bertollo *et al.*, 2004).

O gênero *Hoplias* compreende os animais conhecidos como traíras e trairões. Se distingue dos outros dois da família por apresentar dentes caninos no maxilar e na porção anterior e posterior do dentário. Possuem a nadadeira ventral com oito raios e a anal com 10 a 12 raios (Britski *et al.*, 1988). De acordo com Oyakawa (2003) o gênero *Hoplias* é composto por nove espécies morfológicamente semelhantes: *H. aimara* Valenciennes, 1847;

*H. brasiliensis* Agassiz, 1829; *H. lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908; *H. macrophthalmus* Pellegrin, 1902; *H. malabaricus* Bloch, 1974; *H. microcephalus* Agassiz, 1829; *H. microlepis* Günther, 1864; *H. patana* Valenciennes, 1847 e *H. teres* Valenciennes, 1847.

*H. malabaricus* ocorre em rios de quase todo território sulamericano. São encontrados na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela, sendo a localidade-tipo da espécie no Suriname (Oyakawa, 2003).

A espécie *H. malabaricus* tem sido alvo de uma gama de estudos moleculares e citogenéticos. Esses estudos revelam uma grande diversidade cariotípica, com sete citótipos descritos até o momento (Bertollo *et al.*, 2000), de forma que é sugerido a existência de um complexo de espécies. Assim, este trabalho tem por objetivo analisar morfometricamente exemplares de *H. malabaricus* provenientes de diferentes locais da bacia do médio Paranapanema, apresentando as diferenças entre as populações e fornecendo base para essas discussões.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os exemplares de *Hoplias* aff. *malabaricus* foram coletados em diferentes locais da região média da bacia do rio Paranapanema: a) sistema hídrico do rio Claro (UNOPAR) – Tamarana/PR (15 exemplares); b) EPUEL – Estação de piscicultura da UEL – Londrina/PR (8 exemplares); c) rio Vermelho – Bela Vista do Paraíso/PR (5 exemplares); d) Rancho Alegre/PR (4 exemplares); e) ribeirão Três Bocas – Londrina/PR (5 exemplares); f) rio Paranapanema – Iepê/SP (3 exemplares), e um exemplar de *H. malabaricus* proveniente do Suriname.

Foram avaliadas 20 variáveis morfológicas, tomadas ponto a ponto do lado esquerdo do animal, as medidas foram feitas com o auxílio de paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm. As abreviações das medidas foram: comprimento padrão (CP); comprimento da cabeça (CC); comprimento do tronco (CT); altura da cabeça (AC); comprimento do focinho (CF); largura do focinho (LF); diâmetro orbital (DO); espaço interorbital (EIO); comprimento do osso maxilar (COM); comprimento da nadadeira peitoral (CNP); comprimento da nadadeira ventral (CNV); comprimento da nadadeira anal (CNA); comprimento da base da nadadeira anal (CBA); comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD); distância pré-ventral (DPV); distância pré-dorsal (DPD); distância pré-anal (DPA); altura do pedúnculo caudal (APC); comprimento do pedúnculo caudal (CPC); distância da linha lateral à base da nadadeira dorsal (LLBD).

Para a análise das variáveis canônicas foi utilizado o programa estatístico PaSt (Paleontological Statistics).

Algumas medidas foram expressas em porcentagem com relação ao comprimento padrão, e as medidas da cabeça foram expressas em porcentagem com relação ao comprimento da cabeça.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células renais e submetidos à técnica de *air drying* (Bertollo *et al.*, 1978) e por cultura de linfócitos (Fenocchio; Bertollo, 1988). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a relação dos braços (Levan *et al.*, 1964).

## RESULTADOS

Os dados morfométricos de *Hoplias* aff. *malabaricus* estão expressos na tabela 1. As medidas mais contrastantes entre os exemplares foram o COM e a DPD.

A análise das variáveis canônicas evidenciou a formação de três grupos distintos formados por: (1) ribeirão Três Bocas; (2) Rancho Alegre + rio Vermelho + UNOPAR; e (3) EPUEL + rio Paranapanema. Os valores apresentaram 79,38% de proximidade ao eixo canônico 1 (Fig. 1).

