

DANIEL LUIS ZANELLA KANTEK

ESTUDO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS RICAS EM GC E  
APLICAÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *AluI* EM DUAS ESPÉCIES  
DE *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE) PERTENCENTES AO  
PRIMEIRO PLANALTO DO RIO IGUAÇU (PR).

Monografia apresentada à disciplina BG014 do  
Departamento de Genética do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Dra. Marta Margarete Cestari

Co-Orientador: Dr. Alberto Sérgio Fenocchio

**CURITIBA**

2002

“O mundo está cheio de mistérios. A vida é um”

J.B.S Haldane (1932, pag.6)

## AGRADECIMENTOS

O meu ingresso e interesse na área de citogenética animal deve-se a oportunidade fornecida pela Profa. Dra. Marta Margarete Cestari e pelo Prof. Algerto Sérgio Fenocchio, como estagiário. Agradeço a eles pelos ensinamentos e pela paciência, pois sem estes não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço a meus pais e meus irmãos pelo apoio e incentivo constante durante todo o meu curso de graduação.

A todo pessoal do Laboratório de Citogenética Animal da UFPR: Andrea, Deborah, Elizabete, Fátima, Iris, Marcos, Maria Cristina, Rafael (Polly), Rafael, Roger e Roxane.

Ao professor Dr. Ives José Sbalqueiro pelas conversas e trocas de idéias que muito contribuíram para este trabalho.

Ao Dr. José Fernando de S. Lima pelas dicas e sugestões durante o convívio no laboratório.

A Marcos Vinícius Ferraro (Mestrando), pelo auxílio fornecido para as ilustrações deste trabalho.

Agradecimento especial pela ajuda na confecção deste e de outros trabalhos a Roxane, Maria Cristina e Roger.

Aos amigos da Água Verde, que me acompanham desde minha infância até hoje.

Ao pessoal do CAEB: Pedro, Micheli, Bruno, Renato, Barata, Gil, Felipe, Flávia, Letícia, Carol, Virgínia, Miolo, Sardinha, Leo e muitos outros.

A todos os colegas da minha turma (01/98).

A Vinícius Abilhoa, pela identificação dos exemplares estudados neste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE .....	1
1.2. ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU .....	4
1.3. CITOGENÉTICA DOS PEIXES DO RIO IGUAÇU .....	5
1.4. APLICAÇÃO DE FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	7
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. MATERIAL .....	10
3.2. MÉTODOS.....	11
3.2.1.a. MÉTODO DIRETO.....	11
3.2.1.b. MÉTODO INDIRETO.....	12
3.2.2. MÉTODO DA COLORAÇÃO CONVENCIONAL – GIEMSA.....	13
3.2.3. BANDAMENTO RON .....	13
3.2.4. BANDAMENTO C .....	14
3.2.5. CLIVAGEM COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	15
3.2.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM CROMOMICINA A <sub>3</sub> .....	16
3.2.7. FOTOMICROGRAFIA.....	17
3.2.8. IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS.....	17
4. RESULTADOS .....	19
4.1. <i>Astyanax</i> sp. C.....	19
4.2. <i>Astyanax</i> sp. D.....	25
5. DISCUSSÃO .....	38
5.1. <i>Astyanax</i> sp. C.....	38
5.2. <i>Astyanax</i> sp. D. ....	40
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Exemplos de <i>Astyanax</i> sp. C coletados em: a) Chácara da Paz no município de São José dos Pinhais; b) município de Piraquara. c) Exemplar de <i>Astyanax</i> sp. D.....	10
<b>FIGURA 2</b> - Histogramas representativos das frequências dos números diplóides encontrados em <i>Astyanax</i> sp. C de São José dos Pinhais (a) e de Piraquara (b). .....	19
<b>FIGURA 3</b> - Cariótipos de macho (No. 861) e de fêmea (No. 290) de <i>Astyanax</i> sp C coletado na Chácara da Paz no município de São José dos Pinhais(PR), 2n=50 (4M; 22SM; 8ST; 16A); NF=84. ....	20
<b>FIGURA 4</b> - Coloração seqüencial, banda C (a) e AgNO <sub>3</sub> (b) em <i>Astyanax</i> sp. C (No. 870) de São José dos Pinhais (PR), as setas indicam um dos cromossomos do par 16, portador da RON.....	21
<b>FIGURA 5</b> - Coloração seqüencial indicando a associação entre os cromossomos dos pares 3 e 16, Giemsa (a) e AgNO <sub>3</sub> (b) em <i>Astyanax</i> sp. C (No. 824) coletado em São José dos Pinhais(PR). ....	22
<b>FIGURA 6</b> - AgNO <sub>3</sub> em <i>Astyanax</i> sp. C mostrando a variação encontrada nos cromossomos marcados pela prata em diferentes metáfases nos indivíduos de São José dos Pinhais (b-f), e a constância destas marcações em exemplares de Piraquara (a). ....	22
<b>FIGURA 7</b> - a-b) Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. C de São José mostrando alguns padrões C <sup>+</sup> . c) padrão C <sup>+</sup> constante em exemplares de Piraquara. ..	23
<b>FIGURA 8</b> - Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. C de São José após tratamento com AluI, demonstrando um padrão similar ao C <sup>+</sup> . ....	24
<b>FIGURA 9</b> - Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. C de São José após tratamento com CMA <sub>3</sub> , demonstrando um padrão similar ao C <sup>+</sup> . ....	24
<b>FIGURA 10</b> - Histograma representativo das frequências dos números diplóides encontrados para <i>Astyanax</i> sp. D. ....	25
<b>FIGURA 11</b> - Cariótipos de macho (No. 799) e de fêmea (No. 797) de <i>Astyanax</i> sp D. 2n=50 (4M; 24SM; 6ST; 16A); NF=84.....	26

