

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ERNESTO BALEN

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Hollandichthys* sp. EIGENMANN, 1909
(TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA LITORÂNEA DO PARANÁ**

CURITIBA

2010

RAFAEL ERNESTO BALEN

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Hollandichthys* sp. EIGENMANN, 1909
(TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA LITORÂNEA DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

CURITIBA

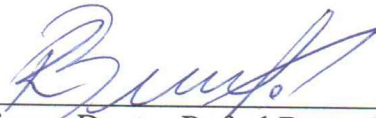
2010

P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **RAFAEL ERNESTO BALEN** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de agosto de 2010



Professor Doutor Rafael Bueno Noletto
Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de União da Vitória
Membro Titular

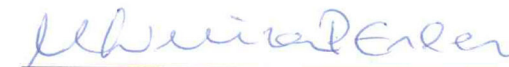


Professor Doutor Marcelo Ricardo Vicari
UEPG
Membro Titular



Professora Doutora Marta Margarete Cestarin
UFPR
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Visto:



Prof^a Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética

Aos meus amados pais, Irineu e Dionete.

Aos meus irmãos, Lorenzo, Mariana,
Ricardo e Julia.

Aos meus avós Doralino e Irene (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minha vida e por tudo que alcancei até hoje. Que venha mais!

À Prof^a Dr^a Marta Margarete Cestari, minha orientadora, por ter me aceitado e acreditado no meu trabalho, mesmo sabendo de minha inexperiência nesta área e por todo o apoio dado nas horas em que mais precisei – Obrigadão Marga!!!

Aos Profs. Dr. Roberto Artoni e Dr. Marcelo Vicari, pelo auxílio e por terem cedido o uso do Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG.

À galera do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese, especialmente aos mais velhos, ou seja, o agora Dr. Noletto e à Wanessa, pelas manhas/dicas passadas da Citogenética de peixes e pela presença/amizade diária; e aos estagiários/mestrandos/mestres/doutorandos Giselle, Lalá, Roger, Charuto, Nédia, Taynah, Paula, Gabi, Igor, Adri, Fucão, Kabelo, Kaline, Antônio, Gustavo e Tati, pelos hilários momentos dentro e fora do lab e toda a ajuda dispensada.

Ao mestre Fábio H. Rigoti, pela ajuda inicial, ter acreditado e dado motivação ao meu ingresso no PPG-Gen UFPR.

Ao biólogo Jeferson Nagata, essa figuraça, por suas coletas, mapas e por revelar a todos os esconderijos dos *Hollandichthys*, esse pequeno peixe incomum.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao pessoal da sala 06 (CEU 2007), pela recepção e camaradagem, fundamentais à minha adaptação nesta nova cidade, vocês deixaram e deixarão saudades.

Aos amigos da Confraria 400, Clebe (Caminhoneiro), Marcelo (Cabelera), João (Joãozinho), Rodrigo (Negão), Daniele, Renan, Tiago e Guilherme (Latino), pelas belas sextas e outras feiras passadas juntos.

Agradeço de coração a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida nesses três últimos anos, gostaria de poder abraçar a todos, mas não posso. Enfim, obrigado, muito obrigado mesmo.

In vino veritas.
(Zenóbio)

RESUMO

Hollandichthys multifasciatus está sendo tratado por vários autores como um complexo de espécies. Neste trabalho foram realizados estudos citogenéticos em duas populações de *H. multifasciatus*, coletadas em pequenos riachos dos municípios de Antonina - PR e Guaraqueçaba - PR. Ambas as populações apresentaram $2n = 50$ cromossomos e $NF = 100$, sem diferenciação entre os sexos. Somente um par de cromossomos se mostrou portador das regiões organizadoras do nucléolo (AgRON), confirmada após Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) com sonda de DNAr 18S. A maioria dos cromossomos apresentou pequenas bandas intersticiais heterocromáticas próximas ao centrômero, que se revelaram DAPI+. As duas populações divergiram tanto em relação ao número de submetacêntricos e subtelo-cêntricos (18sm e 18st para a população de Antonina, e 20sm e 16st para a de Guaraqueçaba), quanto ao número de sítios de DNAr 5S (quatro na população de Antonina e seis na de Guaraqueçaba). Somente a população de Antonina evidenciou uma marcação heterocromática centromérica nos cromossomos do primeiro par, e marcações teloméricas CMA₃⁺ e Coloração Iodeto-DAPI combinados (CPD) em dois cromossomos não-homólogos. Os resultados citogenéticos obtidos, somados aos disponíveis na literatura, permitiram inferir melhor sobre a citotaxonomia e a história evolutiva de *H. multifasciatus*, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies.

Palavras-chave: Citogenética. Complexo de espécies. Peixe de água doce. *Hollandichthys*.

ABSTRACT

Hollandichthys multifasciatus has been treated by many authors as a species complex. In this work, cytogenetic studies were carried out in two populations of *H. multifasciatus*, collected in two different streams in the municipalities of Antonina - PR and Guaraqueçaba - PR. Both populations presented diploid number $2n = 50$ chromosomes and $FN = 100$, with no difference between sexes. Only one pair of chromosomes was shown bearing the nucleolar organizer regions (AgNOR), confirmed after Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with 18S rDNA probes. Most chromosomes showed small interstitial heterochromatic bands near the centromere, which revealed DAPI⁺. Both populations diverged as much regarding the number of submetacentric and subtelocentric (18sm and 18st for Antonina's population, and 20sm and 16st for Guaraqueçaba's population), as the number of 5S rDNA probes sites (four in Antonina's population and six in Guaraqueçaba's population). Only Antonina's population evidenced a centromeric heterochromatic marking in the chromosomes of the first pair, and telomeric marking CMA₃⁺ and Combined PI-DAPI staining (CPD) in two non-homologous chromosomes. The cytogenetic results obtained, added to available in the literature, allowed to infer better about the cytotaxonomy and evolutionary history of *H. multifasciatus*, suggesting the occurrence of a species complex.

Key-words: Cytogenetics. Species complex. Freshwater fish. *Hollandichthys*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Árvore de consenso estrito de seis árvores mais igualmente parcimoniosas mostrando a inter-relação entre as espécies do gênero *Hollandichthys* e taxa relacionados, obtidas a partir da análise de 95 caracteres osteológicos e de morfologia externa. Em destaque, o clado mais intimamente relacionado com *Hollandichthys*..... 16
- Figura 2** – Bacia hidrográfica litorânea paranaense e suas sub-bacias 17

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Locais de coleta de *H. multifasciatus*: a. Riacho do Veiga, Antonina, PR; b. Rio Bananal, Guaraqueçaba, PR 47
- Figura 2** – Cariótipos em coloração convencional Giemsa de *H. multifasciatus* de Antonina (a) e *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (b). Em destaque, os cromossomos portadores de AgRONS. A barra representa 10µm. 48
- Figura 3** – Cariótipos de *H. multifasciatus* de Antonina (a) e de *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (b) evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Barra=10µm..... 49
- Figura 4** – Cariótipos de *H. multifasciatus* de Antonina (a-b) e *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (c-d) após dupla coloração CMA₃/DAPI, mostrando sítios quanto a riqueza de base GC e AT. A barra representa 10µm 50
- Figura 5** – Cariótipo de *H. multifasciatus* de Antonina após coloração CPD, indicando sua correspondência com sítios CMA₃⁺. A barra representa 10µm 51
- Figura 6** – Cariótipos de *H. multifasciatus* submetidos a FISH para localização dos sítios de DNAr: em (a) população de Antonina, após FISH com sondas de DNAr 18S; (b) população de Antonina, após FISH com sonda de DNAr 5S; em (c) população de Guaraqueçaba submetido a dupla FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e DNAr 5S (vermelho). Barra=10µm 52

APÊNDICE

Figura 1A – *Hollandichthys multifasciatus* coletados em Antonina, PR (a), e *H. multifasciatus* coletado em Guaraqueçaba, PR (b). Barras = 1 cm 62

Figura 2A – Locais de coleta: Riacho do Veiga (a), Tributário do rio Bananal (b) 62

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Revisão dos dados cariotípicos de <i>Hollandichthys multifasciatus</i> existentes até o momento	20
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Sumário dos dados citogenéticos de <i>Hollandichthys multifasciatus</i> e das espécies filogeneticamente relacionadas com esse táxon	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a – Acrocêntrico

cm – centímetros

CMA₃ – Do inglês “Chromomycin A₃”, cromomicina A₃

CPD – Do inglês “Combined PI + DAPI-staining”, coloração iodeto de propídio e DAPI combinados

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

FISH – Do inglês “Fluorescent *in situ* Hybridization”, hibridização *in situ* com sonda fluorescente

m – Metacêntrico

NF – Número fundamental

NOR – Do inglês “Nucleolar organizer region”, região organizadora do nucléolo

RON – Região organizadora do nucléolo

PI – Do inglês “Propidium iodide”, iodeto de propídio (IP)

pH – Potencial hidrogeniônico

PR – Estado do Paraná

RB – Relação entre os braços

sm – Submetacêntrico

st – Subtelocêntrico

UFPR – Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS COM ÊNFASE EM CHARACIDAE	12
1.2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO <i>Hollandichthys</i>	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE <i>Hollandichthys multifasciatus</i> EIGENMANN & NORRIS, 1900 (TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA LITORÂNEA DO PARANÁ - BRASIL	24
Resumo	25
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados	28
Discussão	30
Agradecimentos	36
Referências	36
Tabelas e Figuras	45
5. CONCLUSÕES GERAIS	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE – MATERIAL E MÉTODOS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS COM ÊNFASE EM CHARACIDAE

Os peixes formam o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados, distribuindo-se nas águas do mundo em grande variedade morfológica e comportamental. Aproximadamente 58% das espécies são marinhas, 41% dulciaquícolas e 1% são encontradas em ambientes de transição (MOYLE e CECH, 1982). De acordo com NELSON (2006), devem existir mais de 32.500 espécies de peixes vivas, no entanto, atualmente são conhecidas somente cerca de 28.000 espécies, distribuídas em 62 ordens e aproximadamente 515 famílias, representando mais da metade do número de espécies de vertebrados conhecidos.

A divisão Teleostei é considerada a mais derivada constituinte da Classe Actinopterygii (BRUM e MOTA, 2002), representando o mais numeroso e bem sucedido grupo de peixes, devido a sua abundância e diversidade entre os vertebrados, correspondendo a cerca de 96% de todos os peixes existentes.

A grande maioria dos Teleostei viventes pertence ao clado Euteleostei, o qual evoluiu antes do Cretáceo Superior. Dentre os euteleósteos mais especializados estão os Ostariophysii, que se encontram distribuídos cosmopolitamente e representam de 25 a 30% dos peixes atuais e cerca de 80% das espécies de água doce. Os Ostariophysii incluem cinco ordens: Gonorynchiformes, pertencente à Série Anotophysii; Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes e Gymnotiformes, pertencentes à Série Otophysi (POUGH et al., 2008).

A região neotropical apresenta a ictiofauna de água doce mais rica e diversa de todo o mundo (BUCKUP, 1998). Nesta região, Characiformes é uma das ordens mais representativas em relação ao número de espécies conhecidas, ao lado de Siluriformes (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

Consoante NELSON (2006), a ordem Characiformes é composta por 18 famílias, com cerca de 270 gêneros e pelo menos 1674 espécies, todas de água doce. Apesar de ainda serem pobremente conhecidas, a maioria dessas espécies apresenta grande diversidade morfológica e evolução convergente comum.

Tradicionalmente, o número das famílias de Characiformes varia entre 14 (GÉRY, 1978 apud NELSON, 2006), 16 (GREENWOOD et al., 1966 apud NELSON, 2006), e 18 (BUCKUP, 1998; NELSON, 2006). Esta diferença se deve fundamentalmente a diferentes delimitações da família Characidae, um grupo reconhecidamente não-monofilético. Por conseguinte, subgrupos monofiléticos têm sido regularmente excluídos de Characidae e transferidos para famílias à parte, como Crenuchidae (BUCKUP, 1998), Cynodontidae (MENEZES e LUCENA, 1998), Alestidae (ZANATA e VARI, 2005) e Serrasalmidae (CALCAGNOTTO; SCHAEFER; DESALLE, 2005; ORTÍ et al., 2008), aumentando o número de famílias em Characiformes.