A análise da tabela de proporções evidenciou uma grande diferença entre as populações e principalmente diferenças das populações com o tipo. O exemplar proveniente do Suriname não demonstrou diferenças em relação às populações quanto ao CC, CF, EIO, AC, CNP, e LLBD. As outras 16 medidas foram contrastantes na maioria das populações (Tabela 2).

Nos estudos citogenéticos foram encontrados para a população do rio Claro (UNOPAR) dois citótipos em simpatria. Sete exemplares (6 fêmeas e 1 macho) apresentaram número diplóide de  $2n = 40$  cromossomos M/SM. Enquanto que seis (4 fêmeas e 2 machos) exemplares apresentaram número diplóide de  $2n = 42$  cromossomos M/SM para machos e fêmeas. A população da EPUEL apresentou um número diplóide de  $2n = 42$  cromossomos M/SM para machos e fêmeas. As fêmeas apresentaram o quinto par cromossômico composto por dois cromossomos metacêntricos de tamanhos iguais enquanto que os machos apresentaram somente um cromossomo médio no quinto par e um cromossomo submetacêntrico de tamanho pequeno.

As populações do rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema, apresentaram um número diplóide de  $2n = 39$  cromossomos para os machos e

$2n = 40$  cromossomos para fêmeas, todos do tipo M/SM. Sendo que na população do rio Paranapanema foram coletados apenas machos, apresentando sistema sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2 / X_1 X_2Y$ .

## DISCUSSÃO

Os animais pertencentes à Ordem Characiformes são, dentre os Ostariophysis, os peixes com maior diversidade morfológica. Eles apresentam um grande desenvolvimento do formato do corpo, estruturas maxilares, dentição e anatomia interna. Essa diversidade morfológica, associada a outros fatores, tem sido uma fonte valiosa de informações quanto a questão filogenética. Porém, essa amplitude da variação morfológica também dificulta os estudos sobre a ordem, já que se estima que ela seja composta por mais de 1300 espécies. Os parentescos da ordem são pobremente conhecidos, e devido a esse fato a monofilia de muitos grupos é incerta. Porém, sabe-se que uma evolução convergente é comum, e as classificações destes animais são feitas então com base em revisões sobre a descrição das famílias (Nelson, 1994).

Por ser um grupo de peixes estritamente de água doce, os Characiformes tem se tornado ao longo do tempo um foco interessante nas hipóteses sobre a história da biogeografia da fauna de água doce. Uma grande evidência está ligada ao fato de que eles são fisiologicamente vulneráveis a água salgada, por isso acredita-se que a dispersão transoceânica não tenha ocorrido nesse grupo. Devido a sua localização nas regiões africana e neotropical, deduz-se que eles tenham surgido no período anterior à separação da Gondwana, ou seja, aproximadamente 115-100 milhões de anos atrás (Buckup, 1998).

A morfometria constitui uma ferramenta importante na extração de informações sobre materiais e processos biológicos, sendo uma caracterização quantitativa, análise e comparação da forma biológica (Roth; Mercer, 2000). Essas comparações normalmente avaliam a variação morfométrica dentro das populações, e sua relação entre as populações, de modo a relacionar a variação ambiental e diferenciação fenotípica (Reis, 1988). O estudo realizado nos exemplares de *Hoplias* aff. *malabaricus* provenientes da região média da bacia do rio Paranapanema, apresentou diferenças entre as populações nos dois tipos de análise feitas nos dados morfométricos obtidos.

Na análise das variáveis canônicas a formação de três grupos distintos com relação ao eixo canônico 1, separados de acordo com a constituição do ambiente onde foram coletados. O grupo 1 é formado por animais provenientes do ribeirão Três Bocas, sendo este um local de corredeiras. Já o grupo 2, composto pelas populações de Rancho Alegre, rio Vermelho e UNOPAR, apresentou características semi-lóticas, e o grupo 3, formado pela EPUEL e pelo rio Paranapanema, foi coletado em ambientes lênticos.

