

THAÍS SAAD SCZEPANSKI

**Análise Citogenética de *Atherinella brasiliensis*
pertencentes à Baía das Laranjeiras (PR)**

Monografia apresentada à disciplina
de Estágio em Genética (BG016), do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta
Margarete Cestari

**CURITIBA
2005**

“Na natureza tudo é encantado e vivo, tudo flui e pode ser conduzido. Quem conhece os segredos da natureza tem a magia nas mãos, e quem tem esse poder, modifica o mundo e transforma desejos em realidade.”

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai José Humberto e minha mãe Norma, por ter me ensinado que vale a pena acreditar e lutar pelos nossos sonhos. Pelo amor, pelo carinho, pela dedicação, pela preocupação, pela força, pelo incentivo, pelos conselhos, pelas broncas, pelos momentos em que eu pensava em desistir e vocês me enchiam de esperanças; enfim, por eu ser quem vocês me ensinaram a ser.

À minha família por estar sempre unida, por me ensinar os verdadeiros valores da vida, e por sempre poder contar com eles, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, Mário, pelo amor, por tornar minha vida aqui em Curitiba repleta de momentos inesquecíveis, pelas longas discussões 'filosóficas' na mesa do bar e principalmente por ser sempre paciente e compreensivo nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos (as) de Laboratório: Wanessa, minha irmãzona, pela amizade, pela companhia, pelas conversas e desabafos, por estar sempre pronta para ajudar. Maria Cristina, pela paciência nos ensinamentos, pela contribuição imensa neste trabalho, pelas risadas e cocas-light. Roger, Pastel, Polly, Taynah, Cris, Manu, Roxane, Adriano, Eli, prof. Ives, obrigada pelas dicas, pela ajuda, pelo convívio, e pela amizade. E por último, meu co-orientador (eu o apelidei assim), Rafa, por tudo. Pela paciência, pela ajuda nas técnicas, nas fotos, pelas revisões na introdução... até conclusão (rs), e principalmente pela amizade.

À minha orientadora, Marga, pela paciência, pela confiança, por tudo que me ensinou e principalmente, pela oportunidade.

Aos professores da banca, Marcos e Roberto, pelas correções e contribuições na melhoria deste trabalho.

Serei eternamente grata a todos vocês e a todas as pessoas que indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	01
1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS.....	02
1.3 ASPECTOS CARIOTÍPICOS	09
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 MATERIAL	14
3.2 MÉTODOS.....	16
3.2.1 Coletas.....	16
3.2.2 Obtenção de metáfases mitóticas	17
3.2.3 Coloração Convencional - Giemsa.....	18
3.2.4 Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)	18
3.2.5 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	19
3.2.6 Montagem e Análise dos Cariótipos.....	19
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Filogenia dos Atherinomorpha	05
FIGURA 02- Relações filogenéticas entre os gêneros da família Atherinopsidae.....	06
FIGURA 03- Mapa da distribuição de <i>A. brasiliensis</i>	08
FIGURA 04- Exemplar de <i>Atherinella brasiliensis</i>	14
FIGURA 05- Vista panorâmica da Baía das Laranjeiras.....	14
FIGURA 06- Localização da Baía das Laranjeiras na Baía de Paranaguá.....	15
FIGURA 07- Metodologia empregada na coleta com a rede de arrasto.....	16
FIGURA 08- Histograma representativo das freqüências dos números diplóides encontrados em <i>Atherinella brasiliensis</i>	23
FIGURA 09- Cariótipo de <i>Atherinella brasiliensis</i> coletada em Baía das Laranjeiras.....	23
FIGURA 10- a) Metáfases mitóticas de <i>Atherinella brasiliensis</i> após tratamento com AgNO ₃	24
b) Metáfase de <i>A. brasiliensis</i> após tratamento com AgNO ₃ , destacando-se os cromossomos onde as RONS estão presentes.....	24
FIGURA 11- Metáfases mitóticas de <i>Atherinella brasiliensis</i> após bandamento C.....	25
FIGURA 12- Representação hipotética da origem da RON em cromossomos bibrâquiais.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Dados das análises em coloração convencional em <i>Atherinella brasiliensis</i> : freqüências dos números diplóides encontrados em machos (M) e fêmeas (F).....	22
TABELA 02 - Espécies de Atheriniformes cariotipadas e suas respectivas referências.....	27

RESUMO

A espécie *Atherinella brasiliensis* pertence à ordem Atheriniformes e à família Atherinopsidae. Esta família possui cerca de 46 gêneros e 200 espécies sendo seus representantes conhecidos popularmente como “peixes-rei”. Possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados praticamente no mundo inteiro com uma confusa taxonomia. Ocorrem em ambientes marinhos, estuarinos e límnicos, porém, com maior frequência em águas costeiras. Apesar de seu pequeno porte (10 a 16 cm), a *A. brasiliensis* ocorre em abundância o que a torna utilizada pelos pescadores como fonte complementar de renda ou mesmo alimento. Análises citogenéticas foram realizadas em uma população de *Atherinella brasiliensis* provenientes da Baía das Laranjeiras – Baía de Paranaguá (PR). Nos 44 exemplares (15 fêmeas e 29 machos) detectou-se um número diplóide modal de 48 cromossomos com fórmula cariotípica de 4M, 14SM, 18ST, 12A, perfazendo um número fundamental de 84. Estudos realizados na Baía de Paranaguá, com a mesma espécie, detectaram $2n=48$, mas divergentes números fundamentais. Relatou-se, ainda, a ocorrência de diferentes citótipos diferindo na morfologia cromossômica. Mesmo sendo incomum em peixes marinhos, devido à estrutura populacional e à homogeneidade do ambiente, isto pode refletir um processo de evolução biológica. Contudo também pode ser consequência do tamanho reduzido ou do grau de condensação do cromossomo, pois nem sempre é possível fazer uma perfeita distinção entre cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, fazendo com que o NF não possa ser determinado seguramente. Os Atheriniformes possuem cariótipos derivados, vista a divergência no número de braços cromossômicos frente ao padrão de Perciformes (NF=48), evidenciando a ocorrência de inversões pericêntricas durante a evolução cariotípica deste grupo. Não foi detectado heteromorfismo cromossômico sexual, uma vez que não foram observadas diferenças entre os cariótipos de fêmeas e machos analisados. Quanto à microestrutura cariotípica, as RONS seguiram um padrão comum em peixes marinhos com apenas um par de cromossomos marcados. As bancas C marcaram regiões centroméricas, pericentroméricas e com vários cromossomos do complemento apresentando grandes blocos heterocromáticos. Os resultados do presente estudo acrescentam dados relevantes para abordagens citotaxonômicas e comparações com outras populações do litoral brasileiro, além de permitir chegar mais próximo a uma real história evolutiva desta espécie e do grupo como um todo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais

Em rochas datadas do final do Cambriano (cerca de 450 milhões de anos atrás) foi possível evidenciar restos de organismos que, ao longo da história geológica da Terra, viriam a se tornar o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados, os peixes (NELSON, 1994).

Estima-se que existam mais de 24.500 espécies de peixes, que correspondem a mais da metade das formas vivas de vertebrados. Habitam diversos ambientes, podendo ser encontrados em águas com salinidades variando de 0 a 100%, e temperaturas entre -2 e 44° C (NELSON, 1994). Do total de espécies de peixes conhecidas, cerca de 60% das espécies vivem no ambiente marinho (BERRA, 1981). A maior parte das espécies marinhas habitam as zonas costeiras (NELSON, 1994), onde desempenham papel de inquestionável importância ecológica, bem como se fazem presentes na cultura e nos hábitos dos povos que se estabeleceram nestas áreas (BIZERRIL; COSTA, 2001).

A costa brasileira apresenta cerca de 8.000 Km de extensão. Nela se insere o litoral paranaense que, embora conhecido como o segundo menor litoral dos estados brasileiros com comprimento em linha reta em torno de 100 km, apresenta extensos complexos estuarinos originando uma costa recortada cuja linha de costa possui extensão de 1.483 Km (ÂNGULO; ARAÚJO, 1996).

MAACK (1981) descreve o litoral paranaense como uma estreita faixa montanhosa que afundou por falhamentos complexos originando duas baías: a de Paranaguá - esta apresentando dois eixos: a) o eixo leste-oeste, Paranaguá propriamente dita e a baía de Antonina; b) eixo norte-sul, constituindo a baía de Guaraqueçaba e a baía das Laranjeiras - e a de Guaratuba. As conformações destas duas baías mostram serem sistemas acoplados com enormes estuários com predomínio da ação das correntes de maré sobre o fluxo fluvial.

Os estuários são formados devido à amplitude das marés e ao grande número de desembocaduras fluviais na região tropical. Consistem em ecossistemas de extrema importância, oferecendo recursos alimentares de grande diversidade e abundância,

proteção contra predadores e outras condições ambientais que favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência de diversas espécies de peixes (PATERSON; WHITFIELD, 2000). Muitas das etapas reprodutivas, incluindo dispersão de ovos e larvas, distribuição de juvenis e migrações, estão sincronizadas com o funcionamento dos ambientes estuarinos (BOCHLERT; MUNDY, 1988; SHAW et al., 1988; WEISTEM, 1988 apud CIPRIANO, 2005).

Os complexos estuarinos da região sul-sudeste do Brasil são caracterizados por apresentarem canais no manguezal, chamados gamboas, responsáveis pelo grande fluxo de matéria orgânica entre continente e estuário, além de abrigarem formas adultas e juvenis de peixes (ROCHA; FAVARO; SPACH, 2002).

Quanto à ictiofauna, na costa paranaense são registradas 92 famílias, 191 gêneros e 313 espécies, das quais 289 são Actinopterygii. A maior diversidade foi descrita para o sistema da Baía de Paranaguá com cerca de 201 espécies de peixes, sendo 173 Actinopterygii. Todas apresentam seu ciclo de vida, ou parte dele, essencialmente associado com as águas costeiras e estuarinas (CORRÊA, 2001), e nenhuma das espécies é considerada endêmica da região.

1.2 Aspectos Taxonômicos

Os mais antigos peixes conhecidos, os Agnathas – parente das atuais lampreias - surgiram há 450 milhões de anos, e suas primeiras formas eram marinhas. Evoluindo divergentemente, os Gnatostomados, assim denominados pela presença de mandíbulas, teriam seus primeiros exemplares surgidos no Siluriano Superior, tornando-se um grupo moderadamente grande e diversificado, extinguindo-se no Permiano (BRUM, 1995; MOY-THOMAS; MILES, 1971).

Os peixes ósseos verdadeiros, os Osteichthyes, surgiram no Siluriano Superior (430 milhões de anos) (MOY-THOMAS; MILES, 1971). Contém a maioria dos peixes atuais, estando dividida em quatro classes: Dipnoi (peixes pulmonados), Crossopterygii (celacanto), Brachyopterygii ("bichirs") e Actinopterygii (peixes cujas nadadeiras apresentam raios de sustentação) (BRUM, 1995). A classe Actinopterygii é composta pelas subclasses Chondrostei e Neopterygii. Esta última está dividida nas infraclasses Halecostomi e Gynghlimodi (CORTINHAS, 2002).