Characidae é a maior e mais complexa família da ordem Characiformes. Seus representantes são encontrados desde a fronteira dos Estados Unidos com o México até a Argentina (NELSON, 2006). Na América do Sul, compreende cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros, sendo formada por peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros), que exploram uma grande variedade de *habitats* (BRITSKI; SATO; ROSA, 1984). Esta família abrange cerca de 400 espécies no território brasileiro, onde constituem a maior parte dos peixes de água doce e são conhecidos popularmente por lambari, piraicanjuba, piaba, peixe-cachorro e dourado, entre outros (BRITSKI, 1972; KAVALCO e PAZZA, 2007). Conforme BRITSKI; SILIMON; LOPES (2007), quase sempre apresentam uma nadadeira adiposa, possuem corpo revestido por escamas, são ótimos nadadores e apresentam tamanho variável de dois centímetros (cm) a 1 metro de comprimento.

Segundo BUCKUP (1999), muito pouco se sabe sobre a filogenia da família Characidae, sendo difícil até mesmo demonstrar seu monofiletismo, principalmente

devido ao pequeno número de representantes analisados até o momento – incluídos em menos de 10% dos gêneros da família –, devendo a mesma estar sendo representada por um aglomerado polifilético. BUCKUP (1999) também destaca que a identificação de espécies desse grupo é dificultada devido à grande diversidade do grupo, ao grande número de espécies não descritas, mal descritas ou pouco conhecidas, e à falta de trabalhos de revisão da sistemática da maioria de seus gêneros.

Embora existam evidências do monofiletismo de algumas das subfamílias de Characidae, a maior parte dos gêneros e espécies se encontra sem qualquer hipótese de relações, ou seja, em *Incertae sedis* (LUCENA e LUCENA, 2002; MALABARBA e WEITZMAN, 2003), devido a diversos problemas nomenclaturais e filogenéticos (BUCKUP; MENEZES, 2003; LIMA et al. 2003). Desta forma, gêneros e suas respectivas espécies, ou mesmo espécies de gêneros incluídos em alguma subfamília, são incluídos na família Characidae, sabidamente polifilética, mas não são incluídos em nenhuma subfamília, pois possuem relações pouco conhecidas entre si (GRAÇA e PAVANELLI, 2007). De acordo com CALCAGNOTTO; SCHAEFER; DESALLE (2005), grande parte destes gêneros e espécies devem formar um grupo monofilético.

Para esta família, LIMA et al. (2003) listam como *Incertae sedis* 9 espécies e 88 gêneros – estes contendo 620 espécies –, dos quais 47 são monotípicos, 23 contêm somente duas ou três espécies e outros são pobremente conhecidos taxonomicamente, podendo, até mesmo, não serem monofiléticos.

Conforme LIMA et al. (2003), o gênero *Hollandichthys* Eigenmann (1909) é considerado como *Incertae sedis* dentro de Characidae e composto somente por uma espécie válida, *Hollandichthys multifasciatus*, que deve tratar-se, no entanto, de um complexo de espécies. Conhecido popularmente como lambari-listrado, o comprimento máximo dessa espécie é de 9,64 cm e sua distribuição é restrita aos rios costeiros e ilhas marinhas associados à Mata Atlântica, do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, no Brasil (LIMA. et al., 2003), além da porção superior do rio Tietê,

na drenagem do rio Paraná (LANGEANI, 1989), onde deve, provavelmente, ter sido resultado da introdução artificial pelo homem (THOMAZ, 2010).

Na última revisão do grupo, BERTACO (2003) redescreve e revalida a espécie-tipo, *H. multifasciatus* (Eigenmann & Norris), e as espécies nominais *H. affinis* (Steindachner) e *H. perstriatus* (Miranda-Ribeiro). Além disso, cinco novas espécies são descritas, reconhecendo-se um total de oito morfoespécies para o gênero, todas alopátricas. BERTACO (2003) também define as relações de parentesco desse grupo, com *Hollandichthys* sendo grupo-irmão de *Pseudochalceus* e este clado sendo mais intimamente relacionado com o clado formado por *Nematobrycon*, *Rachoviscus*, *Nematocharax* e *Aphyocharax* do que com outros representantes de Characidae (Figura 1). MIRANDE (2009) estudou a filogenia de 160 espécies de Characidae e famílias relacionadas, com relação a 360 caracteres morfológicos, e propôs o gênero *Hollandichthys* em um grupo chamado “Bramocharax”, formado pelos gêneros *Hollandichthys* + *Pseudochalceus* + *Bramocharax* + *Oligosarcus*.

Dados de sequências moleculares posicionam o gênero *Hollandichthys* em diferentes grupos. Analisando sequências de genes nucleares e mitocondriais, JAVONILLO et al. (2010) relataram a posição de *Hollandichthys* em um clado com *Rachoviscus* + *Moenkhausia* + *Thayeria*. Por outro lado, trabalhando com as oito morfoespécies do gênero *Hollandichthys*, THOMAZ (2010) propôs que o gênero *Hollandichthys* é grupo-irmão de *Rachoviscus*, sendo, porém, agrupado no mesmo clado de *Pseudochalceus*, *Nematocharax* e *Hyphessobrycon uruguayensis*.

THOMAZ (2010) afirma ainda que em *Hollandichthys* se encontram somente duas espécies reciprocamente monofiléticas: *Hollandichthys* sp. A e *Hollandichthys* sp. C, pertencentes aos clados sul e norte, respectivamente, reconhecendo, porém, que ambas as espécies fazem todas as outras seis morfoespécies parafiléticas em relação às árvores gênicas, podendo indicar que eventos de especiação dentro dos clados sul e norte em *Hollandichthys* são recentes e ainda não refletiram totalmente nas linhagens coalescentes de DNAm.

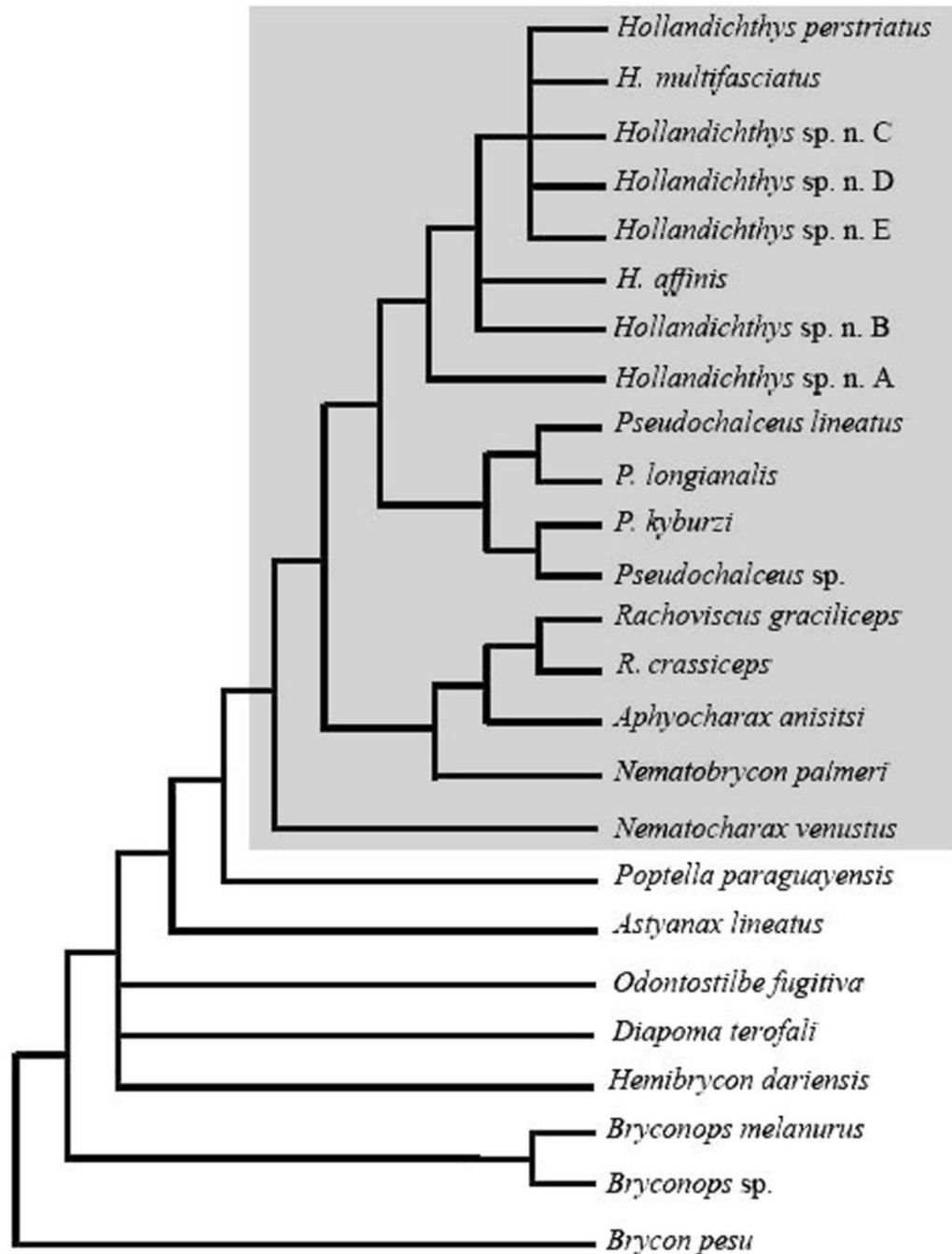


Figura 1 – Árvore de consenso estrito de seis árvores mais igualmente parcimoniosas mostrando a inter-relação entre as espécies do gênero *Hollandichthys* e taxa relacionados, obtidas a partir da análise de 95 caracteres osteológicos e de morfologia externa. Em destaque, o clado mais intimamente relacionado com *Hollandichthys*.

Fonte: Modificado de BERTACO (2003).

Segundo BIGARELLA (1978), o Estado do Paraná compreende duas bacias hidrográficas principais: a bacia hidrográfica do rio Paraná, que abrange todos os rios com drenagem voltada para oeste, noroeste e norte; e a bacia hidrográfica

Atlântica, que é constituída pelos rios que drenam o leste paranaense e deságuam no oceano Atlântico. MAACK (1968) subdividiu a bacia hidrográfica do Atlântico em seis sub-bacias: Ribeira, Baía das Laranjeiras, Baía de Antonina, Nhundiaquara, Baía de Paranaguá e Baía de Guaratuba. Com exceção da primeira, todas drenam suas águas para as baías de Paranaguá e de Guaratuba e constituem a Bacia Litorânea do Estado do Paraná (Figura 2).

Para BERTACO (2003), no Estado do Paraná ocorre a presença de duas espécies: *H. affinis*, encontrada em rios costeiros e ilhas desde o rio Jaraguá, em Jaraguá do Sul, Santa Catarina, até o rio Nhundiaquara, em Morretes, Paraná (Figura 2, sub-bacias c, d, e); e *Hollandichthys* sp. C, encontrada em pequenos afluentes dos rios Morato e Braço do Macaco, em Guaqueçaba, Paraná (Figura 2, sub-bacia a).

HIDROGRAFIA DO ESTADO DO PARANÁ



Figura 2 – Bacia hidrográfica litorânea paranaense e suas sub-bacias
Fonte: Modificado de IPARDES (1995).

1.2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO *Hollandichthys*

Peixes de água doce, quando comparados com peixes marinhos, geralmente apresentam grande variabilidade no número diplóide e na composição cromossômica, incluindo diferentes quantidades de metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (OLIVEIRA et al., 1988). Consoante BRUM e GALETTI JR. (1997) e OLIVEIRA et al. (1988), os Ostariophysi tendem a apresentar um número diplóide de $2n = 50$ cromossomos, especialmente os Otophysi. Estes, no entanto, apresentam um número fundamental (NF) muito maior que 50, refletindo a presença de muitos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos no cariótipo de muitas espécies desse grupo.

Segundo ARTONI; VICARI; BERTOLLO (2000), os Characiformes apresentam uma ampla variabilidade cariotípica, onde se observam grupos com cariótipos bastante heterogêneos ao lado de outros bem mais conservados, existindo, de modo geral, dois padrões de diversificação cromossômica. No primeiro, famílias como Erythrinidae e alguns gêneros pertencentes à família Characidae, como *Serrasalmus* e *Astyanax*, por exemplo, mostram grande variabilidade quanto ao número e estrutura cromossômica e, no segundo grupo, famílias como Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, Hemiodontidae e Parodontidae mostram pequena variação numérica e estrutural no cariótipo (BERTOLLO; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1986; GALETTI JR.; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1994; CESTARI e GALETTI JR., 1992; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR., 1985, entre outros).