A análise discriminante independente do tamanho, ou variáveis canônicas, permite realizar inferências acerca da semelhança existente entre esses grupos previamente estabelecidos, assim, é possível determinar a probabilidade de determinado indivíduo pertencer a um grupo (Peres-Neto; 1995). A proximidade de 79,38% dos valores ao eixo canônico 1, reforça a idéia de que essas populações formam grupos distintos. As características que mais contribuíram para essa similaridade e conseqüente diferenciação das populações foram o COM e a DPD. Estudos realizados em *Astyanax scabripinnis* revelam que a aplicação deste tipo de análise contribui para a diferenciação desses grupos, os quais foram perfeitamente diferenciados, uns dos outros (Mizoguchi; Martins-Santos, 1998).

A análise das proporções corporais relativas ao comprimento padrão e o comprimento da cabeça pode constatar as diferenças existentes entre as populações. Todas elas diferiram entre si em várias características, e também diferiram com relação ao tipo. Apenas seis características sobrepuseram seus valores de amplitude, e a sobreposição dessas características (CC, CF, EIO, AC, CNP, e LLBD) é pequena se comparada ao total de 25 relações estabelecidas. O contraste de todas essas outras medidas em pelo menos uma população demonstra a grande discrepância entre elas.

Estudos citogenéticos realizados por Bertollo *et al.* (1997) na população proveniente do Suriname, revelaram a presença de um citótipo com 40 cromossomos M/SM para machos e fêmeas, sendo o primeiro par cromossômico maior e seguido dos demais cromossomos do complemento.

Citótipos em simpatria são descritos dentro de *H. malabaricus*. Na população do rio Claro, a presença de números diplóides de  $2n = 40$  cromossomos e  $2n = 42$  cromossomos é descrita por Bertollo *et al.* (2000) como citótipos C e A, respectivamente. Já o citótipo encontrado na população da EPUEL é o mais raro, descrito apenas para a população do Parque Florestal do Rio Doce, a qual possui um ambiente semelhante ao encontrado para esta população, sendo considerado assim como o citótipo B (Bertollo *et al.*, 2000).

Outro citótipo, também composto por sistemas sexuais, porém múltiplo, do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ , foi encontrado nas populações do rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema. Esse citótipo é classificado, de acordo com Bertollo *et al.* (2000), como citótipo D.

O aumento no número de indivíduos coletados nesses locais do médio Paranapanema, bem como o aumento na amostragem dos exemplares provenientes do

Suriname, fornecerá uma base maior para a confirmação dessa hipótese, ou seja, a diferenciação de todas essas populações, em relação ao tipo proveniente do Suriname reforça a idéia de que elas não pertencem à espécie *H. malabaricus*.

**Tabela 1** : Medidas corporais dos exemplares de *Hoplias* aff. *malabaricus* e suas relações com as variáveis canônicas 1 (CV1) e 2 (CV2). Os números em destaque são as medidas mais contrastantes entre os exemplares.

Medidas	CV1	CV2
CP	0.17869	0.081423
CC	-0.00956	0.13931
CT	0.024676	-0.10447
AC	-0.09149	0.45119
CF	-0.23477	0.22395
LF	0.29007	-0.01184
DO	-0.2477	-0.24706
EIO	-0.02653	0.082529
<b>COM</b>	<b>0.64405</b>	0.050217
CNP	-0.08505	0.019119
CNV	0.26572	0.13552
CNA	0.10459	0.1182
CBA	-0.06149	-0.02228
CBD	-0.10838	-0.15349
DPV	0.1958	-0.30545
<b>DPD</b>	<b>-0.3078</b>	0.3925
DPA	0.29111	0.18419
APC	0.13663	0.4456
CPC	0.003494	-0.31592
LLBD	-0.04549	0.049048