A infraclasse Halecostomi está dividida em Halecomorpha e Teleostei (NELSON, 1994), esta sendo considerada a mais derivada constituinte da Classe Actinopterygii (BRUM;GALETTI Jr.,1997) representando o mais numeroso e bem sucedido grupo de peixes, devido a abundância e diversidade entre os vertebrados. Corresponde aproximadamente a 96% de todos os peixes existentes perfazendo 24.000 espécies distribuídas em 45 ordens e 435 famílias (NELSON, 1994).

Os teleósteos atuais podem ser divididos em 4 subdivisões: Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha e Euteleostei (PATTERSON; ROSEN, 1977; NELSON, 1994), formando um grupo natural e monofilético (PATTERSON, 1968). Todos os peixes incluídos nestas 4 subdivisões possuem esqueleto caudal e modificações na musculatura da mandíbula, que os distinguem dos outros actinopterigeos.

Com cerca de 25% de todas as espécies de teleósteos e 90% de toda a fauna de peixes neotropicais (BRUM; GALETTI Jr., 1997), os Euteleósteos destacam-se entre os grupos da divisão Teleostei, possuindo cerca de 17.000 espécies em 25 ordens e 375 famílias (NELSON, 1994).

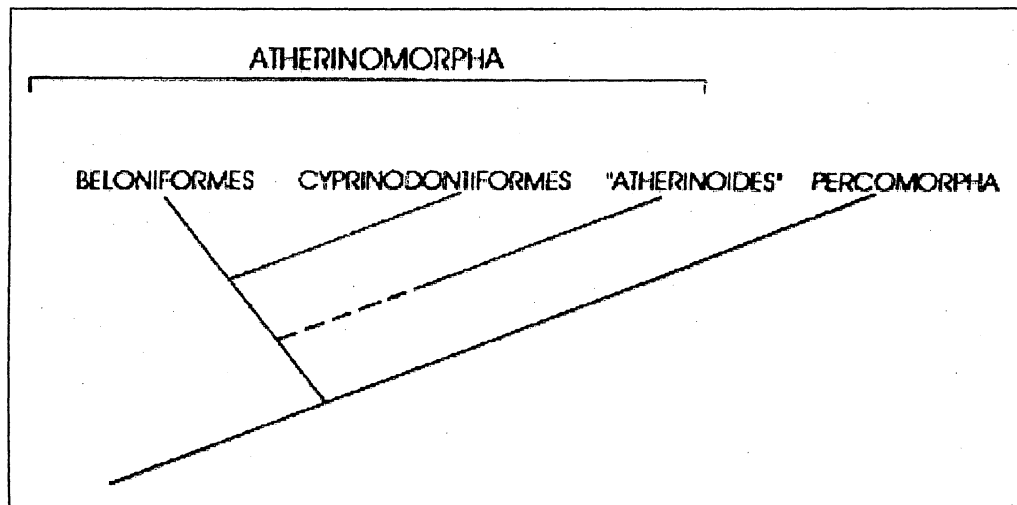
Os Euteleósteos compreendem os Protacanthopterygii, os Ostariophysii e os Neoteleostei (BRUM, 1995). Os Neoteleostei representam um grupo monofilético caracterizado por uma mandíbula superior especializada. Constituem a maioria dos teleósteos marinhos atuais, apesar de conterem espécies de água doce. Subdividem-se em quatro grupos: Stenopterygii, Scopelomorpha, Paracanthopterygii e Acanthopterygii, sendo os dois primeiros grupos considerados mais primitivos e os dois últimos, mais derivados.

Representando um grupo monofilético caracterizado por possuir um aparelho mandibular faríngeo e um mecanismo mandibular oral que promovem versatilidade na capacidade de protusão, além de outras especializações funcionais, os Acanthopterygii destacam-se entre os grupos de Neoteleósteos, contendo mais da metade de todas as famílias de peixes, formando 13 ordens divididas em 3 séries (NELSON, 1994):

- 1) Mugilomorpha : composta por uma única ordem, Mugiliformes, representada pelas espécies popularmente conhecidas como tainhas e paratis;
- 2) Percomorpha : composta por grupos ditos polifiléticos, subdivide-se em 9 ordens, Beryciformes, Syngnathiformes, Gasterosteiformes, Zeiformes, Stephanoberyciformes, Scorpaeniformes, Pleuronectiformes, Tetraodontiformes e Perciformes. Estas duas últimas contendo os peixes considerados mais especializados atualmente , representando um dos principais fins de linha da irradiação dos teleósteos (BRUM, 1995).
- 3) Atherinomorpha : composta por 3 ordens, Cyprinodontiformes, Beloniformes e Atheriniformes.

Os Atherinomorpha, conhecidos desde o Eoceno (há aproximadamente 45 milhões de anos) têm larga distribuição mundial, ocupando tanto ambientes marinhos quanto dulciaquícolas. Compreendem os barrigudinhos, os peixes-agulha, os mamarreis, os peixes-voadores e os peixes-rei, havendo evidências de constituírem um grupo monofilético (Figura 1). Apresentam 1.080 espécies, sendo 320 marinhas (BRUM, 1995).

FIGURA 1 - FILOGENIA DOS ATHERINOMORPHA (SEGUNDO LAUDER; LIEM, 1983 MODIFICADO POR BRUM, 1995)



A ordem Beloniformes é dividida em 5 famílias, com 38 gêneros e 191 espécies (NELSON, 1994). Cerca de 51 espécies são restritas a ambientes de água doce, e as restantes são exclusivamente marinhas.

A ordem Cyprinodontiformes é o maior grupo entre os Atherinomorpha. É composta por 9 famílias apresentando 850 espécies e 110 gêneros. A maioria de seus representantes é exclusivamente dulciaquícolas, mas ocupam os mais diversos ambientes, predominando sobre os outros grupos em áreas tropicais, sendo particularmente diversos na América Central, onde totalizam um terço de todas as espécies conhecidas (COSTA; MOLINA; GALETTI Jr., 1998).

A ordem Atheriniformes é um grupo monofilético, diagnosticado por dez caracteres e irmão da superordem Cyprinodonta, uma clade composta pelos Cyprinodontiformes e Beloniformes. É composta por 6 famílias, 49 gêneros e aproximadamente 320 espécies (NELSON, 1994; DYER, 1998).

Dentro da ordem Atheriniformes, encontram-se as famílias Notocheiridae, Melanotaeniidae, Phallostethidae, Atherionidae, Atherinidae e Atherinopsidae (DYER, 1998).

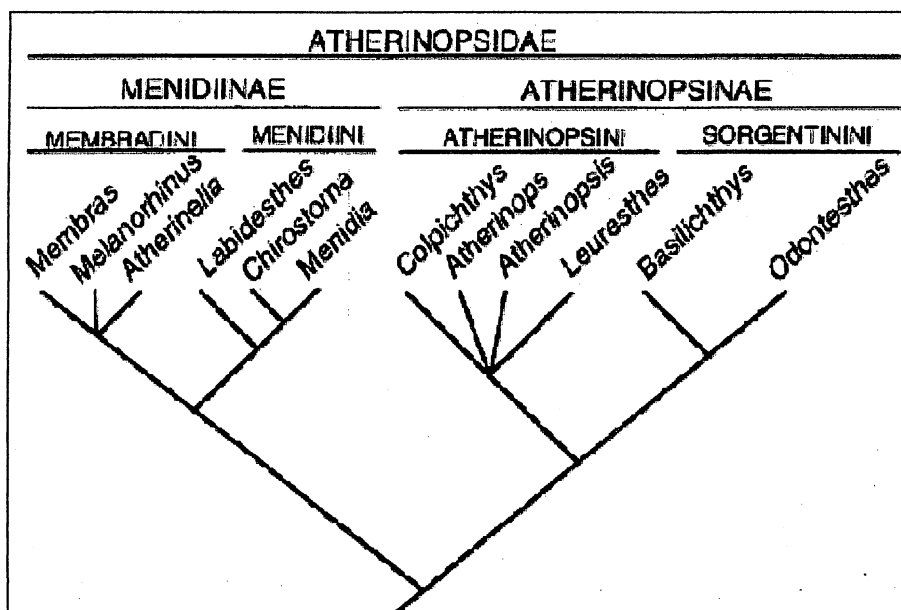
A família Atherinopsidae subdivide-se nas subfamílias Atherinopsinae e Menidiinae sendo composta por indivíduos popularmente conhecidos como "peixes-rei", possuindo ampla distribuição geográfica, sendo registrados para o mundo inteiro e com uma confusa taxonomia. Ocorrem em ambientes marinhos, estuarinos e

límnicos, no entanto aparecem com maior freqüência em águas costeiras (HOSTIM-SILVA et al., 1995).

A sub-família Atherinopsinae subdivide-se nas tribos Atherinopsini e Sorgentinini. Os peixes-rei pertencentes à tribo Sorgentinini se distinguem de outros membros da família, devido ao seu típico ciclo de vida longo, variando de 3 a 10 anos. Os ciclos de vida de outros Atherinopsidae se estendem até, no máximo, 3 anos (BEMVENUTI, 1987).

A sub-família Menidiinae subdivide-se nas tribos Membrandini e Menidiini (Figura 2) sendo a espécie *Atherinella brasiliensis* pertencente à tribo Membrandini, ao gênero *Atherinella* e ao sub-gênero *Xenomelaniris*. A espécie-tipo deste sub-gênero é denominada *Atherina brasiliensis*, cujo gênero *Atherina* é derivado da palavra grega "atherine" (flecha, seta, espinho) a qual foi adicionado o sufixo "ella" dando origem ao nome *Atherinella*. Durante algum tempo, a espécie *A. brasiliensis* foi conhecida como *Xenomelaniris brasiliensis*, mas atualmente *Xenomelaniris* é considerado sub-gênero de *Atherinella* (CHERNOFF, 1986).

FIGURA 2 - RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS GÊNEROS DA FAMÍLIA ATHERINOPSIDAE (CHERNOFF, 1986).



Para uma maior compreensão a respeito da taxonomia de *Atherinella brasiliensis* está listada a seguir sua classificação sistemática segundo NELSON (1994) até a sub-ordem Atherinoidei. A partir de família a classificação é segundo DYER (1998) e de sub-gênero em diante segundo CHERNOFF (1986).

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata (Craniata)

Superclasse Gnathostomata

Grade Teleostomi

Classe Actinopterygii

Subclasse Neopterygii

Infraclasse Halecostomi

Divisão Teleostei

Subdivisão Euteleostei

Superordem Acanthopterygii

Serie Atherinomorpha

Ordem Atheriniformes

Subordem Atherinoidei

Família Atherinopsidae

Subfamília Menidiinae

Tribo Membrandini

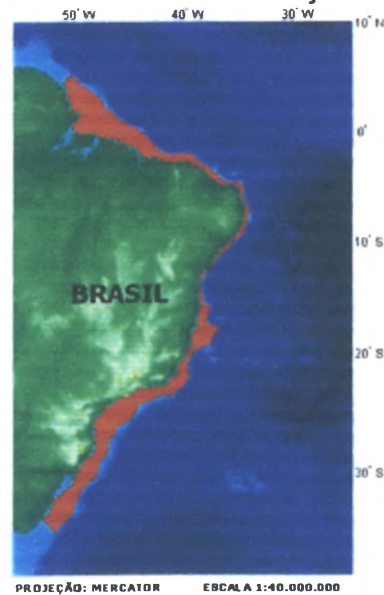
Gênero *Atherinella*

Sub- gênero *Xenomelaniris*

Espécie *Atherinella brasiliensis*

No Brasil, *Atherinella brasiliensis* é uma espécie estuarina encontrada desde a costa Atlântica da Venezuela até a do Rio Grande do Sul, principalmente na desembocadura de rios e em águas salobras (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978 apud LOWE- McCONNEL, 1999) (Figura 3). Seu habitat, segundo CERVIGÓN et al. (1992) é bento-pelágico, vivendo ou alimentando-se sobre ou próximo ao fundo, assim como na coluna d'água entre 0 e 200 m (FROESE; PAULY, 1998).