Conforme DANIEL-SILVA (1996), os Characidae apresentam cromossomos relativamente grandes, especialmente se comparados com os de alguns grupos de Siluriformes como os Pimelodidae, além de grande variabilidade de número e fórmula cariotípica, tanto entre espécies de um mesmo gênero como entre populações de uma mesma espécie. Cariótipos com 50 cromossomos parecem ser predominantes entre os representantes desta família (ALMEIDA-TOLEDO, 1978;

FALCÃO e BERTOLLO, 1985; MARCO, 1986; PORTELA; GALETTI JR.; BERTOLLO, 1988).

Algumas peculiaridades ocorrem em muitas espécies de Characidae, como o tamanho relativamente maior do primeiro par de cromossomos metacêntricos, em relação aos demais pares do complemento (SCHELL, 1972; MORELLI et al., 1983; DANIEL-SILVA, 1996), e a presença de RONS múltiplas (ALMEIDA-TOLEDO e FORESTI, 1983), embora a condição mais simples, ou seja, apenas um par cromossômico envolvido com a organização nucleolar, seja a mais frequentemente encontrada (PESCATORI, 2008).

Dados citogenéticos sobre *H. multifasciatus* se restringem a apenas um resumo de congresso científico e um artigo publicado (Tabela 1). Nos trabalhos de VIEIRA; OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO (1988) e CARVALHO; OLIVEIRA; FORESTI (2002), as populações analisadas caracterizaram-se por um número diplóide conservado de $2n = 50$ cromossomos, com variações na morfologia, localização da RON, e posição, número e localização da heterocromatina constitutiva, sem heteromorfismo cromossômico sexual.

VIEIRA; OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO (1988) analisaram exemplares de *H. multifasciatus* da região de Itanhaém – SP e observaram um número diplóide de $2n = 50$ cromossomos, sendo 12 cromossomos metacêntricos (m), 24 cromossomos submetacêntricos (sm), 12 cromossomos subtelo-cêntricos (st) e 2 cromossomos acrocêntricos (a). A RON situou-se próxima ao centrômero de um par de metacêntricos pequenos e a banda-C evidenciou marcações pericentroméricas e intersticiais na porção proximal do braço longo da maioria dos cromossomos.

Em exemplares coletados no rio Grande, região de Paranapiacaba – SP, CARVALHO; OLIVEIRA; FORESTI (2002), observaram um cariótipo um pouco diferente, sendo $2n = 50$ cromossomos, compostos por 10m, 12sm e 28st. A RON foi observada na posição intersticial do braço longo do quarto par de cromossomos (m). Pequenos blocos heterocromáticos foram observados em todos os cromossomos na posição pericentromérica.

Tabela 1 – Revisão dos dados cariotípicos de *Hollandichthys multifasciatus* existentes até o momento

Espécie	Locais de coleta	Exemplares		2n	Cariótipo	NF	RONs	Bandas C	Bs	Crom. Sex	Ref.
		M	F								
<i>H. multifasciatus</i>	Itanhaém, SP	1	1	50	12m+24sm+12st+2a	98	2	Pericentroméricas e Intersticiais	Não	Não	1
<i>H. multifasciatus</i>	Rio Grande, Paranapiacaba, SP	3	4	50	10m+12sm+28st	100	2	Pericentroméricas	Não	Não	2

M, machos; F, fêmeas; 2n, número diplóide; RONs, número de cromossomos portadores de RONs; Bs, presença de cromossomos B; Crom. Sex, presença de cromossomos sexuais; Ref., referências.

Referências: 1. Vieira; Oliveira; Almeida-Toledo (1988); 2. Carvalho; Oliveira; Foresti (2002).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visou o estudo citogenético de peixes do gênero *Hollandichthys* pertencentes à Bacia Hidrográfica Litorânea do Estado do Paraná, buscando conhecer a composição cariotípica e fazer inferências sobre a evolução cromossômica e as inter-relações filogenéticas dos táxons componentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) caracterizar cromossomicamente espécies do gênero *Hollandichthys*, com a utilização de coloração convencional (Giemsa);
- b) localizar as regiões organizadoras de nucléolo (RONs), através de impregnação por nitrato de prata, e as regiões heterocromáticas pelo bandamento C;
- c) verificar possíveis marcadores no cariótipo das espécies estudadas utilizando técnicas de coloração diferencial como os fluorocromos Cromomicina A₃, DAPI e CPD (coloração IP/DAPI combinados);
- d) localizar os genes ribossomais 18S e 5S no complemento cariotípico por meio de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH);
- e) discutir os resultados obtidos a fim de ampliar o conhecimento quanto à citotaxonomia e história evolutiva dos peixes estudados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Toda a metodologia utilizada neste trabalho encontra-se detalhada no Apêndice, de acordo com as Normas do Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão organizados em um capítulo, que corresponde a um artigo em fase de preparação para submissão para a apreciação de revistas científicas.

CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Hollandichthys multifasciatus* EIGENMANN & NORRIS, 1900 (TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA LITORÂNEA DO PARANÁ – BRASIL.

4.1. CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Hollandichthys multifasciatus*
EIGENMANN & NORIS, 1900 (TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA LITORÂNEA
DO PARANÁ – BRASIL*

*Este artigo será enviado para Journal of Fish Biology.

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Hollandichthys multifasciatus*
EIGENMANN & NORRIS, 1900 (TELEOSTEI: CHARACIDAE) DA BACIA
LITORÂNEA DO PARANÁ – BRASIL**

R. E. BALEN *[¥], R. B. NOLETO**, M. R. VICARI[§], R. F. ARTONI[§], M. M. CESTARI**

* Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Centro Politécnico, Caixa Postal 19071, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil, ** Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras, Departamento de Biologia, União da Vitória, PR, Brasil e § Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Ponta Grossa, PR, Brasil

Resumo

Foram estudadas duas populações de *Hollandichthys multifasciatus* da bacia litorânea do Estado do Paraná, Brasil. Ambas apresentaram $2n = 50$ cromossomos e $NF = 100$, sendo $14m+18sm+18st$ para a população de Antonina - PR e $14m+20sm+16st$ para a população de Guaraqueçaba - PR. Análises das AgRONS detectaram um sistema simples, na posição intersticial proximal de cromossomos metacêntricos, confirmado após FISH com sonda DNAr 18S. O DNAr 5S mostrou um padrão interpopulacional divergente, com a população de Guaraqueçaba apresentando três pares marcados e a população de Antonina apenas dois pares. O padrão de heterocromatina constitutiva foi similar em ambas populações, com a presença de pequenas bandas intersticiais na maioria dos cromossomos, exceção feita à marcação centromérica nos cromossomos do par 1 (m) da população de Antonina. Quase todas as bandas heterocromáticas se apresentaram ricas em bases A-T. A população de Antonina apresentou, ainda, duas marcações G-C ricas na porção telomérica de dois cromossomos não-homólogos. Os resultados obtidos corroboram a idéia da existência de um complexo de espécies em *H. multifasciatus*

[¥] Autor para quem as correspondências devem ser endereçadas. Tel.: +55 41 3361 1749; fax: +55 41 3361 1793; email: rebalen@yahoo.com.br

e de sua alopatria, estabelecida pela baía de Paranaguá e as montanhas da Serra do Mar.

Palavras-chave: Região Neotropical, DNAr 5S, CMA₃⁺, *Hollandichthys*.

Introdução

Hollandichthys multifasciatus (Eigenmann & Norris, 1900) é um peixe de pequeno porte conhecido popularmente como lambari-listrado, com distribuição restrita a pequenos rios costeiros associados à Mata Atlântica brasileira, do Estado do Rio de Janeiro ao Estado do Rio Grande do Sul. Pertence ao gênero *Hollandichthys* Eigenmann, atualmente monotípico e *Incertae sedis* dentro de Characidae, embora se especule que seja formado por um complexo de espécies (Lima et al., 2003). Bertaco (2003) e Mirande (2009), analisando caracteres morfológicos, consideram *Hollandichthys* como grupo-irmão de *Pseudochalceus* (Kner). Não obstante, Javonillo et al. (2010) e Thomaz (2010), utilizando-se de dados moleculares, o posicionam como grupo-irmão de *Rachoviscus* (Myers). Bertaco (2003) sugere que no Estado do Paraná ocorram duas espécies, uma mais ao norte, na Bacia Hidrográfica das Laranjeiras, e outra mais ao sul, nas Bacias Hidrográficas do rio Nhundiaquara e das Baías de Paranaguá e de Guaratuba.

Até o presente momento, somente dois estudos citogenéticos haviam sido realizados em *H. multifasciatus*, onde se puderam observar algumas diferenças na macroestrutura cariotípica, apesar do número diplóide de $2n = 50$ cromossomos manter-se conservado (Vieira et al., 1988; Carvalho et al., 2002). Contudo, esses dados cariológicos somente haviam sido obtidos através da coloração convencional com Giemsa, bandamento C e AgRON. Além destas técnicas de citogenética

clássica, este trabalho traz informações referentes à coloração com os fluorocromos base-preferenciais CMA₃ e DAPI, à técnica de coloração Iodeto de Propídeo/DAPI combinados (CPD) e à hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e DNAr 5S, para duas populações de *H. multifasciatus*.

Na Tabela 1 encontram-se agrupados os dados citogenéticos de *H. multifasciatus* e das espécies filogeneticamente relacionadas com este táxon, conforme Bertaco, 2003; Mirande, 2009; Javonillo et al., 2010 e Thomaz, 2010.

Este trabalho teve por objetivo verificar a existência de diferenciação cariotípica entre duas populações de *H. multifasciatus* de duas diferentes localidades da Bacia Hidrográfica Atlântica do Estado do Paraná, procurando-se, desta maneira, subsídios para esclarecer a hipótese de *H. multifasciatus* ser um complexo de espécies.

Material e Métodos

Foram realizadas análises citogenéticas em 17 exemplares de *H. multifasciatus* coletados em dois diferentes rios da Bacia Hidrográfica Atlântica do Estado do Paraná, Brasil (Figura 1): 13 exemplares (7 machos e 6 fêmeas) do riacho do Veiga, município de Antonina, Paraná (25°20'25.48"S 48°46'53.77"W) (Figura 1a), e 4 exemplares (3 machos e 1 fêmea) coletados em um pequeno tributário do rio Bananal, município de Guaraqueçaba, Paraná (25°11'38.00"S 48°23'23.90"W) (Figura 1b).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos através da técnica de preparação direta (Bertollo et al., 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram coradas com solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃) (Howell e Black, 1980). A

detecção da heterocromatina constitutiva foi obtida conforme Sumner (1972). Para a dupla coloração CMA3/DAPI e CPD foram empregadas as técnicas de Schweizer (1976) e Andras et al. (2000), respectivamente. A localização cromossômica de genes ribossomais 18S e 5S foi realizada por hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) e Dupla FISH (Pinkel et al., 1986), com modificações. Utilizou-se sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e DNAr 5S de *Leporinus elongatus* (Martins e Galletti Jr., 1999). As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP, por reações de *nick translation* (BioNick™ Labeling System, Invitrogen), e com digoxigenina 11-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche Applied Science), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para a detecção do sinal foram utilizados os conjugados streptavidina-FITC e anti-digoxigenina rodamina.

Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964).

Resultados

População de Antonina

Todos os exemplares analisados desta população mostraram número diplóide de $2n=50$ cromossomos, distribuídos em $14m+18sm+18st$, $NF=100$ (Figura 2a). Não foi detectado heteromorfismo cromossômico sexual.

Análises das AgRONS mostraram marcação simples situada na região intersticial próxima ao centrômero, no braço longo do par cromossômico número 5, metacêntrico pequeno (Figura 2a – Box).

O bandamento C mostrou a existência de pequenas bandas intersticiais na região proximal dos braços longos da maioria dos cromossomos, principalmente nos

submetacêntricos. No par 1 (m), além da banda intersticial, também se observou uma marcação centromérica (Figura 3a).

As regiões da RON se mostraram CMA₃ positiva, ou seja, rica em bases G-C, após dupla coloração com CMA₃/DAPI (Figura 4a). Todas as bandas intersticiais marcadas pelo bandamento C foram DAPI positivas (Figura 4b). As bandas heterocromáticas centroméricas demonstraram ter uma riqueza relativa, uma vez que não houve prevalência de sinal para ambos os fluorocromos. Observou-se também marcação CMA₃⁺ na região telomérica de dois cromossomos não-homólogos: um submetacêntrico, pertencente ao par 12, e o outro subtelo-cêntrico, pertencente ao par 22. Tanto as marcações CMA₃⁺ das RONs como a dos telômeros e a DAPI⁺ para as bandas heterocromáticas intersticiais foram corroboradas pela técnica IP/DAPI combinados (CPD) (Figura 5).