<b>FIGURA 12</b> - Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. D indicando as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)(setas). .....	27
<b>FIGURA 13</b> - Cariótipos (bandas C) de <i>Astyanax</i> sp. D dos indivíduos 804 (a) e 797 (b). .....	29
<b>FIGURA 14</b> - Variação de heterocromatina nos pares 18 e 19. a) homozigose p/ blocos intersticiais, b) heterozigose e c) homozigose p/ blocos telomerais. ....	30
<b>FIGURA 15</b> - Variação da localização dos blocos intersticiais heterocromáticos nos pares 18 e 19. ....	30
<b>FIGURA 16</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D (No. 798). a) bandas C e b) coloração com CMA <sub>3</sub> . ....	31
<b>FIGURA 17</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D (No. 803). a) banda C e b) após clivagem com endonuclease de restrição <i>AluI</i> . ....	32
<b>FIGURA 18</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D coloração convencional. 3n=75 (12M; 36SM; 9ST; 24A). ....	33
<b>FIGURA 19</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D Banda C. 3n=75(6M; 36SM; 9ST; 24A). ....	34
<b>FIGURA 20</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D CMA <sub>3</sub> . 3n=75 (6M; 36SM; 9ST; 24A). ....	35
<b>FIGURA 21</b> - Cariótipo de <i>Astyanax</i> sp. D <i>AluI</i> . 3n=75 (6M; 36SM; 9ST; 24A). ....	36
<b>FIGURA 22</b> - <i>Astyanax</i> sp. D triplóide (3n=75). Região com RON intersticial C <sup>+</sup> e CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> em um cromossomo do tipo acrocêntrico (Par 20).36	

## RESUMO

A família Characidae representa o maior grupo de peixes de água doce da América do Sul. O gênero *Astyanax*, pertencente a referida família, representa um táxon bem complexo, com numerosas formas, muitas delas bastante similares. Dados cariotípicos também mostram um alto grau de complexidade em algumas espécies deste gênero. Foram analisados duas populações de *Astyanax* sp. C provenientes do Alto Rio Iguaçu. Os indivíduos das duas populações são similares com relação ao número cromossômico ( $2n=50$ ) e à coloração convencional (2 pares de metacêntricos, 13 de submetacêntricos, 4 de subtelo-cêntricos e 8 de acrocêntricos), entretanto são evidenciadas diferenças entre os padrões de RON, Banda C, CMA<sub>3</sub> e de *AluI* entre as populações. A outra espécie estudada foi *Astyanax* sp. D, sendo que os indivíduos analisados apresentaram um número diplóide modal de 50 cromossomos. Dentre os animais estudados, um indivíduo apresentou 75 cromossomos (triplóide). O cariótipo destes animais apresentou 2 pares de cromossomos metacêntricos, 12 de submetacêntricos, 3 de subtelo-cêntricos, 8 de acrocêntricos. Através da técnica de impregnação pelo nitrato de prata foi evidenciada uma variabilidade, tanto inter quanto intraindividual, em relação a quantidade e a localização das RONS ativas. A heterocromatina revelada, através da técnica da banda C, mostrou-se distribuída, principalmente, nas regiões teloméricas de todos os cromossomos subtelo-cêntricos, e em grande parte dos cromossomos acrocêntricos. Os blocos C positivos encontrados demonstraram uma variação interindividual com relação ao número e localização das marcas, evidenciando ser este um caráter polimórfico. Em alguns pares de cromossomos acrocêntricos foram identificados blocos C<sup>+</sup> intersticiais, os quais provavelmente são resultado de inversões paracêntricas. As regiões AgNO<sub>3</sub><sup>+</sup> também se mostraram heterocromáticas. A enzima de restrição *AluI* e a Cromomicina A<sub>3</sub> apresentaram um resultado parecido com o da Banda C. Comparando os dados deste trabalho com *Astyanax* sp. C, observa-se uma grande diferença na quantidade e localização da heterocromatina. Em vista dos resultados obtidos, pode-se dizer que os dados cariotípicos são uma ferramenta importante na discriminação de espécies taxonomicamente problemáticas como os *Astyanax* pertencentes à Bacia do Rio Iguaçu.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE

A família Characidae quando comparada com as demais famílias da ordem Characiformes é a maior e a mais complexa, nela se incluem peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Segundo NELSON (1994), esta família possui cerca de 170 gêneros e mais de 885 espécies.

Os peixes da família Characidae, geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas muito conhecidos pelos brasileiros, como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros. Estes variam de tamanho desde 2 cm, como os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972).

Segundo WEITZMAN e FINK (1983), a referida família é um vasto grupo de peixes completamente heterogêneo e aparentemente polifilético. Os estudos citogenéticos na família Characidae tiveram seu início com POST (1965), que relatou os números cromossômicos para várias espécies. FALCÃO (1988) relacionou 135 espécies cujos números haplóides e/ou diplóides já eram conhecidos, evidenciando uma extensa variabilidade cromossômica compreendida entre  $2n=28$  para *Hemigrammus* (SCHEEL, 1973) e  $2n=64$  para *Serrasalmus holandi* (MURAMOTO; OHNO; ATKIN, 1968). A maioria das espécies, no entanto, mostra um valor compreendido entre  $2n=48$  e 54 cromossomos (OLIVEIRA et al., 1988). Os Characidae apresentam uma variabilidade de número e forma cariotípica tanto entre espécies de um mesmo gênero (MORELLI et al., 1983; FALCÃO et al., 1984), como entre populações da mesma espécie (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Apesar da diversidade cariotípica desta família, ela apresenta uma característica citotaxonômica importante que, em geral, tem se mantido constante na maior parte das espécies estudadas até o momento, ou seja, o primeiro par de

cromossomos é um metacêntrico grande que se destaca dos outros metacêntricos (SCHEEL, 1973; MORELLI et al., 1983).

A família Characidae apresenta não apenas diversidade quanto ao número total de cromossomos, mas apresenta também diversidade com relação ao número de cromossomos envolvidos com as regiões organizadoras de nucléolos e grande variedade nos padrões de heterocromatina constitutiva, constituindo-se estas características em importantes marcadores genéticos em algumas espécies (DANIEL-SILVA, 1996).

Estudos citogenéticos tem demonstrado que algumas subfamílias de Characidae apresentam um cariótipo com tendências evolutivas conservativas em termos de macroestrutura, como é o caso, por exemplo das subfamílias Salmininae (MARCO, 1986) e Bryconinae (VASCON et al., 1984). Entretanto, outras subfamílias tem demonstrado grande diversidade cromossômica junto a consideráveis problemas taxonômicos, como nas subfamílias Serrasalminae (AREFJEV, 1990a; CESTARI; GALETTI Jr., 1992), Cheirodontinae (AREFJEV, 1990b; WASKO; GALETTI Jr., 1994) e Tetragonopterinae (PORTELA; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 1988).

A subfamília Tetragonopterinae é representada por um grande número de espécies distribuídas ao longo da América do Sul e da América Central, e compreende gêneros pobremente definidos morfológicamente, provavelmente não sendo um grupo monofilético (PORTELA; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 1988). Por esta razão, acredita-se que estudos citogenéticos mais aprofundados possam auxiliar de maneira importante numa melhor definição das relações taxonômicas e evolutivas deste grupo.

O gênero *Astyanax* (Tetragonopterinae) têm recebido atenção especial por parte de alguns pesquisadores devido às suas características biológicas e citogenéticas, existindo casos onde diferentes populações de uma mesma espécie tem mostrado diferenças morfológica e citogenéticas entre si. O referido gênero mostra ampla variabilidade cariotípica, sendo observados desde  $2n=36$  em *A. schubarti* (MORELLI et al., 1983), até  $2n=50$  em outras espécies do gênero (SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995). Variações no número diplóide também foram detectadas para uma mesma espécie de *Astyanax*,

como é o caso de *A. fasciatus* (MORELLI et al., 1983; JUSTI, 1993) e *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO, 1989)

A posição taxonômica da família Characidae, segundo FINK e FINK (1981), é a seguinte:

CLASSE - Osteichthyes

SUBCLASSE - Actinopterygii

INFRACLASSE - Teleostei

SUPERORDEM - Osthariophysi

SÉRIE - Otophysi

SUBSÉRIE - Characiphysi

ORDEM - Characiformes

FAMÍLIA - Characidae

## 1.2. ICTIOFAUNA DO RIO IGUAÇU

Devido ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, ocorrido a aproximadamente 22 milhões de anos (período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da bacia do Iguaçu foram isoladas das do rio Paraná por estas quedas, que representam 70 metros de desnível (MDK/CENCO, 1987). Tal fato favoreceu um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna.