FIGURA 3 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DE *A. brasiliensis*



Fonte: Disponível em <www.bdt.org.br>

Apesar de abundantemente encontrada, *A. brasiliensis* não é considerada de grande interesse comercial fora das áreas das comunidades pesqueiras, porém, em determinadas épocas, são utilizadas como fonte complementar de renda ou mesmo fonte alimentar (HOSTIM-SILVA et al., 1995).

Seu comprimento total varia de 10 cm a 16 cm (HOSTIM-SILVA op. cit.; BEMVENUTI, 1990). Seu hábito alimentar varia segundo o comprimento total e a idade do indivíduo sendo porém semelhante em diferentes populações. Nos exemplares menores de até cerca de 7 cm de comprimento total, foi observado dominância de fitoplâncton (diatomáceas e algas filamentosas) enquanto os juvenis maiores preferem zooplâncton (copépodes e cirripédios). Os adultos alimentam-se preferencialmente de insetos dípteros e invertebrados bentônicos durante todas as estações do ano (BEMVENUTI, op. cit.).

Não realizam migrações horizontais, somente verticais, visto que peixes de diferentes fases de desenvolvimento ocupam diferentes profundidades. Há uma preferência por águas profundas para se alimentar e iniciar a maturação das gônadas devido a uma maior proteção contra as variações de temperatura, maior riqueza de alimento e menor ação de turbulências provocadas pelos ventos constantes nesta época, e uma preferência por águas rasas em outra época para desovar, liberando no ambiente os ovos fertilizados. Estes podem ser levados

passivamente pelas correntes marítimas (BIZERRIL; COSTA, 2001) e no caso dos ovos de *A. brasiliensis*, podendo vir a fixar-se no ambiente através de estruturas externas dispostas em vários sentidos, presentes no córion do ovo (FAHAY, 1983). Estes exemplares menores na superfície da água, terão mais chances de não serem predados. Desta forma, diferentes nichos ecológicos são ocupados de acordo com os diferentes tamanhos de comprimento do animal, sendo isso de grande importância ecológica na regulação bioenergética da população (CHAO; MUSICK, 1977; BARBIERI, 1986 apud HOSTIM-SILVA et al., 1995).

1.3 Aspectos Cariotípicos

A utilização de dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e para elaboração de padrões de relacionamento ou filogenias (citosistemática) foi inicialmente proposta por MATHEY (1949) no primeiro trabalho de revisão de dados cromossômicos de vertebrados. As bases da citotaxonomia foram lançadas com a aceitação do princípio da individualidade cromossômica e o estabelecimento da teoria cromossômica da hereditariedade, elaborada e proposta por Theodor Boveri, Walter S. Sutton e Thomas H. Morgan, ainda na primeira metade do século (CORRÊA, 1995).

A citogenética tenta estabelecer relações entre variáveis genéticas e demográficas, onde a partir de dados sobre o número diplóide ($2n$), o número fundamental (NF) e padrões de diversas técnicas de bandamento, se possam elaborar padrões de relacionamento ou filogenias, além da identificação de espécies e/ou possíveis vias de especiação (MATHEY, 1949).

A citogenética em peixes torna-se especialmente interessante porque estes animais constituem um grupo particular dentre os vertebrados pelo número de espécies, diversidade de formas, comportamento e habitats e pela posição central que ocupam na evolução animal (OHNO, 1970).

Os primeiros estudos citogenéticos em peixes foram publicados por RETZIUS e KASTSCHENKO (1890) apud DENTON (1973); contudo, até a descoberta da aplicação dos tratamentos hipotonizantes para estudo das células em divisão, pouco foi feito nesta área. Somente após o início da década de 60, os trabalhos em

citogenética de peixes puderam apresentar dados precisos a respeito do número e da forma dos cromossomos.

O desenvolvimento geral da citogenética de peixes tem sido bastante grande nas últimas décadas devido ao incremento das atividades de pesquisa neste campo, entretanto, segundo DOUCETTE e FITZSIMONS (1988) apud BRUM (1995), o número de cromossomos e/ou cariótipos são conhecidos para menos de 14% das espécies. Há pelo menos duas razões para isto: a maioria dos peixes apresentam seus cromossomos com um comprimento médio cerca de 20% do comprimento dos cromossomos dos mamíferos e as técnicas de bandamento, altamente resolutivas em mamíferos, não apresentam bons resultados quando aplicadas nos cromossomos de peixes (BRUM, *op. cit.*). Acredita-se que isso seja um reflexo da falta de compartimentalização do DNA no genoma dos peixes (MEDRANO et al., 1988 apud SOLA et al., 1993).

Segundo OLIVEIRA, ALMEIDA- TOLEDO e FORESTI (2000), a ictiofauna de águas continentais da região Neotropical apresenta aproximadamente 8.000 espécies, sendo que as pesquisas citogenéticas com peixes no Brasil têm se restringido à espécies de água doce (~800 espécies) com poucos relatos de peixes marinhos (~120 espécies, distribuídas em 43 famílias e 80 gêneros) (BRUM et al., 2001; CIPRIANO, 2005).

Os estudos citogenéticos realizados em Teleósteos, apontaram uma quantidade diversa de número cromossômico (de 14 até 140) e uma variedade de fórmulas cromossômicas. No entanto, verificou-se uma concentração maior em torno de $2n=48$, com muitos cromossomos acrocêntricos e poucos metacêntricos (BRUM, 1995).

O cariótipo apresentando 48 cromossomos acrocêntricos é considerado para OHNO e ATKIN (1966), MURAMOTO et al. (1968), OHNO (1970 e 1974) apud BRUM *op. cit.*, o primitivo dos peixes teleósteos e uma herança dos primeiros vertebrados, com base no tamanho do genoma e no número diplóide de representantes das diferentes ordens de peixes atuais. BRUM *op. cit.* discorda desta hipótese, partindo da proposta de DOUCETTE e FITZSIMONS (1988) apud BRUM *op. cit.* que acham muito difícil prosseguir aceitando esta condição como primitiva para os peixes Teleósteos, uma vez que os estudos de grupos externos aos teleósteos não mostraram este complemento. A suposição desta condição também

seria equivocada se estivesse baseada no conceito de "common equals primitive" (ESTABROOK, 1977 apud BRUM, *op. cit.*) segundo o qual se um caráter é encontrado em vários taxa de um determinado grupo investigado, ele é primitivo. WILEY (1981), WATROUS e WHEELER (1981) apud BRUM *op. cit.* demonstraram não haver correspondência lógica entre frequência e primitividade, pois um caráter primitivo pode ter sido retido somente por um ou poucos do táxon examinado e que todos os outros compartilhem um caráter derivado. Neste sentido, QUMSIYCH e BAKER (1988) apud BRUM *op. cit.* sugerem que o correto para se determinar os estados de caráter primitivo e derivado, é fazer uso do "método dos out-groups", evitando-se métodos como o do "commom equals primitive", além de assunções *a priori* da direção da evolução cromossômica.

A partir destas informações, somadas às inferências de DOUCETTE e FITZSIMONS *op. cit.* apud BRUM *op. cit.* sobre o cariótipo primitivo dos teleósteos e à não aceitação de um processo de convergência como causador da similaridade cariotípica observada, BRUM *op. cit.* propôs uma nova hipótese, mais parcimoniosa, a respeito da ancestralidade dos peixes teleósteos. Esta hipótese alternativa propõe que o complemento diplóide do primeiro teleósteo conteria algo em torno 60 cromossomos, com alguns metacêntricos (DINGERKUS, 1979 apud BRUM, *op. cit.*). Segundo BRUM *op. cit.*, este cariótipo deve ter sido herdado por uma forma primitiva de Clupeiformes, únicos entre os teleósteos primitivos a possuir 48 acrocêntricos, que teve o número diplóide modal reduzido devido tanto a fusões quanto a deleções. Os Euteleostei teriam herdado e conservado este cariótipo principalmente em suas formas marinhas. Este cariótipo primitivo também se manteve praticamente inalterado nas espécies marinhas de Atherinomorpha e Percomorpha, enquanto nos grupos típicos de água doce ele foi se tornando mais derivado (BRUM, *op. cit.*).

Os principais estudos realizados pela citogenética de peixes têm sido feitos através de técnicas convencionais, como Giemsa, bandamento C (banda-CBG) e impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag- RONS) uma vez que bandamentos longitudinais, tipo bandamento G (banda-GTG), são menos facilmente obtidos em cromossomos de peixes (ARTONI et al., 2000).

Através do bandamento C, há uma remoção diferencial de DNA na região eucromática, enquanto que a região mais condensada permanece relativamente

intacta e detectável (SUMNER, 1972). Em geral, a heterocromatina é definida como um segmento do cromossomo que se apresenta condensado, geneticamente inativo, composto de DNA altamente repetitivo, que se replica tardiamente na fase S e manifesta heteropícnose positiva ou negativa se submetida a determinados tratamentos. Embora genérica, esta definição apresenta exceções em cada um de seus itens (CORTINHAS, 2002). A técnica da banda C em peixes, permite caracterizar regiões heterocromáticas formadas por DNA altamente repetitivo, sendo que em alguns casos possibilita identificar cromossomos homólogos, polimorfismos na heterocromatina e cromossomos Bs ou sexuais.

A observação das RONS tem sido feita através da técnica de impregnação por nitrato de prata, que permite localizar sítios ativos de genes ribossomais nos cromossomos (HOWELL ; BLACK, 1980). A presença de uma proteína ácida nas RONS ativas na intérfase anterior à mitose na qual a célula sofreu fixação, parece ser responsável pela coloração com nitrato de prata e na sua conseqüente identificação (HSU et al., 1975). As RONS representam uma porção particularmente variável do genoma eucarioto.

A caracterização do número e posição das RONS tem sido muito utilizada em peixes e pode constituir um excelente marcador citotaxonomico para alguns grupos (GALETTI et al., 1984; GALETTI, 1998 apud AFFONSO, 2000), porque podem variar de modo inter e intra-específico ou inter e intra-individual quanto ao número, localização, intensidade e tamanho (GOODPASTURE; BLOOM, 1975 apud NOLETO, 2003).

Estas técnicas são capazes de gerar bandas específicas em cada região cromossômica, facilitando a discriminação entre cariótipos aparentemente similares e revelando mecanismos de rearranjos, sendo úteis na identificação de marcadores para espécies e/ou populações e no estabelecimento de homeologias (OZOUF-COSTAZ; FORESTI, 1992 apud AFFONSO, 2000).