A FISH com sonda de DNAr 18S confirmou a localização das AgRONs, não identificando nenhum cístron silenciado (Figura 6a). Nesta população, evidenciou-se a existência de dois pares portando sítios de DNAr 5S (Figura 6b), localizados no braço curto do par cromossômico 1 (m), próximas ao centrômero, e na região proximal do braço longo do par cromossômico 8 (sm), ambos associados à heterocromatina constitutiva.

População de Guaraqueçaba

O número diplóide obtido para esta população foi de $2n=50$ cromossomos (Figura 2b), porém, com fórmula cariotípica $14m+20sm+16st$, $NF=100$, sem diferenças cromossômicas entre os sexos.

O par cromossômico portador das AgRONS é o de número 5, pertencente ao grupo de metacêntricos. Essas marcações encontram-se na região proximal do braço curto (Figura 2b – Box).

A Figura 3b mostra um cariótipo evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva representada por pequenas marcações positivas localizadas em posição intersticial proximal, no braço longo da maioria dos pares cromossômicos, principalmente nos submetacêntricos.

Após dupla coloração CMA₃/DAPI, as marcações AgRONS positivas também se apresentaram CMA₃⁺ (Figura 4c). As marcações heterocromáticas demonstraram ser DAPI⁺ (Figura 4d). Não se observou a presença de sítios teloméricos CMA₃⁺.

A dupla FISH (Figura 6c) evidenciou apenas os sítios AgRONS para a sonda 18S. Para o DNAr 5S, observou-se a presença de 6 sítios, dois deles no braço curto do par cromossômico metacêntrico 1, dois no braço longo do par cromossômico 8 (sm), e dois no braço longo dos cromossomos do par 18 (st), todos na região pericentromérica e associados à heterocromatina constitutiva.

Discussão

As duas populações apresentaram o mesmo número diplóide, de $2n = 50$ cromossomos, e número fundamental de $NF = 100$, sem diferenças entre os sexos. Este número de cromossomos parece ser uma característica plesiomórfica para Characidae (Oliveira et al., 1988).

Ambas as populações apresentaram sete pares de cromossomos metacêntricos. Entre estes cromossomos, os pares 1 e 2 são facilmente identificáveis: o primeiro par é bem maior que o restante do conjunto, esta uma

característica comum em várias espécies da família Characidae (Schell, 1972; Morelli et al., 1983; Portela et al., 1988; Carvalho et al., 2002), e o segundo par possui tamanho intermediário, porém, também maior que os outros cromossomos, como foi observado para os dois primeiros pares em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner) (Foresti et al., 1989). Os outros 5 pares se apresentaram quase do mesmo tamanho, metacêntricos menores.

A população de Guaraqueçaba apresentou um número maior de submetacêntricos (20) em relação aos subtlocêntricos (16), visto que na população de Antonina o número de pares submetacêntricos e subtlocêntricos são iguais (18 sm e 18 st), ambas divergindo de Carvalho et al. (2002), que observaram a presença de 10m+12sm+28st, onde, entre os metacêntricos, somente o primeiro par se apresentou com tamanho maior, com os outros cromossomos praticamente do mesmo tamanho, menores; e de Vieira et al. (1988), com fórmula cariotípica 12m+24sm+12st+2a.

Essas diferenças cariotípicas interpopulacionais relacionadas à morfologia cromossômica, principalmente em relação aos cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos, podem ter sido resultado de rearranjos não-robertsonianos, tais como inversões pericêntricas, e/ou deleções de algumas regiões cromossômicas. Estes eventos devem ter desempenhado papel fundamental na evolução cariotípica dentro desse gênero.

O padrão de heterocromatina constitutiva nas duas populações mostrou-se similar, com pequenas marcações intersticiais localizadas sempre na porção proximal dos braços longos da maioria dos cromossomos. Tal padrão também foi observado por Vieira et al. (1988), com a existência de blocos pericentroméricos, além dos intersticiais, e Carvalho et al. (2002), que descreveram a existência de

pequenos blocos em todos os cromossomos, somente na posição pericentromérica. Esse padrão de heterocromatina foi também encontrado em *M. sanctaefilomenae* (Foresti et al., 1989; Portela-Castro e Júlio Jr., 2002; Dantas et al., 2007), *M. intermedia* e *Moenkhausia* sp. (Dantas et al., 2007) (Tabela 1), sugerindo a proximidade entre os gêneros *Hollandichthys* e *Moenkhausia*, o que corrobora a sugestão de Javonillo et al. (2010). Assim como no presente estudo, em *M. intermedia* também se observou, além da marcação heterocromática intersticial, uma marcação centromérica no primeiro par de cromossomos (Dantas et al., 2007).

Informações sobre o número e distribuição de RONS nesta espécie limitam-se aos estudos de Carvalho et al. (2002), que descreveram a presença de um sistema de AgRONS simples, na posição intersticial do braço longo do quarto par cromossômico (m), e Vieira et al. (1988), que observaram as AgRONS localizadas num par de metacêntricos pequenos, bem próxima à região do centrômero, ambas diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho apenas na localização, que em ambas as populações foi no quinto par cromossômico. AgRONS também foram encontradas na posição intersticial dos braços longos dos cromossomos de um par metacêntrico em *M. intermedia* (Dantas et al., 2007).

Após a dupla coloração CMA₃/DAPI, observou-se que a região da RON foi CMA₃⁺ nas duas populações. A população de Antonina apresentou, ainda, duas marcações CMA₃⁺ que não coincidiram com as RONS, localizadas na posição telomérica, em um dos homólogos do par 12 (sm) e em um dos homólogos do par 22 (st). Santos (2010) também observou a presença de marcações teloméricas CMA₃⁺ não coincidentes com as RONS em *M. oligolepis*. Sugere-se que essas regiões teloméricas CMA₃⁺ tenham sua origem por translocação ou por transposição, seguindo o modelo da polarização de Rabl, pois, de acordo com Schweizer e Loidl

(1987), regiões teloméricas são propícias para a transferência de material genético, devido à proximidade existente entre elas dentro do núcleo interfásico, promovida pelo ordenamento dos cromossomos, conforme já foi observado em *Astyanax scabripinnis* (Jenyns), com a variabilidade de locos AgRONS (Souza et al., 2007) e eventos de transferência de DNAr 45S (Mantovani et al., 2005). Outra explicação plausível para a ocorrência destas marcações teloméricas peculiares seria a deleção dessa região em um dos respectivos homólogos.

Apesar do iodeto de propídio (IP) ser frequentemente relatado como corante base não-específico, Tiersch et al. (1989) e Vinogradov (1994), observaram sua preferência por bases G-C. Posteriormente, a coloração CPD (IP/DAPI combinados) passou a ser relatada para a identificação das RONS nos cromossomos de plantas (Peterson et al., 1999; Andras et al., 2000). Comparando as técnicas de coloração diferencial utilizando os fluorocromos CMA/DAPI com a CPD em *Allium cepa* (Lineu), Kim et al. (2002) observaram que o mecanismo do bandamento CPD também era determinado pela composição nucleotídica das regiões cromossômicas, pois todas as bandas CPD foram CMA⁺, logo, G-C ricas, ao passo que corando-se os cromossomos somente com o IP não se observou coloração diferencial, nem em regiões heterocromáticas, nem em satélites. No presente trabalho, todas as bandas CPD também foram CMA₃⁺, confirmando tanto a localização das RONS como das duas marcações teloméricas (Figura 5).

Todas as marcações banda C positivas se mostraram DAPI⁺ (Figuras 4b e 4d), sugerindo a presença de uma grande quantidade de bases A-T nestes sítios, à exceção da marcação centromérica nos cromossomos do par 1 (m), que não mostrou uma riqueza específica de bases. Em *Salminus brasiliensis* e *S. hilarii*,

também *Incertae sedis* em Characidae, Souza et al. (2008) observaram parte das bandas C positivas sendo DAPI⁺.

A FISH com sonda DNAr 18S confirmou, em ambas populações, a existência de somente um par de RONS, caráter considerado basal em peixes. Por outro lado, com a sonda 5S, observou-se a presença de dois pares de cromossomos portando sítios DNAr 5S na população de Antonina, e de três pares na população de Guaraqueçaba. Martins e Galetti Jr. (2001), consideram que a presença de dois *loci* intersticiais de DNAr 5S podem representar um caráter conservado entre os Characiformes. Entretanto, estudos posteriores, especialmente na família Characidae, mostraram uma grande variabilidade no número e localização destes sítios (Mantovani et al. 2005; Peres et al. 2008). Deste modo, a localização e/ou a posição dos sítios de DNAr 5S em Characidae tem se mostrado, cada vez mais, tão variável quanto os sítios de DNAr 18S (Peres et al., 2008). A coincidência do gene ribossomal 5S com a heterocromatina também foi observado em *S. hilarii* (Souza et al., 2008).

Essas diferenças no número e na localização dos sítios DNAr 5S entre as populações estudadas podem ser explicadas por eventos de dispersão, como a transposição, ou mesmo por translocação.

A existência de diferenciação cromossômica entre os exemplares coletados em Guaraqueçaba e Antonina, e destes com os de São Paulo (Vieira et al., 1988; Carvalho et al., 2002), concomitantemente com a ausência de formas híbridas, corroboram Bertaco (2003), que afirma que as diferentes morfoespécies de *Hollandichthys* são todas alopátricas, sugerindo, então, haver uma barreira geográfica efetiva separando essas populações.

A formação das cadeias de montanhas da Serra do Mar pode ter separado as bacias hidrográficas anteriormente conectadas e, por fim, essas populações (Bigarella et al., 2003).

Como *H. multifasciatus* é uma espécie intimamente associada à floresta Atlântica, da qual obtém proteção e alimento (Abilhoa et al., 2009; Bertaco, 2009), presume-se que a diferenciação entre suas populações também pode ter sido resultado do efeito gargalo de garrafa, provavelmente em consequência da glaciação de Würm-Wisconsin, ocorrida durante o Pleistoceno Terminal/Holoceno, época geológica provável da diferenciação desta espécie, segundo Thomaz (2010).

A última glaciação conhecida, denominada de Würm-Wisconsin, provocou o esfriamento e a aridificação do ambiente, que resultou na regressão do nível do mar, deixando expostas grandes faixas de terras antes ocupadas pela água do mar; na retração das florestas, que ficaram restritas a pequenos fragmentos nas raras áreas onde permaneceu a umidade; e no desaparecimento dos rios de menor porte, que perderam suas interconexões e mantiveram suas ictiofaunas isoladas, eventos que resultaram na enorme biodiversidade e endemismos da flora e fauna tropical e subtropical (Ab'Sáber, 1992; Vanzolini, 1992; Viadana, 2002).

Com o fim da glaciação, o ambiente voltou a ficar úmido e, assim, os rios e as florestas se recuperaram. Contudo, o descongelamento das geleiras causou a elevação do nível do mar que, no litoral paranaense, resultou na entrada das águas marinhas na planície litorânea, vindo a formar a Baía de Paranaguá, que acabou confinando as sub-bacias hidrográficas existentes (Ab'Saber, 2006; Bigarella, 1978; Bigarella et al., 1961). Desta forma, os rios ficaram restringidos pela baía e os peixes de água doce ficaram impossibilitados de se dispersarem através da água salobra.

O surgimento de barreiras geográficas pode originar novas espécies, pois interrompe o fluxo gênico previamente existente entre os indivíduos de uma população e, em resposta às pressões seletivas que ocorrem de maneira diferente em cada subpopulação originada, ocorrem evoluções diversas e acúmulo de diferenças genéticas ao longo das gerações. Em decorrência da fixação destas variações – neste caso, rearranjos cromossômicos –, ocorre diferenciação genética entre essas subpopulações, originando-se, desta maneira, populações completamente isoladas.

Evidências do surgimento de um complexo de espécies relacionado com o isolamento geográfico representado pela formação da cadeia de montanhas da Serra do Mar já foi observado nas drenagens costeiras do sul do Brasil em *Mimagoniates microlepis* (Steindachner) (Torres e Ribeiro, 2009), e parecem ser válidas também para *H. multifasciatus*.

Agradecimentos

Agradecimento especial a Vinícius Abilhoa (Curador da Coleção de peixes do Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba – PR), pela identificação dos espécimes. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida ao autor.

Referências

Ab'Sáber, A. N. (1992). A teoria dos refúgios: origem e significado. *Revista do Instituto florestal*, Edição especial, São Paulo.