O Iguaçu sempre foi considerado um rio pobre em peixes, conforme ressaltado por GOODLAND (1975) e GODOY (1979), os quais atribuem esta pobreza à topografia do rio, com suas quedas e corredeiras, que impossibilitariam a subida de peixes e a realização de migrações extensas.

HASEMAN (1911) (apud SEVERI; CORDEIRO, 1994) estimou a ictiofauna da bacia do Iguaçu em 25 espécies, tendo descrito 11 das mesmas. Outros autores elevaram posteriormente para 35 o número de espécies, sendo 19 endêmicas e 2 exóticas. GODOY (1987), apresenta uma relação de 34 espécies e subespécies para a região catarinense da bacia do Iguaçu, baseado pelo conhecimento disponível até 1983. O conhecimento atual da ictiofauna da bacia do rio Iguaçu indica que a mesma seria composta pelo menos por 47 espécies, distribuídas em 35 gêneros e 15 famílias. Destas, 33 espécies (70%) e dois gêneros (6%) são endêmicos, 11 (23%) são comuns a outras bacias e 3 (6%) são exóticas (SEVERI; CORDEIRO, 1994).

Estudos taxonômicos feitos por SAMPAIO (1998), mostram que existem pelo menos 7 espécies do gênero *Astyanax* no rio Iguaçu, das quais apenas uma está nominada (*Astyanax gymnogenys*=sp A). As outras receberam a denominação de *Astyanax* sp. B; C, D, E e F.

### 1.3. CITOGENÉTICA DOS PEIXES DO RIO IGUAÇU

O rio Iguaçu, com sua fauna endêmica, mostra sérios problemas taxonômicos em relação a *Astyanax* (SAMPAIO, 1988; SEVERI; CORDEIRO, 1994) e *Trichomycterus* (AGOSTINHO; GOMES, 1997). As espécies do gênero *Astyanax*, estudadas citogeneticamente apenas com coloração convencional Giemsa, mostraram  $2n=50$  cromossomos (FAUAZ; CESTARI; MOREIRA-FILHO, 1990; DALABONA; CESTARI, 1995; BARROS et al., 1995; CENCI et al., 1998; ROBAINA; CESTARI, 1998), embora chegue a apresentar em alguns casos  $2n=51$  (devido a ocorrência de um cromossomo supranumerário) e diversos polimorfismos em sua fórmula cariotípica (ROBAINA; CESTARI, op. cit.; SILVA; JULIO Jr., 1988), ressaltando a necessidade e interesse de se estudar estes peixes. Quanto às espécies de *Trichomycterus* os seus cariótipos apresentam  $2n=54$  cromossomos, sendo que também foi encontrado um caso de triploidia natural com  $3n=81$  (BORIN; MARTINS-SANTOS, 1998). BORIN e MARTINS-SANTOS (2000) relataram uma variação intra-individual em *Trichomycterus davisi*, encontrando uma variação do número diplóide de 54 a 56 cromossomos. Outras espécies endêmicas estudadas até o momento, foram: *Oligosarcus longirostris* com  $2n=50$  (CESTARI, 1996); *Rhamdia branneri*, *R. voulezi* e *Rhamdia* sp (Pimelodidae) apresentando  $2n=58$  e cromossomos Bs (ABUCARMA, 1998; ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 1998) e *Ancistrus* sp1 (LARA; JULIO Jr, 1998). Outras espécies, entre elas algumas que são consideradas introduzidas, também estão sendo estudadas, como é o caso de *Hoplias malabaricus* que apresenta  $2n=42$  cromossomos (CESTARI, 1996; LEMOS; CESTARI, 1999), *Geophagus brasiliensis* e *Cichlassoma facetum* ambos com  $2n=48$  cromossomos (QUIJADA; CESTARI, 1999).