Assim sendo, importantes subsídios têm sido fornecidos pela Citogenética de Peixes, para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, podendo ser considerada uma excelente ferramenta para ser utilizada em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e genética molecular, para se chegar mais próximo a uma real história evolutiva dos organismos (ARTONI et al., 2000)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho pretende ampliar o estudo citogenético em *Atherinella brasiliensis* pertencentes à Baía de Paranaguá, pois esta espécie é sócio-economicamente importante e pouco estudada à nível cromossômico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Análise e montagem do cariótipo de *A. brasiliensis* pertencente à Baía das Laranjeiras e comparação com dados da literatura;
- b) Determinação das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) e comparação dos resultados com os obtidos na literatura;
- c) Aplicação da técnica de bandamento C para fins comparativos com a literatura;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram analisados 44 exemplares de *Atherinella brasiliensis* (29 machos e 15 fêmeas) (Figura 4) pertencentes à Baía das Laranjeiras (Figura 5) localizada na Baía de Paranaguá, litoral paranaense (Figura 6).

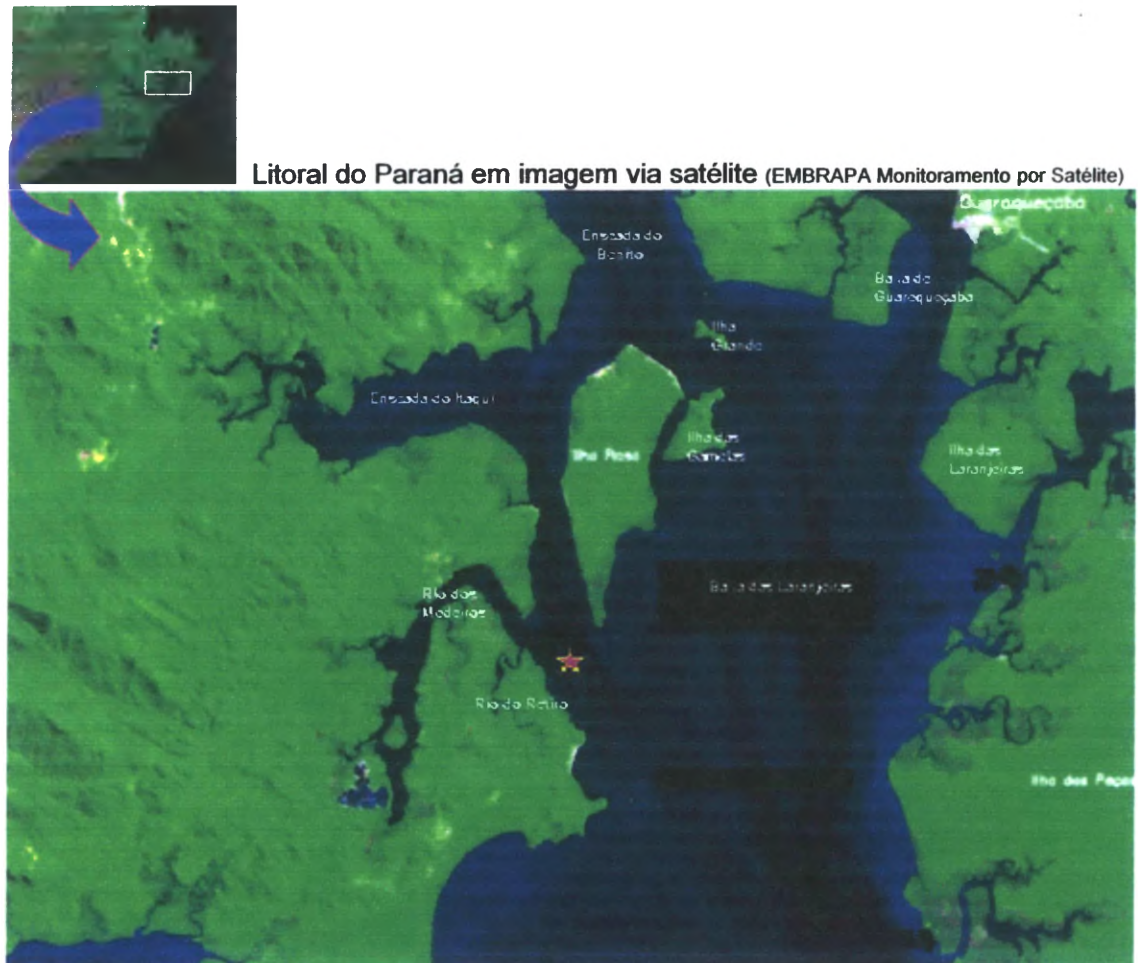
FIGURA 4 - EXEMPLAR DE *Atherinella brasiliensis*



FIGURA 5 - VISTA PANORÂMICA DA BAÍA DAS LARANJEIRAS



FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DA BAÍA DAS LARANJEIRAS NA BAÍA DE PARANAGUÁ, DESTACANDO O LOCAL DE COLETA DOS EXEMPLARES ANALISADOS



Fonte: Disponível em <www.pr.gov.br/meioambiente/iap/qdd_agua_baias.shtml>

Nota: A estrela destaca o local de coleta dos exemplares analisados

3.2 Métodos

3.2.1 Coletas

Os peixes foram coletados com rede de arrasto com malha de 1,2 cm entre nós, a qual foi estendida em forma de meia lua e em seguida arrastada por duas pessoas até a margem da praia (Figura 7). Os peixes capturados foram mantidos em recipientes com água devidamente aerados para o transporte ao Laboratório de Citogenética Animal no Setor de Ciências Biológicas – UFPR (Curitiba- PR). No laboratório os animais foram sacrificados e imediatamente protocolados com número, sexo e procedência.

FIGURA 7 - METODOLOGIA EMPREGADA NA COLETA COM A REDE DE ARRASTO



Foto: Marta Margarete Cestari

3.2.2 Obtenção de metáfases mitóticas

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo (FENOCCHIO et al., 1991) com algumas modificações, que consistiu nas etapas seguintes:

- Foi retirada porção anterior e parte da porção posterior do rim (aproximadamente 3mm³) e transferida para uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI (filtrado) com antibiótico antimicótico e 20% de soro bovino fetal;
- O tecido foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior asperção e expiração suave da solução com uma seringa de vidro sem agulha. A solução com células foi então incubada em estufa a 29° C por 7 horas. 25 minutos antes de completar o tempo, foram pingadas 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. A placa de Petri foi então gentilmente agitada para que a solução de colchicina se homogeneizasse à aquela da placa. A nova solução foi mantida em estufa até o tempo final da cultura;
- Passado este tempo, a cultura foi transferida para um tubo de ensaio que foi centrifugado a 800-900 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo completado até 8 ml com solução hipotônica de KCl_{aq.} (0,075 M). O botão celular foi desagregado na solução por suspensão e ficou 45 minutos em temperatura ambiente;
- O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração. Dado o tempo da hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo. Foi feita a ressuspensão do material até ficar homogêneo, e centrifugado a 800-900 rpm por 10 minutos;
- O sobrenadante foi descartado e em seguida o tubo foi completado com fixador até o volume de 8 ml. Novamente o botão celular foi ressuspensionado e a solução centrifugada a 800-900 rpm durante 10 minutos;
- A etapa anterior foi repetida por duas vezes;
- Descartado o sobrenadante, foi colocado 1,5 ml de fixador e o botão celular ressuspensionado. Esta solução foi armazenada em tubo de micropipeta do tipo Eppendorf em freezer à -20° C.

3.2.3 Coloração Convencional – Giemsa

A solução de suspensão de células após ser retirado do freezer foi gotejada sobre uma lâmina à seco, sendo logo após flambada em uma lamparina. As lâminas foram então coradas com uma solução de Giemsa à 10% em tampão fosfato (pH 6,8) durante um período de 30 minutos e em seguida lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar.

3.2.4 Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)

Foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972), com pequenas modificações segundo VICENTE (1994):

- A solução celular foi pingada em uma lâmina a seco e a seguir foi flambada rapidamente em uma lamparina. Após sua secagem ao ar, foi levada à estufa de 45° C por um dia;
- Transcorrido este tempo, foi colocada em solução de HCl 0,2 N à 42° C durante 15 minutos. Em seguida a lâmina foi lavada com água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina foi colocada em solução a 5% de Hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2$) à 60° C por aproximadamente 50 segundos;
- A lâmina foi rapidamente inserida no HCl 0,2 N para retirar o excesso de bário e após isso foi lavada com um jato de água destilada. Em seguida foi colocada em uma solução salina de 2xSSC (15,53 g de NaCl + 8,82 g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora em banho termostático à 60° C;
- Decorrido este tempo a lâmina foi lavada em água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina foi corada com Giemsa diluída a 10% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos.

3.2.5 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

A técnica utilizada foi a descrita por HOWELL e BLACK (1980), corando as RONs através da utilização de solução aquosa de nitrato de prata. Foram utilizadas as seguintes etapas:

- As lâminas pingadas conforme descrito anteriormente foram envelhecidas por até 5 dias em uma estufa a aproximadamente 45° C;
- Utilizou-se uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% (1g de AgNO_3 em 2 ml de H_2O destilada) e uma solução aquosa de gelatina a 2% (1g de gelatina em 50 ml de H_2O destilada, acrescentando-se 0,5 ml de ácido fórmico). Esta última foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira;
- Sobre a lâmina foram pingadas 2 gotas de solução aquosa de gelatina e 2 gotas de solução aquosa de AgNO_3 , que foram gentilmente misturadas e cobertas por uma lamínula. Estas foram levadas à estufa de 60° C. Quando o material adquiriu uma coloração dourado-acastanhada, a lâmina foi retirada da estufa e a lamínula foi removida com um jato de água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina pode então ser corada com uma solução de Giemsa (10%) em tampão fosfato pH 6,8 por 15 segundos, para retirar o excesso de brilho do AgNO_3 . A lâmina foi então lavada e deixada secar ao ar. As regiões coradas pelo nitrato de prata destacaram as regiões organizadoras de nucléolos (RONs).

3.2.6 Montagem e Análise dos Cariótipos

As metáfases que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram analisadas, em sua maior parte através captura digital de imagens e algumas foram fotomicrografadas. As metáfases selecionadas foram fotografadas em microscópio Leica, com objetiva 100x de imersão com filtro verde. O filme utilizado foi Imagelink HQ, e para revelação se utilizou Dektol (Kodak) por aproximadamente 2 minutos à 20° C e em seguida fixação (Kodak) por 10 minutos. O filme foi então lavado em água corrente por 60 minutos e deixado secar ao ar. As cópias das fotos foram feitas em papel Kodabromide F3 esmaltado e reveladas em

Dektol diluído em água (1:2). As melhores fotos tiveram os cromossomos recortados e montados aos pares em ordem decrescente de tamanho e morfologia. As medidas cromossômicas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro para a determinação da relação entre os braços. Também se utilizou um sistema de captura de imagens, com microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Imagem. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 2.0, e as medições cromossômicas foram feitas com o software Corel Draw 9 para a determinação da relação entre os braços (RB).

Para o cálculo do NF os cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e subtelocêntricos (ST) foram considerados como bibrâquiais, enquanto que os cromossomos acrocêntricos (A) constituídos por um único braço.