Ab'Sáber, A. N. (2006). Brasil: paisagens de exceção. O litoral e o Pantanal Matogrossense. Patrimônios básicos, 182p. Cotia, SP: Ateliê Editorial.

Abilhoa, V.; Bornatowski, H.; Otto, G. (2009). Temporal and ontogenetic variation in feeding habits of *Hollandichthys multifasciatus* (Teleostei: Characidae) in coastal Atlantic rainforest stream, southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **7**(3): 415-420.

Andras, S. C. et al. (2000). Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. *Chromosome Research* **8**: 387-391.

Arefjev, V. A. (1990). Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. *Caryologia* **43** (3-4): 305-319.

Bertaco, V. A. Taxonomia e filogenia do gênero *Hollandichthys* Eigenmann, 1909 (Teleostei: Characidae) do Sul e Sudeste do Brasil. (2003). Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Bertaco, V. A. (2009). Freshwater fishes, Ilha de Santa Catarina, southern coastal drainage of the state of Santa Catarina, Brazil. *Check List (São Paulo. Online)* **5**: 898-902.

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

Bigarella, J. J.; Marques Filho, P. L.; Ab'Sáber, A. N. (1961). Ocorrência de sedimentos remanescentes nas fraldas da Serra do Iquererim (Garuva, SC). *Bol. Paran. Geogr.* **4/5**: 82-93.

Bigarella, J. J. (Coord). (1978). A Serra do Mar e a porção oriental do estado do Paraná: contribuição à geografia, geologia e ecologia regional, 248p. Curitiba: SEPL/ADEA.

Bigarella, J. J.; Passos, E.; Herrmann, M. L. P.; Santos, G. F.; Mendonça, M.; Salamuni, E.; Suguio, K. (2003). Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais. vol. 3, 552p. Florianópolis: Editora da UFSC.

Carvalho, M. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2002). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia* **55**: 181-188.

Centofante, L.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. (2006). Chromosomal differentiation between populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from small tributaries at opposite margins of the Paraíba do Sul river (Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49** (6): 981-987.

Dantas, E. S. O.; Vicari, M. R.; Souza, I. L.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C.; Artoni, R. F. (2007). Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). *The Nucleus* **50** (3): 505-518.

Foresti, F.; Almeida-Toledo, L. F.; Toledo, S. A. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* **79**: 107-114.

Fracaro, F. A.; Miyazawa, C. S. (2002). Dados citogenéticos preliminares em Aphyocharacidae (Pisces, Characiformes) da bacia do Pantanal Matogrossense. In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. 9. 2002, Maringá. Anais... Maringá, 2002. p. 39.

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

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

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

Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. (2005). Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* **124**: 85–91.

Kim, E. S.; Punina, E. O.; Rodionov, A. V. (2002). Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russian Journal of Genetics* **38**(4): 392-398.

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

Lima, F. C. T. et al. (2003). Genera *Incertae sedis* in Characidae. In *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris JR., C. J., Orgs.), pp. 106-169. Porto Alegre: EDIPUCRS.

Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* **123**: 211-216.

Martins, C.; Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Characiformes). *Chromosome Research* **7**: 363-367.

Martins, C.; Galetti Jr., P. M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* **111**: 439–446.

Mirande, J. M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* **25**: 574-613.

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

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Britski, H. A.; Toledo-Filho, S. A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazil. J. Genet.*: **11** (3): 577-624.

Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31** (1, suppl): 222-226.

Peterson, D. G.; Lapitan, N. L. V.; Stack, S. M. (1999). Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics* **152**: 427-439.

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of national Academy of Sciences* **83**: 2934-2938.

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

Portela-Castro, A. L. B.; Júlio Jr., H. F. (2002). Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. *Cytologia* **67**: 329-336.

Rubert, M.; Margarido, V. P. (2007). Cytogenetic studies in three species of the genus *Oligosarcus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50** (1): 127-135.

Santi-Rampazzo, A. P. Análise citogenética em espécies das subfamílias Cheirodontinae e Aphyocharacinae (Teleostei, Characidae). (2006). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Santos, L. P. Análise citogenética de peixes dos gêneros: *Astyanax*, *Moenkhausia* e *Bryconops* provenientes das regiões de Uberlândia - MG e Monte do Carmo - TO. (2010). Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Schell, J. J. (1972). The chromosomes of the third neon tetra. *Tropical Fish Hobbyist* **20** (11): 60-65.

Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.

Schweizer, D.; Loidl, J. (1987). A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. *Chromosome Today* **9**: 61-74.

Souza, I. L., Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. (1995). Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae): C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. *Cytobios* **83**: 33-39.

Souza, I. L.; Venere, P. C.; Moreira-Filho, O. (2007). Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). *Cytologia* **72**: 63-69.

Souza, I. L.; Santos-Silva, L. K.; Venere, P. C.; Moreira-Filho, O. (2008). Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* **39**: 1036-1041.

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

Thomaz, A. T. Filogenia e filogeografia do gênero *Hollandichthys* Eigenmann 1909 (Teleostei: Characidae). (2010). Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Tiersch, T. R.; Chandler, R. W.; Wachtel, S. S.; Elias, S. (1989). Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* **10**: 706-710.

Torres, R. A.; Ribeiro, J. (2009). The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia* **617**:157-170.

Vanzolini, P. E. (1992). Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical. *Estudos Avançados* **6**(15): 41-65.

Viadana, A. G. (2002). A teoria dos refúgios florestais aplicada ao estado de São Paulo, 71p. Rio Claro: Edição do autor.

Vieira, K. B. L.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F. (1988). Estudos citogenéticos em Tetragonopterinae: o cariótipo, heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo de *Hollandichthys multifasciatus*. In: Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. 2. 1988, Maringá. Anais... Maringá, 1988. p. 1.

Vinogradov, A. E. (1994). Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry* **16**: 34-40.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Sumário dos dados citogenéticos de *Hollandichthys multifasciatus* e das espécies filogeneticamente relacionadas com esse táxon.

Espécies	Locais de coleta	2n	Cariótipo	NF	RONs	18S	5S	BC	CMA ₃ ⁺	CS	Ref.
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	Riacho do Veiga, PR	50	14m+18sm+18st	100	2	2	4	C e I	T e I	Não	1
<i>H. multifasciatus</i>	Rio Bananal, PR	50	14m+20sm+16st	100	2	2	6	C e I	I	Não	1
<i>H. multifasciatus</i>	Itanhaém, SP	50	12m+24sm+12st+2a	98	2	-	-	P e I	-	Não	2
<i>H. multifasciatus</i>	Rio Grande, SP	50	10m+12sm+28st	100	2	-	-	P	-	Não	3
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	Rio Paraná, PR	50	4m+4sm+42a	-	2	-	-	P e T	-	Não	4
<i>A. dentatus</i>	Rio Cuiabá, MT	50		-	M	-	-	-	T	-	5
<i>A. difficilis</i>	Rio Mogi-Guaçu, SP	50	2m+2sm+2st+44a	56	-	-	-	P	-	Não	6
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	Rio Juruá, SP	50	14m+20sm+16st	100	2	-	-	P	-	Não	3
<i>Moenkhausia</i> sp.	Barra do Garças, MT	50	16m+34sm	100	2	2	-	P e I	-	Não	7
<i>M. costae</i>	Rio São Francisco, MG	50	50m/sm	100	2	-	-	-	-	-	8
<i>M. intermédia</i>	Rio Mogi Guaçu, SP	50	16m+34sm	100	2	2	-	C, P e I	-	Não	7
<i>M. oligolepis</i> *	Córrego Taboquinha, TO	50	10m+32sm+8st	100	M	-	-	C	T	Não	9
<i>M. sanctaefilomenae</i> *	Rio Paraná, PR	50	12m+36sm+2st	100	2	-	-	C e I	-	Não	10
<i>M. sanctaefilomenae</i> *	Afluente do rio Capivara, SP	50	12m+36sm+2st	100	M	12*	-	C e I	-	Não	7
<i>M. sanctaefilomenae</i> *	Rio Capivara, SP	50	48m/sm+2st/a	-	M	-	-	C e I	-	Não	11
<i>Nematobrycon palmeri</i>	-	50	8m/sm+10st+32a	-	-	-	-	-	-	-	12
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Ribeirão Grande, SP	50	6m+12sm+14st+18a	-	M	4	-	P, T e I	-	Não	13
<i>O. hepsetus</i>	Rio Santo Antônio, SP	50	4m+12sm+16st+18a	-	M	6	-	P, T e I	-	-	13
<i>O. hepsetus</i>	Rio Paraitinga/Jacuí, SP	50	6m+10sm+16st+18a	82	2	4	4	P, T	-	-	14
<i>O. longirostris</i>	Rio Iguazu, PR	50	4m+10sm+16st+20a	-	2	-	-	T	-	Não	15
<i>O. paranensis</i> ,	Rio Tunas, PR	50	4m+10sm+16st+20a	-	M	-	-	T	-	Não	15
<i>O. pintoi</i>	Rio Tunas, PR	50	4m+10sm+16st+20 ^a	-	M	-	-	T	-	Não	15

Tabela 1 – Continuação.

2n = número diplóide; NF = número fundamental; RONS = número de cromossomos portando região organizadora de nucléolo; 18S = sítios DNAr 18S; 5S = sítios DNAr 5S; BC = bandas C; CMA₃⁺ = sítios GC⁺; CS = cromossomos sexuais; Ref. = referências; * = presença de cromossomos supranumerários; M = sistema de RON múltiplo; C = centromérica; I = intersticial; P = pericentromérica; T = terminal.

Referências: 1. Presente trabalho; 2. Vieira et al. 1988; 3. Carvalho et al. 2002; 4. Santi-Rampazzo, 2006; 5. Fracaro e Miyazawa, 2002; 6. Souza et al. 1995; 7. Dantas et al. 2007; 8. Portela et al., 1988; 9. Santos, 2010; 10. Portela-Castro e Júlio Jr., 2002; 11. Foresti et al., 1989; 12. Arefjev, 1990; 13. Centofante et al., 2006; 14. Kavalco et al. 2005; 15. Rubert e Margarido, 2007.

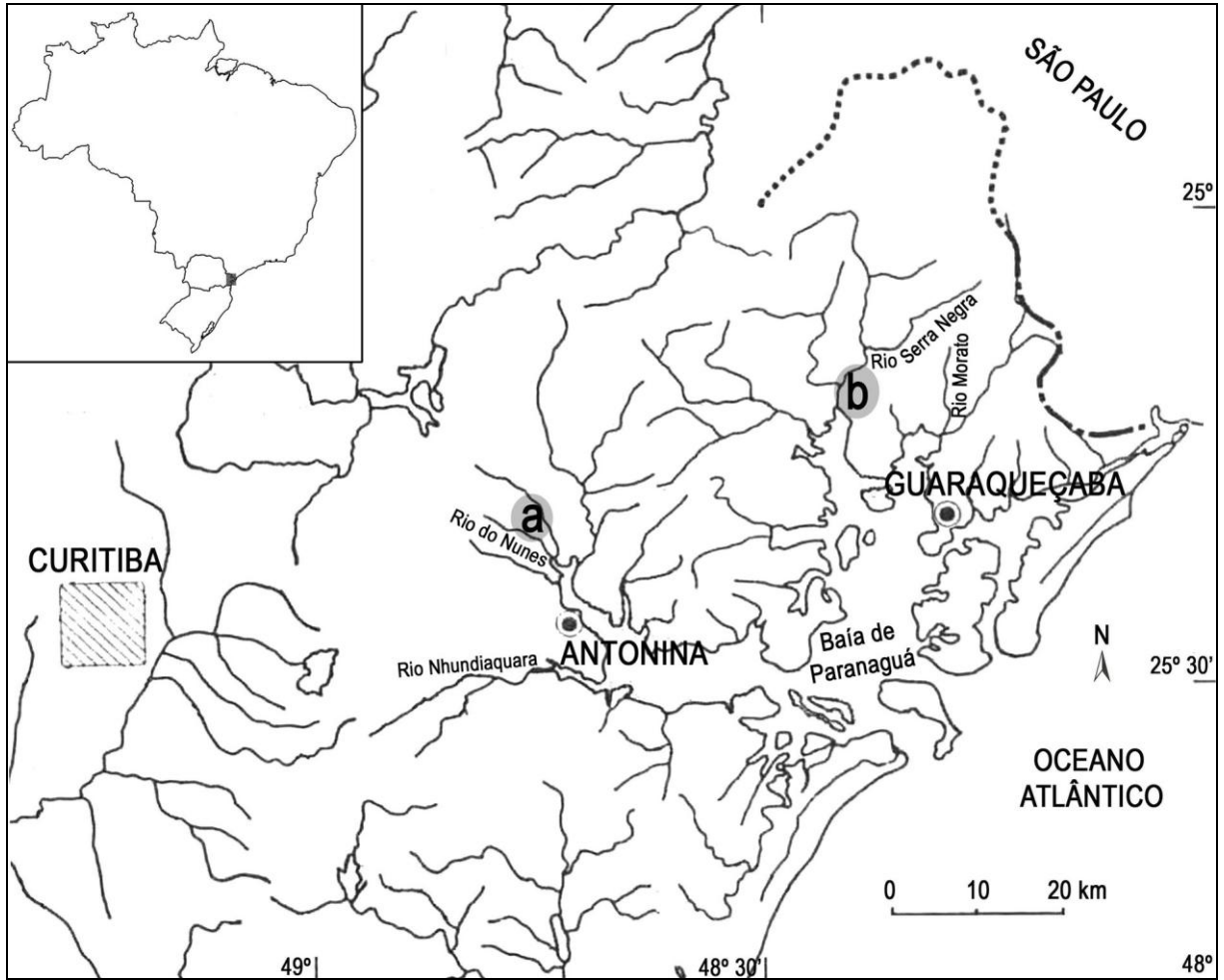


Figura 1 – Locais de coleta de *H. multifasciatus*: a. Riacho do Veiga, Antonina, PR; b. Rio Bananal, Guaraqueçaba, PR.