**Tabela 2.:** Caracteres morfométricos e suas medidas relativas de *Hoplias malabaricus*.

	EPUEL		Rio Claro		Rio Vermelho		Rancho Alegre		ribeirão Três Bocas		rio Paranapanema		Suriname
	Variação	média ± desvio padrão	variação	média ± desvio padrão	variação	média ± desvio padrão	variação	média ± desvio padrão	Variação	média ± desvio padrão	variação	média ± desvio padrão	medidas
Comprimento Padrão	192,8 - 240,1	225,7 ± 22,1	144,1 - 212,5	178,4 ± 21,6	147,4 - 245,5	193,7 ± 36,0	190,7 - 200,1	195,3 ± 4,7	94,8 - 141,6	122,0 ± 19,6	90,6 - 222,3	169,3 ± 69,5	<b>268,4</b>
Comprimento da Cabeça	61,4 – 72,0	67,2 ± 4,7	45,9 - 65,3	55,6 ± 6,5	48,3 - 74,5	61,8 ± 9,5	57,8 - 61,5	60,1 ± 2,0	30,4 - 44,1	38,7 ± 5,8	30,45 - 66,85	51,83 ± 19,0	<b>85,71</b>
Medidas Relativas ao Comprimento da Cabeça													
Altura da Cabeça	45,0 – 48,2	46,5 ± 1,3	42,3 - 49,0	46,7 ± 2,2	45,9 - 53	50,3 ± 2,6	49,7 - 54,5	52,1 ± 2,3	46,8 - 51,5	49,5 ± 2,3	43,4 - 51,8	48,1 ± 4,3	<b>44,6</b>
Comprimento do Focinho	24,1 – 28,6	26,4 ± 2,2	23,1 - 27,1	24,8 ± 1,0	25 - 28	26,7 ± 1,2	24,8 - 26	25,6 ± 0,9	23,9 - 26,8	25,0 ± 1,3	25,1 - 27,2	26,1 ± 1,1	<b>25,4</b>
Largura do Focinho	42,4 – 46,3	44,3 ± 1,8	38,6 - 45,1	41,9 ± 2,1	44,6 - 48,6	46,0 ± 1,6	45,2 - 47,4	46,8 ± 1,7	39,8 - 44,6	42,1 ± 2,6	43,2 - 45,4	44,5 ± 1,1	<b>31,8</b>
Diâmetro orbital	15,4 – 16,7	16,1 ± 0,6	15,0 - 18,3	16,6 ± 1,0	14,2 - 17,2	15,3 ± 1,2	14,9 - 15,2	15,0 ± 0,3	17,4 - 21,9	18,8 ± 2,0	14,6 - 21,1	17,2 ± 3,5	<b>14,4</b>
Espaço interorbital	28,6 – 31,0	30,0 ± 1,2	26,7 - 29,2	27,6 ± 0,7	25 - 32,7	29,6 ± 2,9	28,5 - 31,1	29,9 ± 1,3	25,3 - 46,4	32,0 ± 9,7	23,7 - 30,7	27,5 ± 3,5	<b>29,1</b>
Comprimento do osso maxilar	50,8 – 57,9	54,6 ± 3,7	39,7 - 44,4	41,9 ± 1,3	40,5 - 43,2	42,1 ± 1,0	39,8 - 41,3	40,6 ± 1,2	35,5 - 40,3	38,0 ± 2,2	55,6 - 56	55,7 ± 0,2	<b>52,2</b>
Medidas Relativas ao Comprimento Padrão													
Comprimento da cabeça	28,0 – 31,8	29,8 ± 1,6	29,4 - 32,9	31,2 ± 0,8	30,4 - 33,1	32,0 ± 1,2	30,3 - 31,5	30,8 ± 0,6	31,1 - 32,3	31,7 ± 0,6	29,9 - 33,6	31,2 ± 2,1	<b>31,9</b>
Comprimento do Tronco	65,6 – 72,6	69,6 ± 3,0	67,3 - 71,9	68,8 ± 1,6	66,6 - 69,3	68,2 ± 1,0	69,8 - 70,7	70,4 ± 0,4	66,8 - 73,3	69,8 ± 2,8	68,7 - 73,1	71,0 ± 2,2	<b>67,3</b>
Altura da cabeça	13,1 – 14,5	13,9 ± 0,7	13,0 - 15,4	14,6 ± 0,8	15,1 - 16,8	16,1 ± 0,8	15,1 - 16,6	16,0 ± 0,8	14,6 - 16,5	15,7 ± 0,8	14,6 - 15,5	14,9 ± 0,4	<b>14,3</b>
Comprimento do Focinho	6,7 – 8,4	7,9 ± 0,8	7,2 - 8,6	7,7 ± 0,3	8,1 - 9,3	8,6 ± 0,5	7,5 - 8,2	7,9 ± 0,3	7,6 - 8,4	7,9 ± 0,4	7,5 - 8,8	8,1 ± 0,6	<b>8,1</b>