A classificação dos cromossomos quanto à relação entre os braços foi seguida conforme LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964), determinando os tipos a seguir:

Metacêntrico (M)	RB = 1,00 a 1,70
Submetacêntrico (SM)	RB = 1,71 a 3,00
Subtelocêntrico (ST)	RB = 3,01 a 7,00
Acrocêntrico (A)	RB > 7,01

4 RESULTADOS

Foram analisados 44 exemplares de *Atherinella brasiliensis*, sendo 29 machos e 15 fêmeas. Estes apresentaram um número diplóide modal de 48 cromossomos (Tabela 1 e Figura 8).

A macroestrutura cariotípica encontrada apresentou 4 cromossomos metacêntricos (2 pares), 14 submetacêntricos (7 pares), 18 subtelocêntricos (9 pares) e 12 acrocêntricos (6 pares), perfazendo um número fundamental de 84 (Figura 9).

Não foi detectado heteromorfismo cromossômico sexual, uma vez que não foram observadas diferenças entre os cariótipos de fêmeas e machos analisados.

Quanto à microestrutura cariotípica, as RONS seguiram um padrão comum em peixes marinhos com apenas um par de cromossomos marcados (Figura 10 a e b).

As bandas C se mostraram positivas em regiões centroméricas, pericentroméricas, ocupando todo o braço de um par de cromossomos metacêntricos, além de blocos heterocromáticos em cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos (Figura 11).

TABELA 1 - DADOS DAS ANÁLISES EM COLORAÇÃO CONVENCIONAL EM *Atherinella brasiliensis*: FREQUÊNCIAS DOS NÚMEROS DIPLÓIDES ENCONTRADOS EM MACHOS (M) E FÊMEAS (F)

Peixes	Sexo	Número Modal				Total
		< 46	46	47	48	
1597	M	6	1	6	16	29
1598	M	5	0	0	7	12
1599	M	1	0	0	11	12
1600	F	4	1	3	21	29
1601	F	8	0	1	44	53
1602	M	10	3	3	32	48
1603	F	3	0	1	14	18
1604	F	1	0	0	6	7
1605	F	1	0	0	4	5
1606	M	0	0	1	8	9
1607	M	1	1	0	7	9
1608	F	0	1	0	12	13
1622	M	4	1	1	11	17
1623	M	2	0	1	25	28
1624	M	5	1	0	12	18
1625	M	2	0	2	12	16
1626	M	3	1	1	10	15
1627	F	1	0	0	12	13
1637	M	1	0	1	5	7
1638	F	0	0	2	23	25
1639	M	2	1	0	21	24
1640	M	3	0	1	18	22
1641	F	0	2	2	12	16
1642	M	2	1	0	9	12
1643	M	0	2	0	11	13
1644	F	6	2	1	17	26
1670	M	1	1	0	7	9
1671	M	0	1	0	8	9
1672	M	1	2	1	10	14
1673	M	1	1	0	8	10
1674	M	3	0	1	15	19
1675	M	5	1	4	29	39
1676	M	3	1	1	19	24
1677	F	1	1	1	13	16
1678	F	4	2	0	26	32
1679	M	3	0	2	32	37
1680	F	1	1	2	8	12
1681	M	1	2	3	9	15
1682	M	6	0	3	35	44
1683	F	3	1	1	12	17
1684	F	3	0	2	8	13
1685	M	4	2	1	14	21
1686	M	1	2	5	21	29
1687	M	5	4	3	19	31
Total		117	40	57	673	887

FIGURA 8 - HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DAS FREQUÊNCIAS DOS NÚMEROS DIPLÓIDES ENCONTRADOS EM *Atherinella brasiliensis*

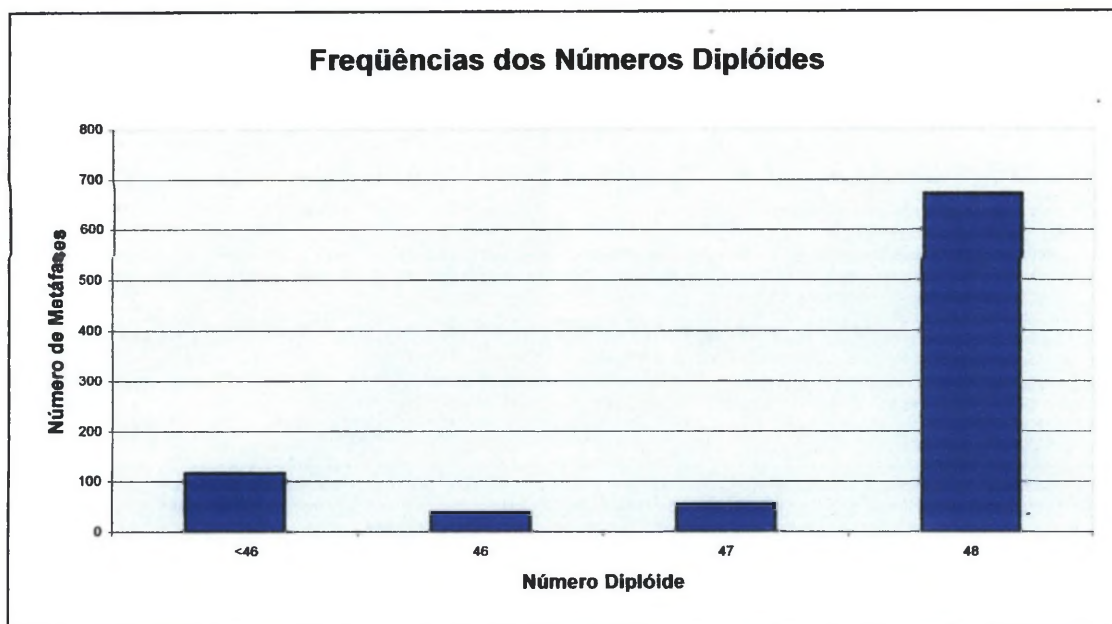


FIGURA 9: CARIÓTIPO DE *Atherinella brasiliensis* COLETADA EM BAÍA DAS LARANJEIRAS. $2N = 48$; $NF = 84$

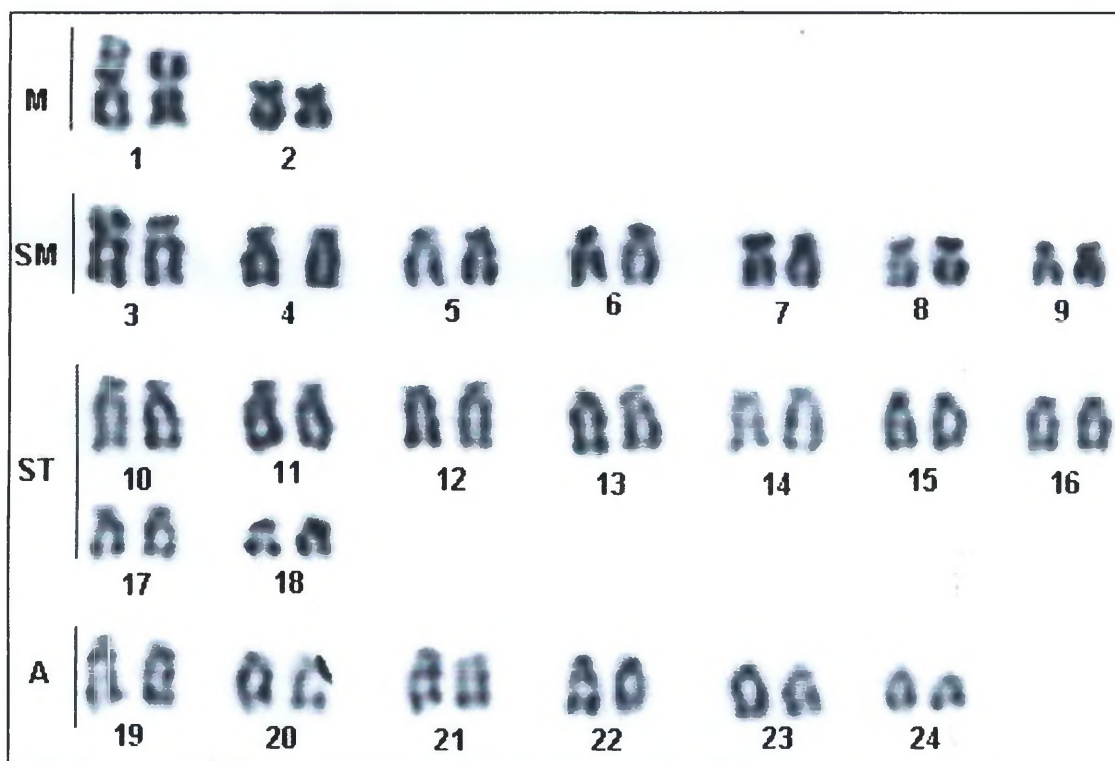
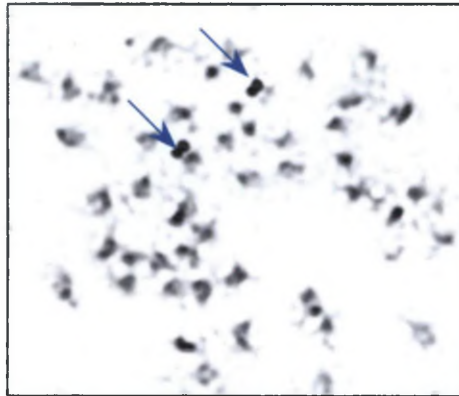
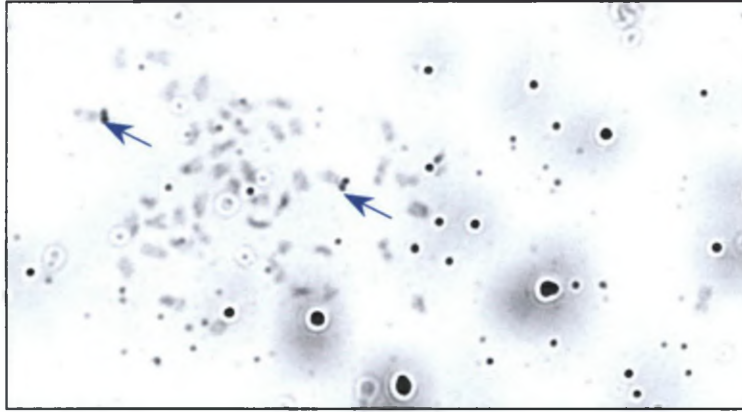


FIGURA 10 -

a) METÁFASES MITÓTICAS DE *Atherinella brasiliensis* APÓS TRATAMENTO COM $AgNO_3$, INDICANDO OS CROMOSSOMOS ONDE AS RONS ESTÃO PRESENTES.



b) METÁFASE DE *A. brasiliensis* APÓS TRATAMENTO COM $AgNO_3$, INDICANDO E DESTACANDO-SE OS CROMOSSOMOS ONDE AS RONS ESTÃO PRESENTES.