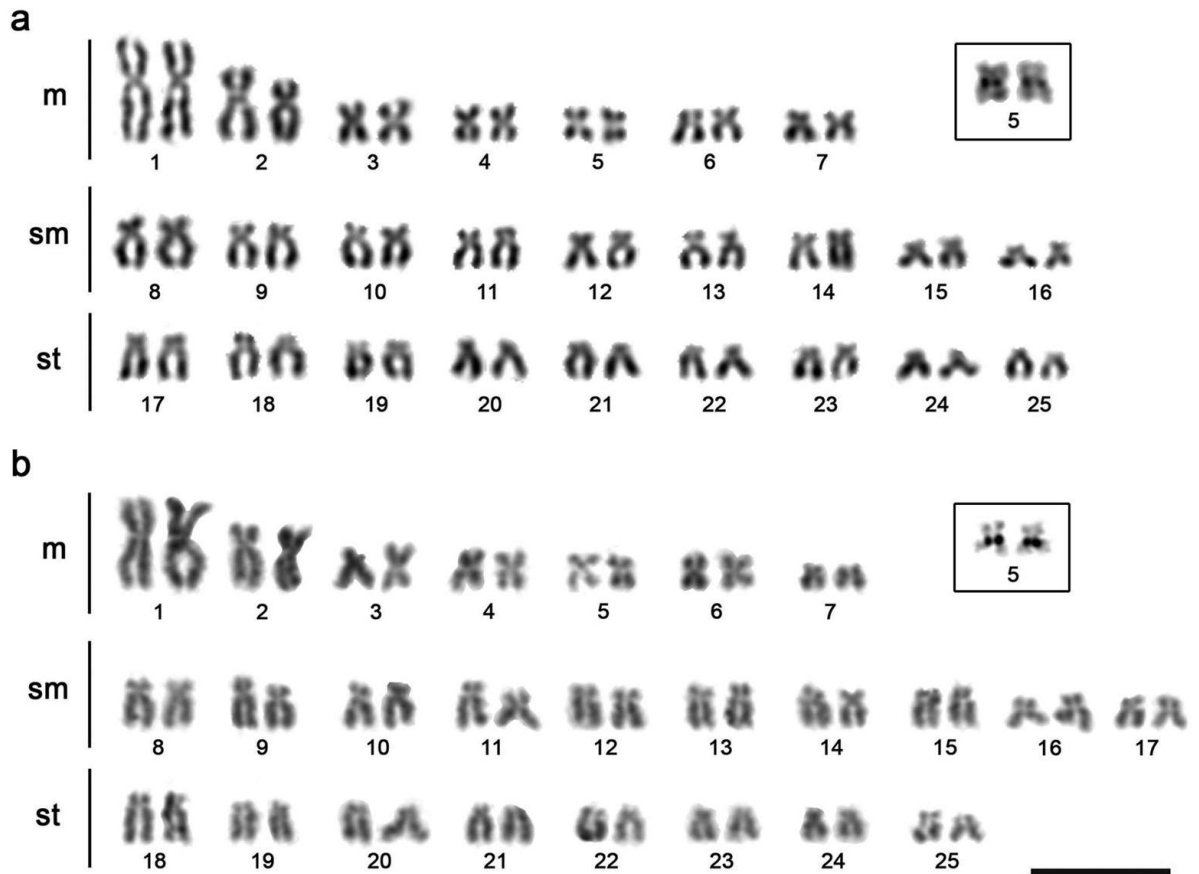


Figura 2 – Cariótipos em coloração convencional Giemsa de *H. multifasciatus* de Antonina (a) e *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (b). Em destaque, os cromossomos portadores de AgRNs. A barra representa 10μm.



Figura 3 – Cariótipos de *H. multifasciatus* de Antonina (a) e de *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (b) evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Barra=10 μ m.

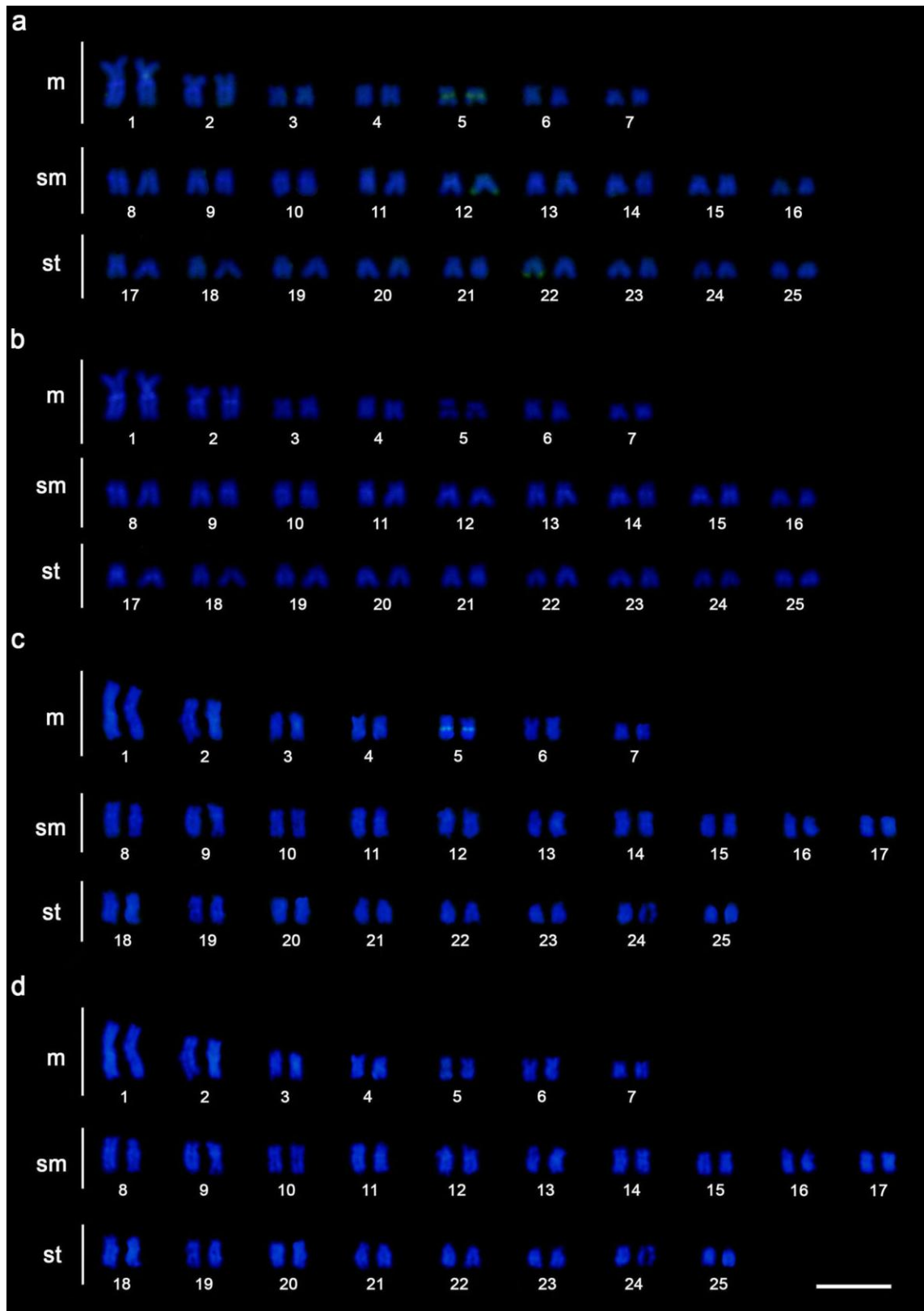


Figura 4 – Cariótipos de *H. multifasciatus* de Antonina (a-b) e *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (c-d) após dupla coloração CMA₃/DAPI, mostrando sítios quanto a riqueza de base GC e AT. A barra representa 10µm.

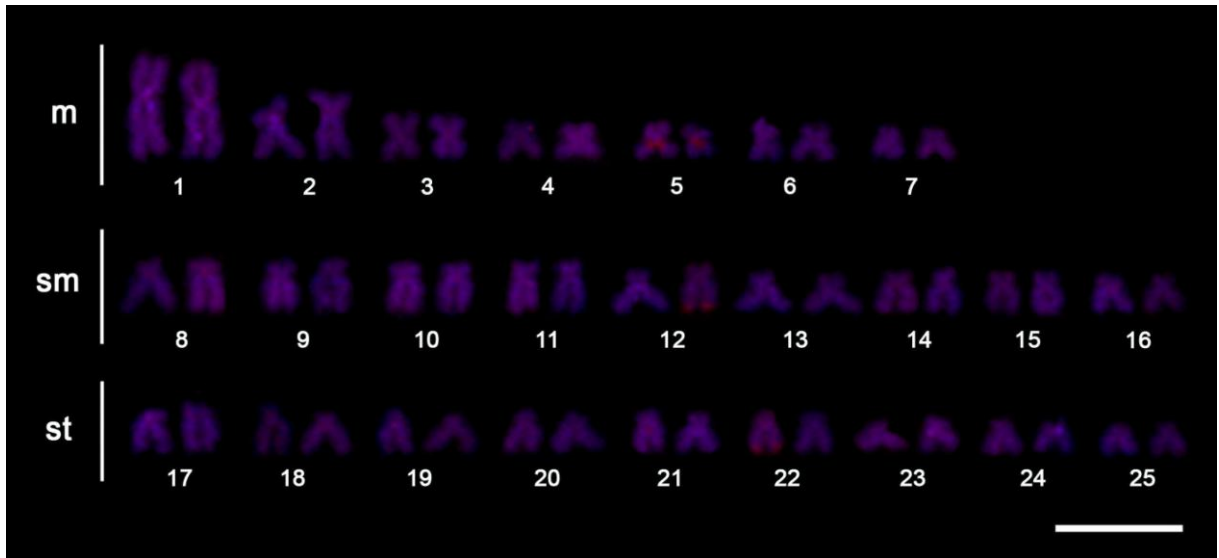


Figura 5 – Cariótipo de *H. multifasciatus* de Antonina após coloração CPD, indicando sua correspondência com sítios CMA₃⁺. A barra representa 10µm.