Os primeiros dados citogenéticos para *Astyanax* sp. foram obtidos por FAUAZ, CESTARI e MOREIRA-FILHO (1990), mostrando uma fórmula cromossômica composta por 3 pares de metacêntricos (M), 15 de submetacêntricos (SM-ST) e 7 acrocêntricos (A), além de múltiplas RONS. Mais tarde, DALABONA e CESTARI (1995), relataram dados sobre *Astyanax* sp. C e sp. E, que apresentaram  $2n=50$  cromossomos, sendo 3 pares de M, 14

de SM-ST e 8 de A. O primeiro M apresentou-se destacadamente maior que o restante do conjunto e não foi evidenciada diferença cromossômica entre os sexos. KANTEK, FENOCCHIO e CESTARI (2001), detectaram em *Astyanax* sp. C um número diplóide de  $2n=50$ , porém com uma fórmula cariotípica diferente. Já em *Astyanax* sp. B (DALABONA; CESTARI, 1995), foram encontradas duas formas cariotípicas distintas, uma apresentando 3 pares de cromossomos M, 14 de SM-ST e 8 de A, e a outra, com 3 pares de M, 16 de SM-ST e 6 de A, ocorrendo simpatricamente. Em ambos os casos o número diplóide modal não mudou ( $2n=50$ ) o que se alterou foi o NF, que apresentou uma fórmula com  $NF=84$  e outra com  $NF=88$ . Dados do mesmo trabalho (DALABONA; CESTARI, 1995) demonstraram a existência de RONS apenas em um par cromossômico em *Astyanax* sp. C e *A.* sp. E. Já em *Astyanax* sp. B foi constatada a existência de RONS múltiplas, variando de 2 a 5 cromossomos.

SAMPAIO (1988), ao analisar morfológicamente a espécie *Astyanax* sp. D do alto rio Iguaçu a considerou próxima de *Astyanax scabripinnis*, a qual representa um ótimo modelo para estudos de evolução cromossômica devido a variabilidade cariotípica e morfológica observada em algumas populações (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991) .

#### 1.4. APLICAÇÃO DE FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

A citogenética de peixes tem realizado estudos, principalmente, através de técnicas convencionais, como Giemsa, banda-C e Ag-RON. Muitas destas informações vem sendo interpretadas com um enfoque evolutivo, representando uma boa ferramenta para a sistemática e evolução de diversos grupos de peixes (SOUZA, 1996). Recentemente, métodos mais apurados como corantes fluorescentes (MAYR; KALAT; RÀB, 1990), enzimas de restrição (ERs)(SÁNCHEZ et al., 1991; HARTLEY, 1991; MAISTRO, 1996; SWARÇA; CAETANO; DIAS, 1999) e hibridação *in situ* (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VASQUEZ, 1994; GALETTI Jr. et al., 1995) tem fornecido contribuições importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos.

Os fluorocromos base-específicos podem ser agrupados em duas categorias: (1) aqueles que coram regiões ricas em GC como a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e a mitramicina (MM), e (2) os corantes AT-específicos como quinacrina, DAPI e Hoechst 33258 (VERMA; BABU, 1995).

Em pequenos vertebrados, especialmente peixes e anfíbios, o uso de fluorocromos tem possibilitado a revelação de diferenças qualitativas heterocromáticas entre os cromossomos de um mesmo complemento, como por exemplo os peixes *Astyanax scabripinnis* (SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr, 1996), *Hypostomus* (ARTONI; BERTOLLO, 1999), algumas espécies de *Leporinus* (MOLINA; SCHMID; GALETTI Jr., 1998) e para espécies de anfíbios do gênero *Pleurodema* (SCHMID, 1993).

Ainda em relação aos pequenos vertebrados, vários trabalhos mostram que existe uma relação entre Ag-RON e bandas fluorescentes produzidas por corantes GC-específicos (SCHMID, 1982; MAYR; RÀB; KALAT, 1985; AMENIYA; GOLD, 1986; RÀB; MAYR, 1987; SCHMID; GUTTENBACH, 1988; GALETTI Jr.; RASCH, 1993). Entretanto, alguns segmentos heterocromáticos, que não são relacionados com a RON, podem ser MM positivos ou DAPI positivos (ARTONI; BERTOLLO, op. cit.).

As enzimas de restrição, produzem geralmente em mamíferos padrões de bandas similares a bandas C e bandas G. Por exemplo, *AluI*, *MboI*, *RsaI* e *MpsI* reproduzem bandas C, enquanto que *HaeIII* produz banda G. A mesma endonuclease de restrição não irá produzir necessariamente o mesmo tipo de banda em espécies diferentes (PIECZARKA; MATTEVI, 1997).