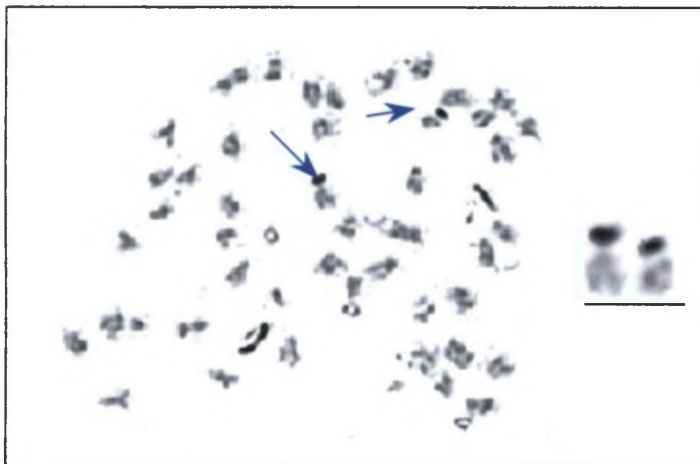
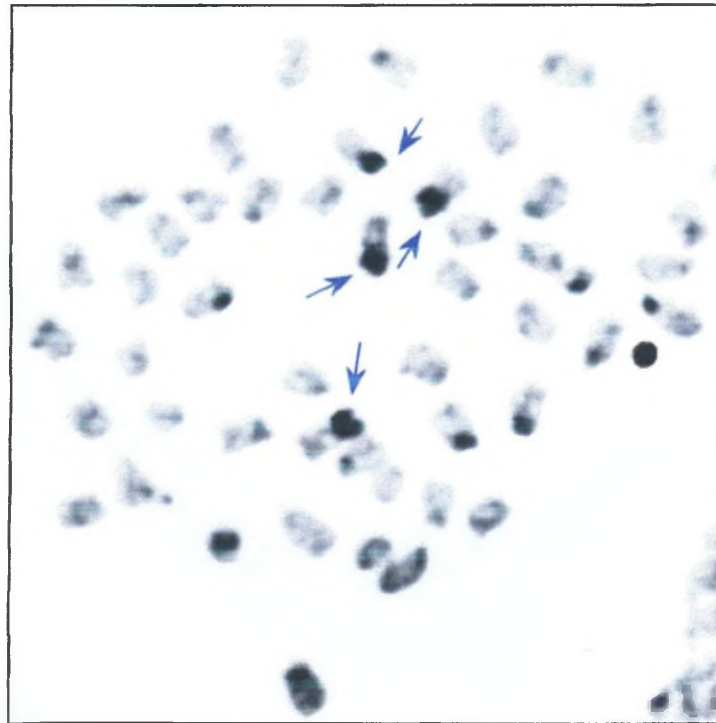
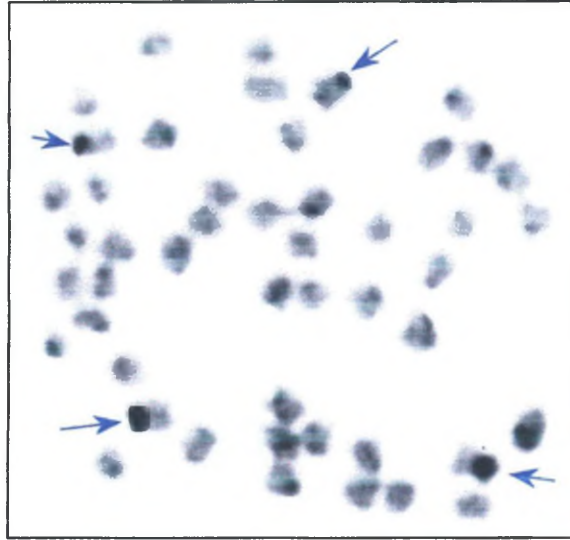


FIGURA 11 - METÁFASES MITÓTICAS DE *A. brasiliensis* APOS BANDAMENTO C, INDICANDO ALGUNS CROMOSSOMOS COM BLOCOS HETEROCROMÁTICOS.



5 DISCUSSÃO

Os peixes são os vertebrados mais diversificados em relação à sistemática e possuem uma posição basal na filogenia, constituindo desta forma um dos grupos mais interessantes para estudos de variabilidade genética e evolução (NELSON, 1994). Nas duas últimas décadas, a Citogenética vem contribuindo significativamente para um melhor conhecimento da biodiversidade em nossos peixes, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo (SOUZA et al., 1996).

A maioria das informações cromossômicas sobre a nossa ictiofauna está concentrada nas ordens Characiformes e Siluriformes, figurando em terceiro lugar os Perciformes, sendo caracterizados por uma maior estabilidade citogenética entre as espécies analisadas com 48 cromossomos acrocêntricos (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000).

O cariótipo com $2n=48$ cromossomos acrocêntricos é considerado para OHNO; ATKIN (1966), MURAMOTO et al. (1968), OHNO (1970) e OHNO (1974) apud BRUM (1995) o primitivo dos peixes teleósteos e uma herança dos primeiros vertebrados. No entanto, BRUM *op. cit.* discorda desta hipótese, considerando-a de difícil procedência, uma vez que estudos de grupos externos aos teleósteos não mostram este complemento. Ele propõe uma nova hipótese, mais parcimoniosa, a respeito da ancestralidade dos peixes teleósteos, onde o complemento diplóide do primeiro teleósteo conteria algo em torno 60 cromossomos, e teria este cariótipo sido herdado por uma forma primitiva de Clupeiformes, que teve o número diplóide modal reduzido devido tanto a fusões quanto a deleções. Os Euteleostei teriam herdado e conservado este cariótipo principalmente em suas formas marinhas, assim como nas espécies marinhas de Atherinomorpha e Percomorpha, enquanto nos grupos típicos de água doce ele foi se tornando mais derivado. Segundo este autor, os cariótipos de Atheriniformes atuais seriam derivados de ancestrais com 48 cromossomos acrocêntricos, uma vez que exibem números diplóides e/ou valores de número fundamental diferentes de 48.

Embora o número de espécies cariotipadas na ordem Atheriniformes não seja significativamente alto, o número diplóide que recorre consistentemente neste grupo é $2n=48$ (KIRPICHNIKOV, 1981 apud GAJARDO, 1992; CHIARELLI; CAPANNA,

1973). Por exemplo, $2n=48$ pode ser encontrado tanto nas espécies cariotipadas da família Atherinopsidae, como na família Atherinidae (Tabela 2)

TABELA 2 - ESPÉCIES DE ATHERINIFORMES CARIOTIPADAS E SUAS RESPECTIVAS REFERÊNCIAS

FAMÍLIA	REFERÊNCIAS
Atherinidae	
<i>Menidia</i>	CHIARELLI e CAPANNA (1973)
<i>Melanotenía</i>	CHIARELLI e CAPANNA (1973)
<i>Basilichthys</i>	ARAI e KOIKE (1980)
<i>Basilichthys australis</i>	GAJARDO (1992)
Atherinopsidae	
<i>Odonthestes sp</i>	BRUGGER et al. (1990)
<i>Odonthestes bonariensis</i>	SOLA et al. (1988)
<i>Xenomelaniris brasiliensis</i> (atualmente <i>Atherinella brasiliensis</i>)	BRUM et al. (1996)
<i>Atherinella brasiliensis</i>	CORTINHAS et al. (2001); CORTINHAS (2002); DA SILVA CORTINHAS et al. (2003); NOLETO et al. (2004)

Partindo da hipótese de ARAI e NAGAIWA (1976) que propõem que o incremento de cromossomos bibráquiais é considerado como estado derivado, GAJARDO (1992) observou um alto número de cromossomos bibráquiais juntamente com o $2n=46$ em *Basilichthys microlepidotus*, sugerindo que esta espécie seja mais derivada cariotipicamente do que *B. australis* caracterizada no mesmo estudo. BRUM et al. (2001) também encontrou um número diplóide reduzido ($2n=44$) em *Porichthys porosissimus* (Batrachoidiformes), sugerindo que esta redução no valor de $2n$ deve-se a fusões cêntricas, dando origem a 4 cromossomos metacêntricos, e as inversões pericêntricas teriam dado origem aos outros cromossomos bibráquiais. Para BRUM (1995) e BRUM et al. (1995) o cariótipo derivado também conteria cromossomos bibráquiais, resultando num valor de $NF > 48$.

Os Atheriniformes possuem cariótipos derivados, haja vista a divergência no número de braços cromossômicos frente ao padrão de Perciformes ($NF=48$) (BRUM, 1995), confirmando o fato das inversões pericêntricas serem comuns durante a evolução cromossômica de teleósteos marinhos.

Assim, vários mecanismos parecem ter atuado na evolução cromossômica dos teleósteos. Segundo CANO et al. (1982) apud AFFONSO (2000) as inversões

pericêntricas estão entre os principais mecanismos envolvidos na evolução do cariótipo em teleósteos, levando a alterações no número de braços cromossômicos. A maioria das opiniões aponta para uma tendência no aumento do número fundamental (NF), seguida da redução de valores $2n$ (NOLETO, 2003).

Quanto à espécie *Atherinella brasiliensis*, dos estudos realizados no Brasil até o momento, foram cariotipadas espécies do litoral do Rio de Janeiro (BRUM et al., 1996), do litoral do Paraná (Baía de Paranaguá) (CORTINHAS et al., 2001; CORTINHAS, 2002; DA SILVA CORTINHAS et al., 2003; NOLETO et al., 2004) e da Lagoa da Conceição (SC), (DA SILVA CORTINHAS et al., 2003). Todos os estudos mostraram um $2n=48$, porém diferentes valores de NF.

Os resultados obtidos por BRUM et al. (1996) mostraram o mesmo número diplóide com 10M-SM, 38ST-A, e um número fundamental de 58, enquanto que no presente trabalho, o valor do NF é de 84. Esta diferença pode ser explicada pela dificuldade de se fazer uma perfeita distinção entre cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, devido ao reduzido tamanho, ao grau de condensação do cromossomo e da qualidade das metáfases.

No estudo realizado por CORTINHAS et al. (2001) foi encontrado um número diplóide modal de 48 ($2n=48$), com fórmula cariotípica 4M, 14SM, 30ST-A, e um número fundamental de 66 (NF=66). Esta diferença encontrada no valor do NF é explicada pelo fato de que no trabalho acima citado, os cromossomos subtelocêntricos foram considerados como portadores de um braço cromossômico, enquanto que neste estudo optamos por considerar estes cromossomos como portadores de dois braços, norma esta estabelecida no I Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicals em 1986.

DA SILVA CORTINHAS et al. (2003) também encontrou $2n=48$ cromossomos com fórmula cariotípica padrão de 4M, 10SM, 14ST, 20A perfazendo um número fundamental de 76. Este cariótipo foi considerado o de maior frequência, visto que os autores detectaram a ocorrência de cinco diferentes citótipos nas espécies analisadas da Baía de Paranaguá que diferiam quanto aos números fundamentais e fórmulas cariotípicas: citótipo 1- NF=78 (6M, 10SM, 14ST, 18A), citótipo 2- NF=82 (4M, 12SM, 18ST, 14A), citótipo 3- NF=80(4M, 16SM, 12ST, 16A), citótipo 4- NF=86 (4M, 16SM, 18ST, 10A) e citótipo 5- NF=80 (2M, 14SM, 16ST, 16A), enquanto que na Lagoa da Conceição foi detectado apenas 1 citótipo diferente com NF=80 (4M,

20SM, 8ST, 16A). Nenhum dos 5 citótipos descritos para a Baía de Paranaguá confere com a fórmula cariotípica descrita no presente estudo, variando ora o número de M/SM, ora SM/ST ou ainda ST/A. Isto pode se dever ao tamanho reduzido ou grau de condensação do cromossomo, dificultando o estabelecimento dos tipos cromossômicos nestes peixes, ou ainda, mesmo sendo raro em peixes marinhos, devido à estrutura populacional e à homogeneidade do ambiente, os diferentes citótipos encontrados, segundo o estudo realizado, poderiam estar refletindo um processo de evolução biológica.