Largura do Focinho	11,9 – 13,8	13,2 ± 0,9	12,2 - 14,3	13,1 ± 0,6	14,3 - 15,2	14,7 ± 0,3	13,7 - 15,0	14,4 ± 0,7	12,4 - 14,2	13,4 ± 0,8	13,4 - 14,5	13,9 ± 0,6	<b>10,2</b>
Diâmetro orbital	4,6 – 5,2	4,8 ± 0,3	4,4 - 6,0	5,2 ± 0,4	4,4 - 5,7	4,9 ± 0,5	4,6 - 4,7	4,6 ± 0,1	5,4 - 7,0	6,0 ± 0,7	4,4 - 7,1	5,4 ± 1,5	<b>5,0</b>
Espaço interorbital	8,2 – 9,3	8,9 ± 0,5	8,0 - 9,1	8,6 ± 0,3	8,9 - 10,3	9,6 ± 0,6	8,7 - 9,5	9,2 ± 0,5	8,1 - 15,0	10,2 ± 3,2	8,0 - 9,2	8,5 ± 0,6	<b>9,3</b>
Comprimento do osso maxilar	14,6 – 17,4	16,3 ± 1,3	12,4 - 14,0	13,1 ± 0,5	12,3 - 14,0	13,3 ± 0,7	12,1 - 12,8	12,5 ± 0,4	11,5 - 12,7	12,0 ± 0,5	16,6 - 18,8	17,4 ± 1,2	<b>16,7</b>
Comprimento da nadadeira peitoral	15,9 – 18,3	17,2 ± 1,0	15,7 - 17,8	16,7 ± 0,7	14,3 - 18,7	16,9 ± 1,6	17,0 - 19,2	18,3 ± 1,2	16,5 - 17,8	17,2 ± 0,6	16,4 - 18,2	17,5 ± 1,0	<b>17,1</b>
Comprimento da nadadeira ventral	18,3 – 18,8	17,7 ± 1,1	17,0 - 19,1	18,1 ± 0,7	17,9 - 21,4	19,1 ± 1,4	17,7 - 20,3	18,9 ± 1,3	18,0 - 18,7	18,4 ± 0,3	18,0 - 21,8	19,8 ± 1,9	<b>17,2</b>
Comprimento da nadadeira anal	15,4 – 18,8	17,3 ± 1,6	16,6 - 19,0	17,9 ± 0,7	18,0 - 20,0	18,7 ± 0,9	16,9 - 17,8	17,4 ± 0,5	16,8 - 20,2	18,5 ± 1,4	19,3 - 20,3	19,6 ± 0,5	<b>17,9</b>
Comprimento da base da nadadeira anal	6,2 – 10,3	9,0 ± 1,9	8,2 - 10,5	9,3 ± 0,8	8,8 - 10,8	9,5 ± 0,8	9,4 - 9,7	9,5 ± 0,2	7,9 - 10,3	8,7 ± 1,1	9,0 - 9,7	9,3 ± 0,3	<b>9,0</b>
Comprimento da base da nadadeira dorsal	14,9 – 18,4	16,9 ± 1,4	16,9 - 18,5	17,6 ± 0,4	17,4 - 18,1	17,8 ± 0,3	17,7 - 19,0	18,3 ± 0,7	17,5 - 18,6	18,2 ± 0,5	18,2 - 18,7	18,4 ± 0,3	<b>17,5</b>
Distância pré-ventral	51,8 – 57,5	55,2 ± 2,4	37,9 - 58,7	54,5 ± 5,3	53,1 - 54,3	53,7 ± 0,5	53,7 - 56,4	54,6 ± 1,5	53,8 - 54,4	54,0 ± 0,3	54,1 - 55,7	54,9 ± 0,8	<b>56,4</b>
Distância pré-dorsal	43,6 – 50,1	48,3 ± 3,2	53,0 - 58,6	54,5 ± 5,3	50,7 - 52,0	51,3 ± 0,5	50,2 - 50,8	50,6 ± 0,4	50,0 - 51,0	50,4 ± 0,5	49,3 - 51,9	50,5 ± 1,3	<b>51,2</b>
Distância pré-anal	77,3 – 84,5	81,9 ± 3,2	44,8 - 99,7	80,8 ± 12,1	79,7 - 82,6	81,2 ± 1,1	80,6 - 83,6	82,5 ± 1,6	54,5 - 82,8	74,8 ± 13,5	81,1 - 85,5	83,9 ± 2,4	<b>84</b>
Altura do pedúnculo caudal	12,1 – 14,5	13,6 ± 1,0	12,8 - 14,2	13,4 ± 0,5	13,9 - 15,3	14,6 ± 0,7	14,8 - 16,0	15,3 ± 0,6	13,3 - 14,6	13,9 ± 0,5	14,1 - 15,3	14,7 ± 0,6	<b>14,0</b>
Comprimento do pedúnculo caudal	10,7 – 12,2	11,6 ± 0,7	7,5 - 13,3	11,2 ± 1,6	10,6 - 11,1	10,2 ± 0,7	8,7 - 10,9	9,8 ± 1,1	10,1 - 12,2	11,3 ± 1,0	11,6 - 12,4	11,9 ± 0,4	<b>10,3</b>
Distância da linha lateral até a base da nadadeira dorsal	9,8 – 12,3	11,0 ± 1,0	11,9 - 13,3	12,7 ± 0,5	12,2 - 13,4	13,0 ± 0,5	11,7 - 14,1	12,8 ± 1,2	11,5 - 12,5	12,0 ± 0,5	13,1 - 13,5	13,4 ± 0,2	<b>11,9</b>