A maioria das enzimas capazes de produzir coloração diferencial produzem bandas similares ao bandamento C. Devido à especificidade de corte das enzimas de restrição, os bandamentos obtidos com essas enzimas constituem um método mais sensível de análise da heterocromatina do que o tradicional bandamento C. Estudos comparativos dos padrões de bandamento por enzimas de restrição em cariótipos humanos mostram um grau mais elevado de heteromorfismos que as bandas produzidas pelo hidróxido de bário (BABU, 1998).

O alto grau de variabilidade já detectado para as espécies de *Astyanax* sp.C e *A.* sp.D (durante o período da bolsa de iniciação científica CNPq/PIBIC) para as regiões heterocromáticas através do bandamento C, aliado ao fato da utilização de técnicas mais refinadas (CMA<sub>3</sub> e endonuclease de restrição *AluI*) tornam a análise proposta neste projeto adequada a estas espécies de *Astyanax* do alto rio Iguaçu, as quais ainda apresentam definição taxonomica mal resolvida.

## 2. OBJETIVOS

- Caracterizar os padrões de bandas produzidas pela enzima de restrição *AluI* em *Astyanax* sp.C e *Astyanax* sp.D, provenientes do rio Iguaçu.
- Caracterizar as regiões heterocromáticas ricas em GC através da utilização de cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) em *Astyanax* sp.C e sp.D.
- Comparar os resultados obtidos com as técnicas de Giemsa, banda-C e Ag-RON.
- Discutir os resultados obtidos comparando-os com os encontrados na literatura para peixes neotropicais.

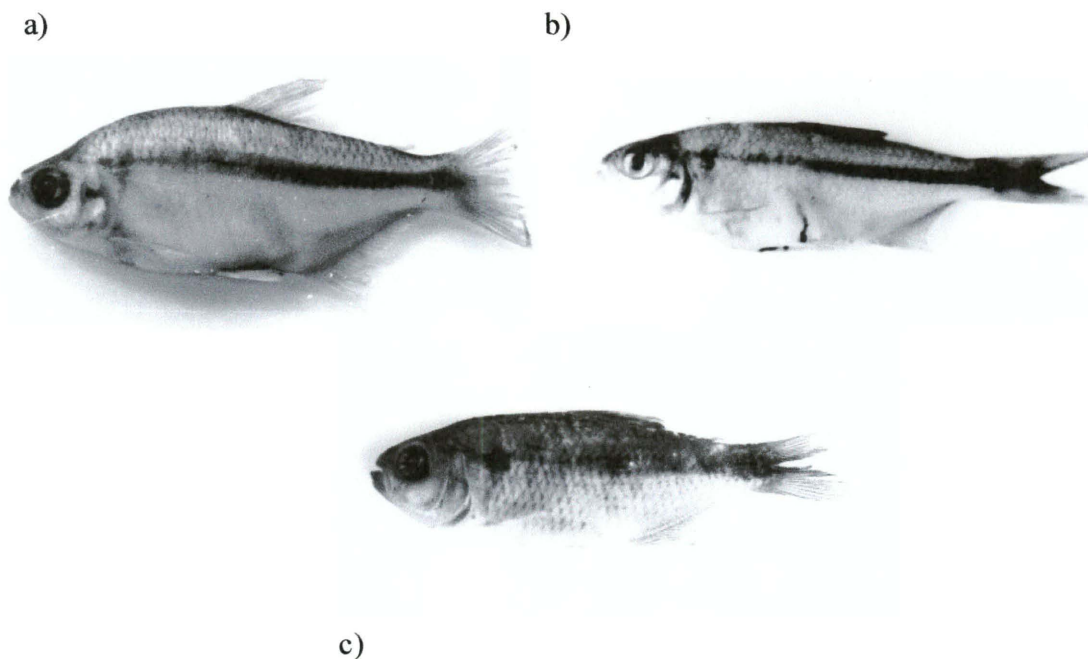
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

Foram utilizados exemplares referentes a duas populações alopátricas de *Astyanax* sp. C, sendo uma delas proveniente da “Chácara da Paz” (lago), município de São José dos Pinhais (PR) (Figura 1a). Uma segunda população de *Astyanax* sp. C (Figura 1b) foi coletada de um córrego no Município de Piraquara próximo à BR-277. Os exemplares da espécie *A.* sp. D (Figura 3c) foram coletados da Fazenda Canguiri da UFPR.

Todos os locais de coleta pertencem à região do Alto Rio Iguaçu.

**FIGURA 1** - Exemplares de *Astyanax* sp. C coletados em: a) Chácara da Paz no município de São José dos Pinhais; b) município de Piraquara. c) Exemplar de *Astyanax* sp. D.



## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1. OBTENÇÃO DE METÁFASES MITÓTICAS

As preparações foram obtidas com a porção anterior do rim, através da utilização de dois métodos: (a) Método Direto "*in vivo*" e (b) Método Indireto "*in vitro*".