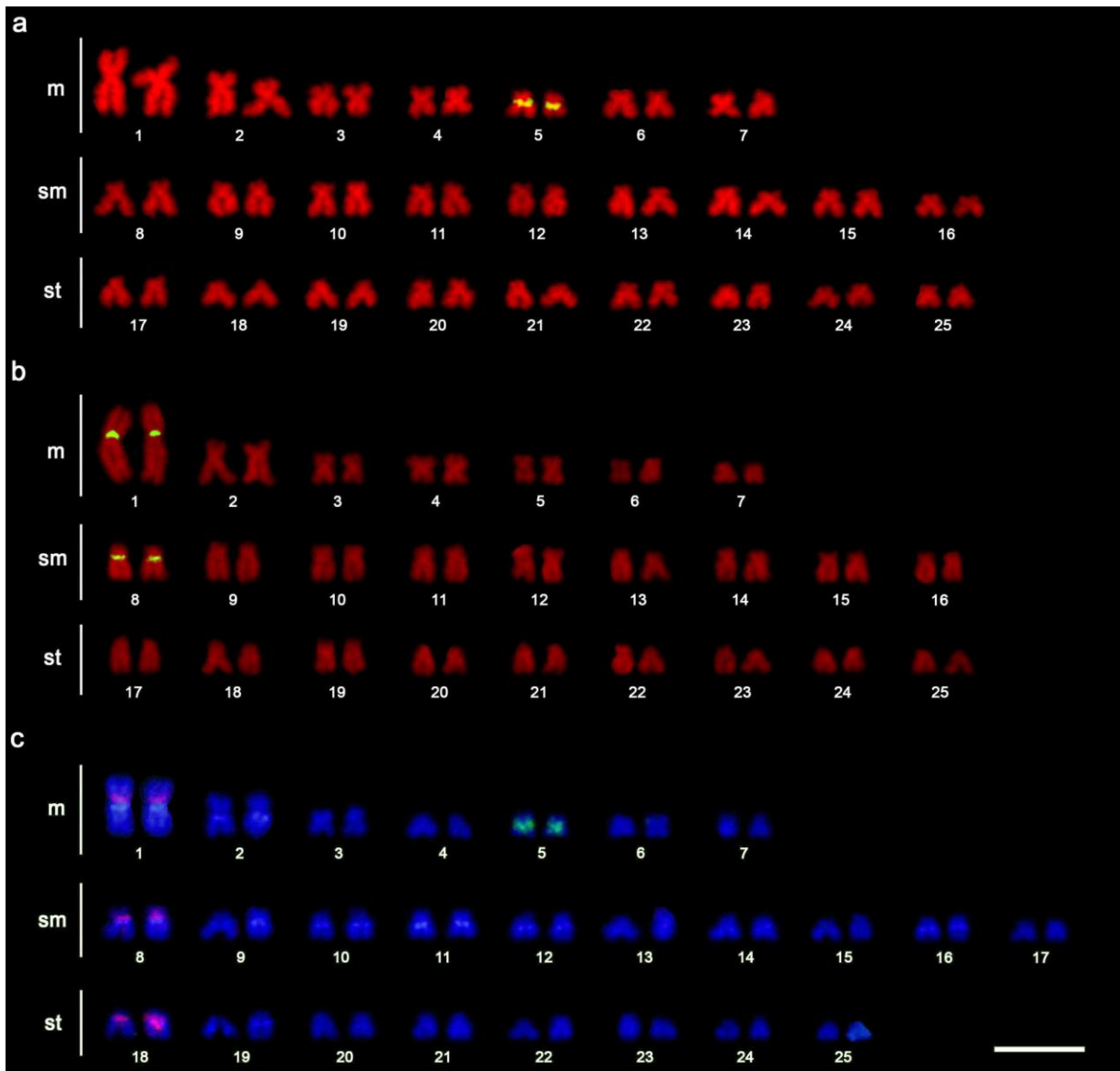


Figura 6 – Cariótipos de *H. multifasciatus* submetidos a FISH para localização dos sítios de DNAr: em (a) população de Antonina, após FISH com sondas de DNAr 18S; (b) população de Antonina, após FISH com sonda de DNAr 5S; em (c) população de Guaraqueçaba submetido a dupla FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e DNAr 5S (vermelho). Barra=10 μ m.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As duas populações analisadas neste trabalho apresentaram o mesmo número diplóide e número fundamental, divergindo, entretanto, quanto ao número de cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos.

Ambas as populações apresentaram sistema de RON simples, na posição intersticial dos cromossomos do par 5 (m), próxima ao centrômero. As NORs se apresentaram como regiões GC ricas, evidenciadas pelo fluorocromo CMA₃, sem heterocromatina coincidente.

A heterocromatina constitutiva mostrou-se distribuída nas regiões intersticiais proximais dos braços longos da maioria dos cromossomos, com apenas um par portando marcação centromérica, na população de Antonina.

O fluorocromo DAPI evidenciou marcações fluorescentes em todas as bandas heterocromáticas.

O fluorocromo CMA₃ também evidenciou a presença de bandas teloméricas positivas em dois cromossomos não-homólogos da população de Antonina.

A técnica CPD corroborou os resultados da dupla coloração CMA₃/DAPI.

Outra diferença observada foi em relação ao número de sítios de DNAr 5S: 4 sítios na população de Antonina e 6 sítios na de Guaraqueçaba.

As diferenças observadas na estrutura cromossômica devem, provavelmente, ter sido resultado de rearranjos cromossômicos do tipo não-robertsonianos, principalmente as inversões pericentroméricas e/ou deleções, além de eventos de transposição.

A combinação de eventos geomorfológicos e climáticos, como a formação da Serra do Mar, glaciações e a formação da baía de Paranaguá, devem ter exercido papel fundamental na história evolutiva de *Hollandichthys*.

As populações de *H. multifasciatus* analisadas neste trabalho apresentaram cariótipo diferente das populações anteriormente estudadas.

Com base nos resultados citogenéticos obtidos, reforça-se a idéia de que *H. multifasciatus* pode ser tratado como um complexo de espécies, corroborando os trabalhos de Bertaco (2003) e Thomaz (2010).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **Contribuição a citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi)**. 1978. 128 f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. As regiões organizadoras de nucléolo em peixes. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 35., 1983, Belém. **Ciência e Cultura**. São Paulo: Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência, 1983, v. 37, p. 448-453.
- ANDRAS, S. C. et al. Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. **Chromosome Research**, 8: 387-391, 2000.
- 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.
- BERTACO, V. A. **Taxonomia e filogenia do gênero *Hollandichthys* Eigenmann, 1909 (Teleostei: Characidae) do Sul e Sudeste do Brasil**. 2003. 160 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 1: 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR. P. M. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish. Biol.**, 28: 153-159, 1986.
- BIGARELLA, J. J. **A serra do mar e a porção oriental do Estado do Paraná**. Curitiba: Governo do Paraná – Secretaria de Estado do Planejamento/ADEA, 1978. 250 p.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca, 1972. p. 79-108.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. Brasília: Câmara dos Deputados - CODEVASF, 1984. 143 p.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do pantanal**: manual de identificação. 2 ed. rev. ampl. Brasília: Embrapa, 2007. 227 p.

BRUM, M. J. I.; GALETTI JR., P. M. Teleostei ground plan karyotype. **J. Comp. Biol.**, 2 (2): 91-102, 1997.

BRUM, M. J. I.; MOTA, L. C. G. C-banding and nucleolar organizer regions of *Sphoeroides greeleyi* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). **Caryologia**, 55(2): 171-174, 2002.

BUCKUP, P. A. Relationships of the characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds.) **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 123-144.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds.) **Ecologia de peixes de riacho**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. 6, Rio de Janeiro, 1999. p. 91-138.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. (Eds.) **Catálogo dos Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil**. 2003. 2.ed. Disponível em: <<http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/>>. Acesso em: 17 jul. 2010.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 135-153, 2005.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia**, 55: 181-188, 2002.

CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P. M. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Brazil. J. Genet.**, 15: 555-567, 1992.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biologia/Genética) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

EGOSCUE, J. Estudios cromossômicos. Preparaciones directas. In: **Técnicas em Citogenética**. Barcelona (Espanha): Editorial Espaxs, 1971. p. 15-37.

FALCÃO, J. N.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **J. Fish Biol.**, 27: 603-610, 1985.

GALETTI JR. P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of Neotropical characiform fishes. **Caryologia**, 47: 289-298, 1994.

GÉRY, J. 1978. Characoids of the world. In: NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc., 2006. 601 p.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM, 2007. 241 p.

GREENWOOD, P. H.; ROSEN, D. E.; WEITZMAN, S. H.; MYERS, G. S. 1966. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. In: NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc., 2006. 601 p.

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

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

IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Hidrografia do Estado do Paraná**. 1995. Disponível em: <<http://www.ipardes.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=134>>. Acesso em: 10 jul. 2009.

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

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R. Aspectos biogeográficos de componentes da ictiofauna da América Central. **ConScientiae Saúde**, 6(1): 147-153, 2007.

LANGANI, F. **Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): taxonomia**. 1989. 231 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetic Genome Research**, 26: 36-40, 1980.

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

LIMA, F. C. T. et al. Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Orgs.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

LUCENA, C. A. S.; LUCENA, Z. M. S. 2002. **Redefinição do gênero *Deuterodon* Eigenmann, 1907 (Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre, 15(1): 113-135, 2002.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Paraná, 1968. 350 p.

MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H. **Description of a new genus with six new species from Southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Série Zoologia, Porto Alegre*, 16 (1): 65-151, 2003.

MARCO, D. A. **Estudos cromossômicos em peixes da subfamília Salmininae (Pisces, Characidae)**. 1986. 100 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7: 363-367, 1999.

MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S. Revision of the subfamily Roestinae (Ostariophysi: Characiformes: Cynodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, Alemanha, 9 (3): 279-291, 1998.

MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, 25: 574-613, 2009.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). **Caryologia**, 38 (1): 47-55, 1985.

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

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes: an introduction to ichthyology**. Prentice-Hall Inc., 1982. 593p.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Inc., 2006. 601 p.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazil. J. Genet.**, 11 (3): 577-624, 1988.

ORTÍ, G et al. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 31 (1 suppl): 343-351, 2008.

PESCATORI, G. L. R. **Estudos citogenéticos em populações de *Bryconamericus stramineus*, Eigenmann, 1908, (Teleostei, Characidae) em rios das bacias do Tietê e Paranapanema**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of national Academy of Sciences**, 83: 2934-2938, 1986.

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

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 132-135.

SCHELL, J. J. The chromosomes of the third neon tetra. **Tropical Fish Hobbyist**, 20 (11): 60-65, 1972.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, 58: 307-324, 1976.

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

THOMAZ, A. T. **Filogenia e filogeografia do gênero *Hollandichthys* Eigenmann 1909 (Teleostei: Characidae)**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VIEIRA, K. B. L.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Estudos citogenéticos em Tetragonopterinae: o cariótipo, heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo de *Hollandichthys multifasciatus*. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS. 2. 1988, Maringá. **Anais...** Maringá, 1988. p. 1.

ZANATA, A. M.; VARI, R. P. The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 145: 1-144, 2005.

APÊNDICE – MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. ESPÉCIES ESTUDADAS E LOCAIS DE COLETAS

Foram estudados 13 exemplares de *H. multifasciatus* (Figura 1Aa), coletados no riacho do Veiga (25°20'25.48"S 48°46'53.77"W, Figura 2Aa), localizado no município de Antonina - PR, e 4 exemplares de *H. multifasciatus* (Figura 1Ab), coletados em um pequeno tributário do rio Bananal (25°11'38.00"S 48°23'23.90"W, Figura 2Ab), no município de Guaraqueçaba - PR, ambos pertencentes à Bacia Litorânea paranaense. Os peixes foram coletados através de pesca com anzol e mantidos em recipiente com água devidamente aerado, a fim de serem transportados ao Laboratório de Citogenética Animal, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os exemplares foram eutanasiados e protocolados com número, sexo e procedência. O sexo foi determinado através da detecção de caracteres sexuais secundários externos e análise microscópica de suas gônadas

Os animais foram fixados em formaldeído 10% durante 48 horas e posteriormente transferidos para etanol 70%, sendo, então, tombados como testemunhos, no acervo do Museu de História Natural Capão da Imbuia, em Curitiba - PR.

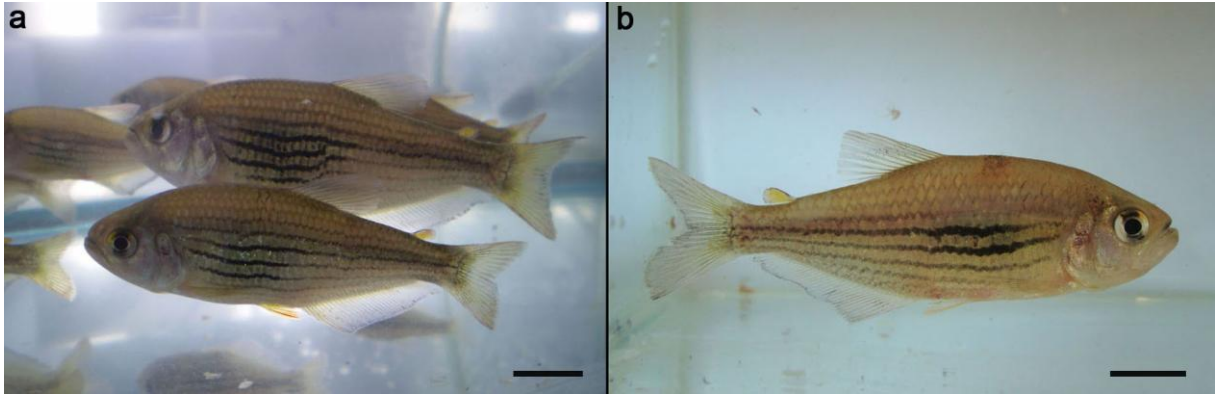


Figura 1A – *Hollandichthys multifasciatus* coletados em Antonina, PR (a), e *H. multifasciatus* coletado em Guaraqueçaba, PR (b). Barras = 1 cm.