**LITERATURA CITADA**

- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics, 1: 103-120.
- Bertollo, L. A. C., C. Oliveira, W. F. Molina, V. P. Margarido, M. S. Fontes, M. C. Pastori, J. N. Falcão & A. S. Fenocchio. 2004. Chromosome evolution in the erythinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). Heredity, 93: 228-233.
- Bertollo, L. A. C.; G. G. Born, J. A. Dergam, A. S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survei, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chromosome Research, 8: 603-613.
- Bertollo, L. A. C.; O. Moreira-Filho & M. S. Fontes. 1997. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with  $2n = 40$  chromosomes. Brazilian Journal of Genetic, 20: 237-242.
- Britski, H. A., Y. Sato & A. B. S. Rosa. 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. Brasília, CODEVASF, 115p.
- Buckup, P. A. 1998. Relationships of the Characidiinae and Phylogeny of Characiform Fishes (Teleostei: Ostariophysi). Pp. 123-144. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Fenocchio, A. S. & L. A. C. Bertollo. 1988. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. Revista Brasileira de Genética, 11: 847-852.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.
- Mizoguchi, S. M. H. N. & I. C. Martins-Santos. 1998. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. Genet. Mol. Bio., 21(1): 55-61.
- Nelson, J. S. Fishes of the world. 1994. New York, Jhon Wilry Sons, 600p.

Oyakawa, O. T. 2003. Family Erythrinidae (Trahiras). Pp. 238-240. In: Reis, R.E., S.O. Kullander & C.J. Ferrari Jr. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS, 742p.

Peres-Neto, P. R. 1995. Introdução a análises morfométricas. *Oecologia Brasiliensis*, 2: 57-89.

Reis, S. F. 1988. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. *Revta bras. Zool.*, 5(4): 571-580.

Roth, V. L. & J. M. Mercer. 2000. Morphometrics in development and evolution. *Amer. Zool.*, 40: 801-810.