#### 3.2.1.a. MÉTODO DIRETO

Esta técnica utilizada para a obtenção dos cromossomos mitóticos foi descrita por EGOZCUE (1971) e CESTARI (1973) e modificada por BERTOLLO, TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO (1978), sendo descrita como segue:

- Injeta-se intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,025%), na proporção de 1mg/100g de peso do animal;
- O peixe deve ficar em aquário bem aerado em torno de 20 minutos. Decorrido este tempo, sacrificar o animal e retirar a porção cefálica (anterior) do rim, podendo também aproveitar a porção posterior do órgão;
- Colocar o material em 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M), previamente aquecido em estufa a 37°C;
- Dissociar o material com auxílio de pinças de dissecação;
- Realiza-se uma segunda dissociação com o auxílio de uma seringa sem agulha, aspergindo e expirando o material até que se fique bem homogêneo;
- Transferir o material obtido, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para uma tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por vinte minutos;
- Acrescentar por volta de 1ml fixador recém preparado (álcool metílico 3: ácido acético 1), ressuspender o material até que fique bem homogêneo, e deixá-lo em temperatura ambiente por 5 minutos;

- Ressuspender o material e centrifugar durante 10 minutos, a 800-900 rpm. Descartar o sobrenadante com um a pipeta Pasteur;
- Adicionar 6-8ml do mesmo fixador. Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a 800-900 rpm. Descartar o sobrenadante.
- Repetir o passo anterior;
- Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1ml de fixador para 0,5ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo;
- Colocar uma lâmina limpa sobre um suporte em banho-maria a 60°C. Pingar 3 gotas de suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida;
- Secar o material ao ar;
- material deve ser guardado em tubos do tipo “ependorf” (1,5ml), devidamente tampados, em freezer a -20°C, para posterior utilização, caso a primeira lâmina não seja adequada para a análise.

### **3.2.1.b.MÉTODO INDIRETO**

Foi utilizado o método de cultura de tecidos sólidos de curto tempo descrito por FENOCCHIO et al. (1991), com algumas modificações:

- ◆ É retirada a porção anterior e posterior do rim (aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>) (mantida em solução RPMI) e transferida para uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal.
- O material é desagregado com pinças de ponta fina com posterior asperção e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha.
- A solução de células obtida é então incubada em estufa a 29° C por 6 a 7 horas em média.

- 25 minutos antes de completar o tempo, pingam-se 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. A placa de Petri é então gentilmente agitada para homogeneizar o material e este mantido em estufa até o tempo final.
- Passado este tempo, a cultura é sacrificada e transferida para um tubo de ensaio que é centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- O sobrenadante é descartado e completa-se o tubo de ensaio até 8ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). A solução é ressuspensa e fica por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37° C.
- O fixador é preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração. Dado o tempo da hipotonização, pingam-se algumas gotas do fixador em cada tubo. O material é ressuspensa até ficar homogêneo, e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- O sobrenadante é descartado e em seguida completa-se o tubo até o volume de 8 ml. Novamente o material é ressuspensa e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- A etapa anterior é repetida por duas vezes.
- Descartado o sobrenadante, coloca-se 1,5 ml de fixador e o material é ressuspensa. Esta solução é então armazenada em tubo de micropipeta do tipo Eppendorf em freezer à - 20° C

### **3.2.2. MÉTODO DA COLORAÇÃO CONVENCIONAL – GIEMSA**

Para análise do número e morfologia dos cromossomos, as lâminas pingadas são coradas com solução de corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a 5% durante aproximadamente 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente e secas ao ar.

### **3.2.3. BANDAMENTO RON**

Esta técnica foi descrita por HOWELL e BLACK (1980), e executada com algumas modificações, como se segue:

- Este bandamento é realizado com lâminas que tenham sofrido envelhecimento de pelo menos 1 dia em estufa à 42°C;
- Pinga-se duas gota da solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentar 0,5ml de ácido fórmico) e uma gota da solução de nitrato de prata (1g de AgNO<sub>3</sub> dissolvida em 2ml de água destilada) sobre o material na lâmina;
- Cobre-se a lâmina com lamínula;
- A lâmina é levada à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada;
- A lâmina é lavada com água corrente e deixada secar ao ar;
- A coloração convencional (se necessário) pode ser feita com Giemsa bastante diluída em tampão fosfato pH 6,8 por 30 segundos.