Figura 2A – Locais de coleta: Riacho do Veiga (a), Tributário do rio Bananal (b).

2. MÉTODOS

2.1. Obtenção de metáfases mitóticas pelo método direto

Para obtenção de um maior número de células em divisão mitótica foi utilizada a técnica de LEE e ELDER (1980), que consiste em injetar 48 horas antes da colchicina, na musculatura próxima à nadadeira dorsal, uma solução de fermento biológico (0,5 g de fermento biológico diluídos em 5 mL de água destilada). A técnica de preparação direta para a obtenção dos cromossomos mitóticos foi descrita por EGOSCUE (1971) e modificada por BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO (1978), com algumas alterações:

- a) injetar intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,025%) correspondendo a 1ml/100g do peso do animal;
- b) colocar o peixe em aquário bem aerado por aproximadamente 50 minutos;
- c) em seguida, após anestesiá-lo com benzocaína (100mg/L), realizar a eutanásia e retirar a porção cefálica do rim;
- d) lavar o material retirado em solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) (0,075M), à temperatura ambiente, transferindo-o para placa de Petri contendo aproximadamente 10 mL desta solução;
- e) dissociar o material com pinça de dissecação. Deve-se aspirar e expirar suavemente com o auxílio de uma seringa desprovida de agulha, o que facilita a separação dos blocos celulares, até que se obtenha uma solução homogênea;
- f) usando uma pipeta Pasteur, transferir a solução para um tubo de ensaio. Colocar a solução em uma estufa à 37°C por 40 minutos;
- g) após a hipotonização, observar se existem pedaços não desfeitos no fundo do tubo de ensaio. Caso haja, estes devem ser descartados;

- h) pingar algumas gotas de fixador (metanol 3: ácido acético 1) recém preparado e gelado. Ressuspender e centrifugar o material por 10 minutos, a 800-900 rpm;
- i) descartar o sobrenadante com a pipeta Pasteur e adicionar ao material restante no fundo do tubo (células) 10 mL do fixador preparado. Com uma pipeta Pasteur, ressuspender o material novamente;
- j) centrifugar a suspensão por 10 minutos, a 800-900 rpm e, em seguida, descartar o sobrenadante;
- k) repetir por duas vezes os itens i e j;
- l) após a última centrifugação, descartar o sobrenadante e adicionar 2 mL do fixador, ressuspendendo novamente e transferindo o material para frascos do tipo “ependorf”, a fim de ser armazenado no freezer, a -20°C;

2.2. Coloração convencional e análise do material

A coloração convencional permite a análise do número, morfologia e fórmula cromossômica, e consiste em:

- a) aquecer a lâmina sobre o vapor do banho-maria (60°C);
- b) pingar de 2 a 3 gotas da preparação cromossômica;
- c) corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 10 minutos;
- d) analisar em microscópio.

As metáfases foram localizadas em microscópio binocular, primeiramente sob aumento de 20X, e analisadas com objetiva de imersão (100X). Escolheu-se as metáfases com cromossomos bem diferenciados, distendidos e em condições de serem contados. Analisou-se de 20 a 30 metáfases por animal para se obter uma tabela de freqüências do número de cromossomos por metáfase. A partir destes dados foi obtido o número diplóide modal para a espécie analisada.

2.3. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONS)

Para a detecção das RONS, através da impregnação por nitrato de prata (AgNO_3), utilizou-se a técnica de HOWELL e BLACK (1980), com algumas adaptações:

- a) utilizar lâminas pingadas conforme a técnica anterior. Em alguns casos envelhecer a lâmina por até dois dias em uma estufa à aproximadamente 45°C ;
- b) utilizar uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% e uma solução aquosa de gelatina a 2%, esta última acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira;
- c) pingar sobre a lâmina uma gota da solução de gelatina e uma de água e, sobre estas, duas gotas da solução aquosa de nitrato de prata;
- d) misturar as gotas e cobrir a lâmina com uma lamínula grande;
- e) levar a lâmina assim preparada para estufa de 60°C , entre 5 e 10 minutos, sendo o tempo ideal aquele na qual as RONS apresentem coloração preta ou marrom escura e os cromossomos uma tonalidade amarelada;
- f) remover a lamínula com um jato de água destilada e, se necessário, colocar a lâmina em uma solução de Giemsa diluída (2%) por 30 segundos, apenas para retirar o brilho da coloração pela prata;
- g) secar a lâmina ao ar.

2.4. Detecção das regiões de heterocromatina constitutiva (Bandamento C)

Para a detecção de heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas alterações:

- a) pingar sobre uma lâmina a solução de suspensão celular anteriormente fixada (duas gotas), em banho-maria a 60°C ;

- b) colocar a lâmina em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N, a temperatura de 42°C durante 15 minutos;
- c) lavar a lâmina em água destilada, deixar secar ao ar;
- d) colocar em um tubete contendo uma solução aquosa de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada, a uma temperatura de 25°C por até vinte e cinco segundos;
- e) lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl 1N a temperatura de 25°C, para interromper a ação da solução de hidróxido de bário e retirar o excesso deste;
- f) em seguida, lavar com jatos de água destilada e deixar secar ao ar;
- g) incubar a lâmina numa solução salina de 2xSSC, por 25 minutos a 60°C;
- h) lavar novamente após este período e deixar secar ao ar;
- i) corar com solução Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos;
- j) lavar em água deionizada e secar ao ar.

2.5. Dupla coloração CMA₃/DAPI

Empregou-se a técnica de SCHWEIZER (1976):

- a) colocar cerca de 80 µl de solução de cromomicina A₃ (CMA₃) sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora;
- b) escorrer a lamínula e lavar com água corrente e secar levemente;
- c) colocar cerca de 80 µl de solução DAPI/*Antifading* e retirar o excesso em papel filtro;
- d) pode ser analisada após 15 minutos.

2.6. Coloração Iodeto de Propídeo/DAPI combinados (CPD)

Empregou-se o método de ANDRAS et al. (2000), com algumas modificações:

- a) diluir as soluções estoque DAPI (1 mg/mL) e iodeto de propídeo (IP) (1 mg/mL) com água destilada para 10% e 2% (v/v), respectivamente;
- b) adicionar 6 μ L de cada uma das soluções estoque diluídas em 200 μ L de Vectashield (Vector Laboratories, California, USA), para dar uma concentração final de aproximadamente 3 μ g/mL de DAPI e 0.6 μ g/mL de PI;
- c) colocar cerca de 30 μ L dessa mistura sobre as preparações cromossômicas e cobrir com uma lamínula.

2.7. Localização cromossômica de genes ribossomais 18S e 5S por hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

Empregou-se o método de PINKEL; STRAUME; GRAY (1986), com certas modificações. Resumidamente, os passos envolveram tratamento dos cromossomos com RNase, digestão por protease, pré-hibridação, hibridação propriamente dita e detecção por fluorescência.

A sonda de DNA ribossômico do fragmento 18S (cerca de 1800pb) foi obtida a partir da amplificação por polimerização em cadeia (PCR) dessa seqüência do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (Prochilodontidae) com os *primers* NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTACCTACGG-3' (HATANAKA e GALETTI JR., 2004).

A sonda de DNAr 5S (cerca de 120 pb) foi um plasmídeo recombinante contendo o gene RNAr 5S, obtido a partir de *Leporinus elongatus* (Anostomidae) (MARTINS e GALETTI JR., 1999).

As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por reações de *nick translation* (BioNick™ Labeling System, Invitrogen) e com digoxigenina 11-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para a detecção do sinal foram utilizados os conjugados streptavidina-FITC e anti-digoxigenina rodamina.

As etapas foram as seguintes:

- a) Lavar as lâminas com as preparações cromossômicas em tampão PBS 1X (NaCl 0,137 M, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,46 mM) por 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação;
- b) Desidratar em série de etanol gelado (70, 85 e 100%) por 5 minutos;
- c) Incubar as lâminas com 90 µL de RNase 10 mg/mL (0,4% RNase/2xSSC), sob lamínula a 37 °C por uma hora em câmara umedecida com água;
- d) Lavar as lâminas três vezes por 5 minutos cada com 2xSSC sob agitação, removendo as lamínulas após a primeira lavagem;
- e) Lavar as lâminas uma vez em PBS 1X durante 5 minutos;
- f) Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X com MgCl₂ 50 mM por 10 minutos à temperatura ambiente;
- g) Lavar em PBS 1X por 5 minutos;
- h) Desidratar as lâminas em série de etanol gelado (70, 85 e 100%) por 5 minutos cada;
- i) Preparar solução de formamida 70% em 2xSSC na qual as lâminas serão imersas. O DNA cromossômico será desnaturado nas lâminas a 70 °C por 5 minutos;
- j) Passar as lâminas em etanol gelado 70% a -20 °C por 5 minutos;
- k) Desidratar em etanol (85 e 100%) cada por 5 minutos;
- l) Montar cada lâmina com 50 µL de solução de hibridização e cobrir com lamínula. Esta solução é constituída por 50% formamida, sulfato de dextrano com concentração final de 10%, 2xSSC e a sonda (18S ou 5S) já marcada por reação de *nick translation*). A solução deve antes ser colocada a 95 °C para desnaturar o DNA do fragmento;
- m) Incubar as lâminas em câmara úmida a 37 °C por 12 horas (*overnight*);
- n) Passado o tempo de hibridização, lavar duas vezes as lâminas em formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 10 minutos, sob agitação a 42 °C. Remover as lamínulas após a primeira lavagem;

- o) Lavar as lâminas três vezes por 5 minutos cada, com 0,1XSSC em banho-maria a 60 °C;
- p) Lavar as lâminas por 5 minutos em solução de Tween 20 (0,05% / 4xSSC);
- q) Incubar as lâminas em tampão NFDM (*non fat dry milk*) 5% em 4XSSC por 15 minutos;
- r) Lavar 2 x 5 minutos com Tween 0,5% / 4xSSC, ambiente (shaker);
- s) Incubar as lâminas com Streptavidina-FITC diluída (1 µL Streptavidina / 500 µL NFDM), colocando 80 µL por lâmina e deixando agir por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente protegida da luz;
- t) Lavar 3X com Tween 0,5% / 4XSSC, à temperatura ambiente sob agitação;
- u) Desidratar as lâminas em série de etanol gelado (70, 85 e 100%) durante 5 minutos cada;
- v) Montar as lâminas com 25 µL para cada solução de iodeto de propídeo (proporção de 25 µL de antifading com 1 µL de iodeto de propídeo concentrado em 20 µg/mL);
- w) Analisar em fotomicroscópio de epifluorescência.

Para a detecção de duas sondas (Dupla-FISH), continuou-se do passo r:

- s') Montar um mix contendo 792 µL NFDM + 1,6 µL de streptavidina FITC conjugada + 4 µL de anti digoxigenina rodamina conjugada (respeitando as concentrações dos fabricantes);
- t') Incubar as lâminas com 100 µL cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- u') Lavar 3 x 5 min com Tween 0,5% / 4xSSC, ambiente (Shaker);
- v') Desidratar em etanol 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar);
- w') Montar as lâminas com uma mistura de 400 µL de antifading mais 1 µL de DAPI (0,2 mg/mL);
- x') Colocar 50 µL da mistura e cobrir com lamínula e guardar no escuro;

y') Analisar em fotomicroscópio de epifluorescência.

2.8. Montagem e análise dos cariótipos

As metáfases com boa dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram adquiridas com objetiva 100X de imersão, através do sistema Applied Spectral Imaging de captura digital de imagens acoplado ao microscópio Carl Zeiss Axiophot. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 4.0.

Foram montados 5 cariótipos de machos e 5 de fêmeas em cada uma das espécies estudadas. Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB) proposta por LEVAN; FREDGA; SANDBERG (1964), sendo arranjados em ordem decrescente de tamanho em cada grupo cromossômico. Para a determinação do NF, os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) foram considerados com dois braços.