## **CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

Os estudos citogenéticos e morfométricos realizados nos exemplares de *H. malabaricus* permitiram as seguintes conclusões:

- a) Foram encontrados dois citótipos em simpatria, com números diplóides de 40 e 42 cromossomos para machos e fêmeas na população da bacia do rio Claro (UNOPAR). Para a população da EPUEL foi encontrado um número diplóide de 42 cromossomos M/SM com a descrição de um sistema sexual simples do tipo XX/XY. Nas populações do rio Vermelho, Rancho Alegre, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema, o número diplóide encontrado foi de 40 cromossomos para as fêmeas e 39 cromossomos para os machos, caracterizando um sistema sexual múltiplo do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ .
- b) Na população da UNOPAR dois animais, um macho e uma fêmea, não apresentaram definição do número diplóide, este ficando entre 41 e 42 cromossomos, caracterizando assim um mosaico cromossômico.
- c) A impregnação por nitrato de prata evidenciou RONS múltiplas que variaram seu número entre as populações, sendo o mínimo de 3 e o máximo de 9 marcações encontradas.
- d) A análise da coloração com fluorocromo GC-específico CMA<sub>3</sub> revelou diferentes quantidades de blocos GC-ricos entre as populações. Na população do UNOPAR, um cromossomo apresentou uma forte banda no braço curto, próximo ao centrômero, e quatro cromossomos com marcas biteloméricas. Na população da EPUEL foi observada uma marca pericentromérica em dois cromossomos submetacêntricos. O mesmo foi observado para as populações do rio Vermelho, ribeirão Três Bocas e rio Paranapanema. Já na população de Rancho Alegre, foram observados três cromossomos submetacêntricos com marcas pericentroméricas.

- e) Todas as populações apresentaram uma distribuição semelhante da heterocromatina. Esta se concentrou principalmente na região centromérica da maioria dos cromossomos e telomérica em alguns. Todas as populações apresentaram no sexto par cromossômico uma banda maior fortemente corada que se inicia na região pericentromérica. Nas populações que apresentaram cromossomos sexuais, esse par faz parte do sistema sendo o X na população da EPUEL e o X1 nas outras populações. Essa forte banda provavelmente possuía um caráter GC-rico.
- f) Os cromossomos Y diferenciaram, com relação à heterocromatina, entre as populações que apresentaram o sistema sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ . Nos machos do rio Vermelho o cromossomo Y apresentou pequenos blocos heterocromáticos intersticiais. Nos machos de Rancho Alegre, o cromossomo Y apresentou no braço curto uma forte banda próxima ao centrômero, e duas bandas uma relativamente grande e outra menor no braço longo. Já nos machos do ribeirão Três Bocas e do rio Paranapanema não foram observadas bandas intersticiais nos braços cromossômicos, apenas as centroméricas, comuns a todos os Y.
- g) A coloração das bandas-C com fluorocromo GC-específico ( $CMA_3$ ) evidenciou dois cromossomos marcados no braço longo, próximo ao centrômero, em todas as populações, provavelmente o sexto par. As demais bandas foram evidenciadas com fluorocromo AT-específico (DAPI).
- h) A análise dos dados morfométricos, através das variáveis canônicas evidenciou grupos diferentes. O primeiro eixo canônico reteve 79,38% da variância dos dados originais e formou três grupos: (1) Ribeirão Três Bocas; (2) Rancho Alegre + rio Vermelho + UNOPAR; e (3) EPUEL + rio Paranapanema.

- i) A análise das proporções corporais relativas ao comprimento padrão e o comprimento da cabeça mostrou diferenças existentes entre as populações. Todas elas diferiram entre si em várias características, e também diferiram com relação ao espécime proveniente do Suriname. Apenas seis características sobrepuseram seus valores de amplitude, e a sobreposição dessas características (CC, CF, EIO, AC, CNP, e LLBD) é pequena se comparada ao total de 25 relações estabelecidas.
  
- j) A análise dos exemplares de *H. malabaricus* provenientes da região média do rio Paranapanema, sob o ponto de vista citogenético, morfométrico e pela ocorrência de dois citótipos em simpatria sem a presença de híbridos, corrobora a hipótese da existência de espécies diferentes no *H. malabaricus*.