Os resultados acima citados foram corroborados por NOLETO et al. (2004), que estudaram esta espécie também na costa paranaense, entretanto o valor de NF não foi seguramente determinado, variando de 80 e 84, uma vez que o número de cromossomos acrocêntricos variou de 6 a 8 pares. Esta divergência mostra novamente a dificuldade em estabelecer os tipos cromossômicos nestes peixes, o que faz persistir a dúvida sobre o verdadeiro valor do NF nos cariótipos descritos.

No ambiente marinho, as barreiras ao fluxo gênico são complexas e nem sempre identificáveis, especialmente quando se considera a participação de fatores dinâmicos associados aos potenciais dispersivos de um grupo vivente (MOLINA; GALETTI, Jr., 2004). Mas, considerando-se a diversificação cariotípica de peixes como um todo, observa-se um conservadorismo cariotípico mais extensivo nos teleósteos marinhos, o que poderia ser devido à menor barreira física existente, à homogeneidade das condições ambientais, à maior vagilidade de seus representantes e à ocorrência de populações constituídas por um grande número de indivíduos, não restringindo muito o fluxo gênico entre as populações (BRUM, 1995). Neste contexto, uma possível estruturação das populações de *Atherinella brasiliensis* pode estar ocorrendo considerando-se o potencial dispersivo da espécie, visto que o padrão triangular dos movimentos migratórios (área de desova, áreas de criação/berçário e áreas de alimentação dos adultos) manifesta-se no plano vertical (BARNES; HUGHES, 1988), sendo portanto capaz de restringir o fluxo gênico entre populações de uma mesma Baía. Isto pode então vir a se refletir no cariótipo, como foi observado por DA SILVA CORTINHAS et al. (2003).

Outro aspecto de destaque na estrutura cariotípica de *Atherinella brasiliensis* diz respeito à ausência de cromossomos sexuais. Os peixes, diferentemente das aves e mamíferos, não apresentam cromossomos sexuais na base de sua filogenia. Assim,

esse caráter deve ter surgido de forma independente e repetida na história evolutiva desse grupo, onde algumas espécies apresentam cromossomos sexuais bem diferenciados, embora essa ocorrência não seja freqüente (ARTONI et al., 2000).

Quanto à microestrutura cariotípica, o bandamento C na espécie *A. brasiliensis* revelou um padrão comum presente entre os peixes, onde observa-se uma tendência à presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos (GOLD; AMEMIYA; ELLISON, 1986; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO FILHO, 1989 apud CORTINHAS, 2002). Contudo, além dessas marcações, observou-se segmentos pericentroméricos com grandes blocos heterocromáticos em cromossomos submetacêntricos, subtelo-cêntricos e acrocêntricos e ocupando todo o braço de um par de cromossomos metacêntricos. Estes blocos heterocromáticos em regiões pericentroméricas e no braço de um par de cromossomos metacêntricos, foi também encontrado para a espécie no estudo feito por DA SILVA CORTINHAS et al. (2003).

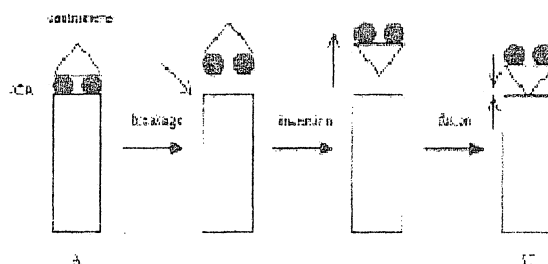
Blocos heterocromáticos ocupando todo um braço de mais de um cromossomo bbraquial, sugere que possivelmente este cromossomo pode ter evoluído de um acrocêntrico por progressiva acumulação de seqüências repetitivas (FISCHER et al., 2000) e posterior inversão pericêntrica.

A maior relevância da adição de heterocromatina estaria na influência que esta exerce no processo de diferenciação cariotípica (MOLINA; GALETTI, 2004), representando um pré-requisito importante para que ocorram mudanças funcionais e estruturais no complemento cromossômico (CAPUTO et al., 2001). É proposto ainda que o desenvolvimento de blocos heterocromáticos no braço curto de vários cromossomos seja um mecanismo importante de estabilização de cromossomos recém formados por fissões cêntricas (IMAI, 1993 apud AFFONSO, 2000) além de, facilitar as fusões entre elementos translocados (CAPUTO et al., 2001), atuar no processo inicial da origem e desenvolvimento de cromossomos sexuais, representando uma forma efetiva de isolamento meiótico entre cromossomos (SING et al., 1980; MOREIRA-FILHO et al., 1993 apud CIPRIANO, 2005), manter a estrutura do núcleo celular, favorecer o pareamento na meiose e proteger regiões geneticamente ativas (HSU et al., 1975; BIANCHI, 1977; BABU, 1998). No entanto, nem todas estas propriedades são constantes ou exclusivas, o que faz da heterocromatina um material extremamente complexo e difícil de ser definido.

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) seguiram um padrão comum em peixes marinhos com apenas um par marcado pela impregnação com nitrato de prata. Este padrão de RONs simples, em que apenas 2 cromossomos apresentam marcações é considerado comum não só para os teleósteos, mas para a grande maioria dos vertebrados (SCHMID, 1980). Em peixes, das 231 espécies descritas em relação ao número e localização de RONs, cerca de 71% apresentam RONs simples (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000). Esta alta frequência de RONs simples, está de acordo com a posição basal dos mesmos dentro do grupo dos vertebrados, visto que em mamíferos considera-se este caráter primitivo (HSU et al., 1975).

Seguindo um padrão de outros teleósteos modernos e das espécies *Odonthestes bonariensis* (SOLA et al., 1988) *Odonthestes sp* (BRUGGER et al., 1990), as regiões organizadoras de nucléolo de *A. brasiliensis* estão situadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos com dois braços. Estes cromossomos podem ter evoluído de acrocêntricos que apresentavam as RONs e que sofreram posterior inversão pericêntrica (AFFONSO et al., 2002) (Figura 12). DA SILVA CORTINHAS et al. (2003) detectaram as RONs no braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos, devendo-se esta diferença provavelmente ao fato de que os autores não levaram em consideração a constrição secundária ao fazer a classificação do tipo cromossômico.

FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO HIPOTÉTICA DA ORIGEM DA RON EM CROMOSSOMOS BIBRAQUIAIS (AFFONSO et al., 2002)



Quanto aos heteromorfismos das RONs, AMEMIYA e GOLD (1986) apud CORTINHAS (2002) propõem três diferentes tipos: de atividade, em que somente uma RON do par de cromossomos é transcricionalmente ativa, sintetizando RNAr;

de deleção de RON, em que um dos dois homólogos perde uma RON inteira; de tamanho, quando um homólogo marcado pela RON apresenta diferença em tamanho. Os dois primeiros tipos de heteromorfismos não são detectados pela coloração convencional em Giemsa e nem por impregnação por nitrato de prata, fazendo-se necessário a utilização de outras técnicas, como por exemplo, tratamento com corantes fluorescentes e hibridação *in situ* com sonda 18S.

Heteromorfismos de tamanho são bastante freqüentes em peixes, sendo encontrados também em outros vertebrados (SCHMID, 1982; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 1985). Geralmente estes heteromorfismos se devem à associações de RONS em cromossomos homólogos ou não homólogos, onde pode ocorrer troca de segmentos entre os cromossomos do par (DENTON; HOWELL; BARRET, 1976 apud NOLETO, 2003). Este tipo de polimorfismo foi detectado em *Odontesthes bonariensis* (SOLA et al., 1988) e em *Atherinella brasiliensis* (CORTINHAS, 2002), entretanto isto não foi observado para esta espécie no presente estudo, fazendo-se necessária a utilização de técnicas que permitam a verificação se há heteromorfismo com relação a perda da RON em um dos homólogos ou por atividade de apenas um par cromossômico.

As RONS podem estar associadas às constrições secundárias e são geralmente observadas ao menos em um cromossomo do conjunto haplóide de cada espécie. Segundo WARBURTON e HENDERSON (1978) apud WASKO (1996), quando se observa apenas um par de cromossomos com contração secundária, esta geralmente corresponde à Região Organizadora de Nucléolo. Em peixes, geralmente se observa a associação de RONS à regiões heterocromáticas, ou seja, à regiões banda C+, ao contrário do que se observa em mamíferos (ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 1985). A presença de heterocromatina congruente às RONS parece contribuir para as altas taxas de rearranjos cromossômicos, uma vez que servem de embasamento à probabilidade da ocorrência de inversões pericêntricas envolvendo estas regiões. Sabe-se que a heterocromatina formada geralmente por DNA repetitivo, pode ser mais propensa a modificações, desempenhando um papel basicamente estrutural na evolução cariotípica (WICHMAN et al., 1991 apud AFFONSO, 2000). Associação de RONS às constrições secundárias foram observadas em estudos feitos em espécies marinhas, incluindo nos exemplares de *A. brasiliensis* analisados por DA SILVA CORTINHAS et al. (2003). Associações

com segmentos heterocromáticos também foram verificadas em alguns peixes marinhos, incluindo *Odontesthes bonariensis* (SOLA et al., 1988) e *Atherinella brasiliensis* (DA SILVA CORTINHAS et al., 2003). Entretanto devido à dificuldade de se observar constrições secundárias nas metáfases analisadas e aos resultados insatisfatórios de bandamento seqüencial, não foi possível verificar tais associações.

A descrição cariotípica realizada nos exemplares de *Atherinella brasiliensis* pertencentes à Baía das Laranjeiras e sua comparação com as demais populações analisadas em diversos estudos, é de fundamental importância para uma melhor descrição do cariótipo e compreensão da evolução cromossômica para esta espécie de peixe. Para dados mais precisos, propõe-se ampliar a amostragem bem como melhorar a qualidade dos cromossomos e aplicar técnicas que unam a Citogenética Clássica à Molecular como a *hibridação in situ*, uma ferramenta capaz de relacionar a informação molecular de uma seqüência do DNA com sua posição física ao longo dos cromossomos. Estes dados podem colaborar ainda para um estudo que vem sendo realizado por Da Silva Cortinhas, com a mesma população de *A. brasiliensis*, só que utilizando marcadores moleculares (RAPD) para inferir sobre a possível estruturação de tais populações. Esta associação permite chegar mais próximo a uma real história evolutiva desta espécie e do grupo como um todo.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o resultados obtidos concluiu-se que:

- a) A população de *Atherinella brasiliensis* pertencentes a Baía das Laranjeiras apresenta um número diplóide de 48 cromossomos, como os demais Atherinopsidae cariotipados, possuindo um cariótipo com 4M, 14SM, 18ST, 12A e NF=84
- b) A técnica de impregnação por AgNO₃ evidenciou apenas um par de cromossomos, seguindo o padrão comum em peixes marinhos
- c) As bancas C marcaram regiões centroméricas, pericentroméricas e com vários cromossomos do complemento apresentando grandes blocos heterocromáticos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, P. R. A. M. **Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes)**. Dissertação (Mestrado: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2000.
- _____. GUEDES, W.; PAULS, E.; GALETTI Jr. P.M. Close karyotypical relationship between two species of marine angelfishes from South Atlantic: *Pomthua arcuata* and *P. Paru* (Perciformes, Pomacanthidae). **Caryologia**, 55:323-329, 2002.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. As Regiões Organizadoras de Nucléolos em Peixes. **Ciência e Cultura**, 37:448-453, 1985.
- ANGULO R. J.; ARAÚJO A. D. Classificação da costa paranaense com base na sua dinâmica, como subsídio à ocupação da orla litorânea. **Bol. Par. Geoc.** Curitiba, 44:7-17, 1996.
- ARAI, R.; NAGAIWA, K. Chromosomes of tetradontiform fishes from Japan. **Bull. Natn. Sci. Mus.**, Tokyo, Ser. A 2: 59-72, pls. 1-6, 1976.
- ARAI, R.; KOIKE, A. A karyotype study on two species of freshwater fishes transplanted into Japan. **Ibid.** 6:275-278, 1980.
- ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. Citogenética de peixes Neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, 6(1):43-60, 2000.
- BABU, A. Heterogeneity of heterochromatin in human chromosomes as demonstrated by restriction endonuclease treatment. In: VERMA, R. S. **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. New York: Cambridge University Press, p. 205-275, 1998.
- BARNES, R. S. K. & HUGHES, R. N. **An Introduction to Marine Ecology**. Blackwell Scientific Publications, 1988.
- BEMVENUTI, M. A. Abundância, distribuição e reprodução de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica**, 9: 5-32, 1987.
- _____. Hábitos alimentares de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica**, 12(1): 79-102, 1990.
- BERRA, T. M. **Na Atlas of distribution of the freshwater fish of the world**. Lincoln: University of Nebraska Press, p 197, 1981.
- BIANCHI, N.O. Algunas consideraciones sobre cromosomas y evolución. **Mendeliana**, 2 (2): 57-71, 1977.

BIZERRIL, C.R.S.F., COSTA, P. A. S., **Peixes marinhos do estado do Rio de Janeiro**. Fundação de estudos do mar, julho 2001.

BRUGGER, A.; BORN, G.G.; LEVY, S.A. Estudos preliminares cariotípicos e bioquímicos do peixe-rei (Atherinidae) na costa oceânica e região estuarina do Rio Grande, RS. In: III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, 1990, Botucatu, SP. **Resumo...** pp38, 1990.

BRUM, M. J. I. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. **Soc. Brasileira de Genética – Série Monografia**, 2, :5-42, 1995.

_____. OLIVEIRA, C. C.; GALETTI, P. M. Cytogenetic Studies of Two Puffer Species (*Sphoeroides*, Tetraodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Cytologia**, 60: 369-374, 1995.

_____. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Braz. J. Genet.*, 19(3): 421-427, 1996.

_____. CORRÊA, M.M.O.; PURCELL, C.A.; RIBEIRO, V.P.; MURATORI, R.S. Análise cromossômica em *Xenomelaniris brasiliensis* (ATHERINIDAE), *Micropogonias furnieri* (SCIANIDAE) e *Bathygobius soporator* (GOBIIDAE) do litoral do Estado do Rio de Janeiro. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos-SP. Resumos... São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, p. 101, 1996.

_____. GALETTI Jr., P. M. Teleostei Ground Plan Karyotype. **J. Comp. Biol.** 2(2): 91, 102. 1997.

_____. AFFONSO, P. R. A. M.; MOTA, L. C. G.; PAULS, E.; NETTO, M. R. C. B. Cytogenetic characterization of *Porichthys porosissimus* (Velenciennes, 1857) (Batrachoidiformes) from the Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Chromosome Science**, 5: 15-18, 2001.

CAPUTO, V.; MACHELLA, N. NISI-CERIONI, P.; OLMO, E. Cytogenetics of nine species of Mediterranean blennies and additional evidence for an unusual multiple sex-chromosome system in *Parablennius tentacularis* (Perciformes: Blennidae). **Chromosome Research** 9:3-12, 2001.

CERVIGÓN, F., R. CIPRIANI, W. FISCHER, L. GARIBALDI, M. HENDRICKX, A.J. LEMUS, R. MÁRQUEZ, J.M. POUTIERS, G. ROBAINA & B. RODRÍGUEZ. **Fichas FAO de identificación de peces para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América**. FAO, Roma, 513 pp, 1992.

CHERNOFF, B. Phylogenetic relationships and reclassification of menidiine silverside fishes, with emphasis on the tribe Membradini. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 138(1): 189-249, 1986.

CHIARELLI, A.B.; CAPANNA, E. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. New York: Academic Press, 1973.

CIPRIANO, R.R. **Estudos Citogenéticos em Teleósteos marinhos pertencentes a Baía de Paranaguá- Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2005.

CORRÊA, M.M.O. **Contribuição à citotaxonomia dos Scorpaeniformes (Osteichthyes - Teleostei): Estudos citogenéticos em espécies do litoral do Rio de Janeiro, Brasil**. Dissertação de mestrado, Museu Nacional do Rio de Janeiro/UFRJ, Rio de Janeiro. 123 pp, 1995.

CORRÊA, M.F.M. **Ictiofauna da Baía de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil). Composição, estrutura, distribuição espacial, variabilidade temporal e importância como consumo**. Tese (Doutorado em Zoologia) - Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2001.

CORTINHAS, M.C.; CESTARI, M.M.; FENOCCHIO, A. S. Resultados preliminares do estudo citogenético de *Atherinella brasiliensis* pertencentes ao litoral paranaense. In: 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia - SP. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.200, 2001.

_____. **Estudo Citogenético Comparativo de duas populações de *Atherinella brasiliensis* (Pisces, Atheriniformes, Atherinopsidae)**. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2002.

COSTA, P.R.; MOLINA, W. F. ; GALETTI Jr., P.M. Estudos citogenéticos em duas espécies de peixes marinhos do gênero *Orthopristis* (Haemulidae). In: 44º Congresso Nacional de Genética - Águas de Lindóia - SP. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.73, 1998.

DA SILVA CORTINHAS, M.C.; CESTARI, M. M.; SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A. S. First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, C-NOR and CMA3 bandings and FISH studies. **Caryologia**, 56, 2: 187-191, 2003.

DENTON, T. E. **Fish Chromosome Methodology**. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1973.

DYER, B.S. Phylogenetic Systematics and Historical Biogeographic of the Neotropical Silverside Family Atherinopsidae (Teleostei: Atheriniformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, E.R.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. e LUCENA, C.A. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS, p.519-536, 1998.

FAHAY, M.P. Guide to the early stages of marine fishes occurring in the Western North Atlantic Ocean, Cape Hatteras to the Southern Scotian Shelf. **J. Northw. Atl. Fish. Sci.**, 4: 423p, 1983.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*, 44(2):161-166, 1991.

FISCHER, C.; COSTAZ-OZOUF, C.; CROLLIUS, H. R.; DASILVA, C.; JAILLON, O.; BOUNEAU, L.; BONILLO, C.; WEISSENBACH, J.; BERNOT, A.; Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88: 50-55, 2000.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase 98: Concepts, Design and Data Sources**. Manila: ICLARM, 1998.

GAJARDO, G. M. Karyotypes of *Basilichthys microlepidotus* and *B. australis* (Pisces, Atherinidae). *Copeia* 1992():256-258, 1992.

HOSTIM-SILVA, M.; CLEZAR, L.; RIBEIRO, G. C.; MACHADO, C. Estrutura populacional de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes-Atherinidae) na Lagoa da Conceição, Sc, Brasil. *Arq. Biolo. Tecnol.* 38(3):949-960, 1995.

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

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of the 18 + 28 ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25-36, 1975.

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

LOWE-McCONNEL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Tradução de Anna Emília A. de M. Vazzoler, Ângelo Antonio Agostinho, Patrícia T. M. Cunningham. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. Tradução de: *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*, 1999

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2ª ed. Editora José Olympio. Rio de Janeiro. p.450, 1981.

MATHEY, R. **Les chromosomes des Vertébrés**. Rouge, Lausanne, 1949.

MOLINA, W. F. ; GALETTO Jr., P. M. Karyotypic changes associated to the dispersive potential on Pomacentridae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, USA, v. 309/1, n. 109, p. 01-11, 2004.

MOY-THOMAS, J. A.; MILES, R. S. **Paleozoic Fishes**. Chapman and Hall, London, 1971.

NELSON, J. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, New York. p.600, 1994.

NOLETO, R.B. Estudos citogenéticos em Tetraodontiformes, *Sphoeroides greeleyi*, *S. Testudineus* (Tetraodontidae) e *Cylichthys spinosus* (Diodontidae) pertencentes ao litoral do Paraná. Monografia de Bacharel em Ciências Biológicas (área de concentração: Genética) Univ. Fed. Do Paraná – Curitiba, 2003.

_____; SCZEPANSKI, T.S; DA SILVA CORTINHAS, M.C.; CIPRIANO R.R.; KANTEK D.L.Z.; CESTARI M.M. Análise Citogenética Preliminar em *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae), pertencentes ao litoral do Paraná. In: X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Natal - RN. **Resumos...** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 122, 2004.

OHNO, S. **Evolution by gene duplication**. New York, Springer-Verlag, p.160,1970.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Manaus – AM. **Resumos...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, p.119, 2000.

PATTERSON, C. The caudal skeleton of Lower Liassic pholidophorid fishes. **Bulletin of the British Museum (Natural History) Geology** 16 (5): 201–239, 1968.

_____; ROSEN, D.E. Review of Ichthyodectiform and other Mesozoic teleost fishes and the theory and practice of classifying fossils. **Bulletin of the British Museum (Natural History), Geology** 12: 201–239, 1977.

PATERSON, A.W.; WHITFIELD, A. K. Do SHALLOW- water habitats function as refugia for juvenile fishes? **Estuar. Coast. Shelf Sci**, London,51:359-364, 2000.

ROCHA, C.; FAVARO, L. F.; SPACH, H. L. Biologia reprodutiva de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus) (Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae) da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19 (1): 57 – 63, 2002.

SOLA,L.; NATILI,G.L.; CATAUDELLA,S. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) an Argentinae species introduced in Italy. **Genetica**, 77: 217-224, 1988.

_____; BRESSANELLO,S.; ROSSI,A.R.; IASELLI,V.; CROSSETTI,D.; CATAUDELLA,S. A karyotype análisis of the genus *Dicentrarchus* by different staining techniques. **Journal os Fish Biology**, 43: 329-337, 1993.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. Differentiation of GC and AT rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103, 1980.

SOUZA, I. L., MOREIRA-FILHO,O. and GALLETTI JR., P.M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Braz. J. Genet.** 19: 405-410, 1996.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeris heterochromatin. **Expl. Cell Res.**, 75:304-306, 1972.

VICENTE, V. E. **Estudos cromossômicos em três populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, SP, 78f., 1994.

WASKO, A.P. **Estudos citogenéticos no gênero *Bryconamericus* (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonômica – Evolutiva**. Dissertação de Mestrado – P.P.G. em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, SP. 165f., 1996.