#### **3.2.4. BANDAMENTO C**

Os estudos de heterocromatina constitutiva foram realizados segundo a técnica de SUMNER (1972) com pequenas modificações, descrita como se segue:

- Coloca-se a lâmina pingada no dia em solução de HCl 0,2N em temperatura ambiente por 15 minutos;
- Lava-se a lâmina com água destilada e deixa secar ao ar;
- A lâmina é colocada em solução de Bário a 5% (Ba(OH)<sub>2</sub>) à 45°C por aproximadamente 2 minutos e 20 segundos;
- A lâmina é rapidamente inserida no HCl e após isso lava-se com jato de uma pisceta;
- material é então colocado em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora à 60°C;
- Lavar a lâmina em água destilada e deixa-la secar ao ar;
- material é corado com Giemsa diluído a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos.

### 3.2.5. CLIVAGEM COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

A técnica utilizada foi a descrita por MEZZANOTTE et al. (1983), com algumas adaptações feitas por MAISTRO (1996) para as preparações com cromossomos de peixes.

Preparo da solução de enzima:

- É estabelecida a concentração desejada (A). Ex: 0,3  $\mu$ l da enzima Alu I;
- Observa-se no rótulo ou na bula do frasco da enzima a concentração em que a mesma é fornecida (B). Ex: *AluI*, 5ud/ $\mu$ l;
- É estabelecido o número de gotas de suspensão que serão tratadas usando uma gota para cada lâmina, sendo que para cada gota foram usadas 30 $\mu$ l (C);
- Calcula-se o volume total de enzima que será retirado do frasco (X) usando a seguinte equação:
  - $A \cdot C = B \cdot X$                        $X = (A \cdot C) / B$
  - $0,3 \cdot 30 = 5 \cdot X$                        $X = 1,8 \mu$ l
- A solução da enzima é preparada da seguinte forma:
- Coloca-se em um frasco Eppendorf 27  $\mu$ l de água destilada para cada lâmina.
- Adiciona-se 3  $\mu$ l de tampão para cada lâmina. Observar que essa quantidade só é válida quando o tampão vem concentrado 10 vezes de fábrica, o que é usual. Após o uso, a solução tampão é colocada imediatamente de volta no freezer. Não há necessidade de se trabalhar com a mesma em gelo;
- Adiciona-se a quantidade de enzima calculada segundo o item anterior (variável X), no exemplo 1,8  $\mu$ l. A enzima só será retirada do freezer no momento da sua utilização e será mantida em um frasco com gelo. Caso essas observações não sejam seguidas, há sérios riscos de se destruir a estrutura molecular da enzima, tornando-a ineficaz.

Tratamento com as enzimas de restrição

- Prepara-se a solução de enzima de acordo com o item anterior;

- Pinga-se uma gota de solução de enzima para cada gota de suspensão celular e então cobre-se com lamínula;
- A lâmina é colocada em câmara úmida muito bem fechada e incubada à 37° C por 5 horas.
- Retirar a lâmina da estufa, lavar a mesma, deixar secar ao ar e corar como descrito no método da coloração convencional.

### 3.2.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM CROMOMICINA A<sub>3</sub>

A técnica utilizada foi a descrita por SCHMID (1980) a qual marca as regiões do DNA ricas em bases CG.

Para a obtenção da solução de cromomicina A<sub>3</sub>, dissolver 0,5 mg de cromomicina em 1 ml de tampão McIlvaine e adicionar 5 mM de cloreto de magnésio – deixar a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias.

Tampão McIlvaine:

#### Solução A

Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O) .....10,5 g  
 Água deionizada.....500,0 ml

#### Solução B

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0,2M).....14,2 g ou  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....26,79 g ou  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O.....35,6 g  
 Água deionizada.....500,0 ml

As etapas são as seguintes:

- Pingada-se lâminas conforme descrito nas técnicas anteriores e deixadas envelhecer por um dia na estufa a 45° C.
- Colocar 50 ml da solução de cromomicina A<sub>3</sub> com o auxílio de uma micropipeta sobre a lâmina, cobrir esta com uma lamínula e deixar corando por 90 minutos no escuro.
- Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 1 minuto.

- Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.
- Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

### 3.2.7. FOTOMICROGRAFIA

As metáfases que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram fotografadas em microscópio Zeiss, em campo claro com objetiva de imersão.

O microfilme (Imagelink HQ) foi processado em revelador Dektol (KODAK) por aproximadamente 2 minutos à 20°C, e posteriormente dez minutos no fixador (Kodak). Em seguida o filme foi lavado em água corrente por aproximadamente 60 minutos e deixado secar ao ar.

Para as com preparações em cromomicina, foi utilizado um fotomicroscópio de epifluorescência com filtro 450-490nm e filmes T-max 100.

As fotos foram reveladas (revelador Dektol diluído em água 1:2) em papel kodabromide.

### 3.2.8. IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

Após a escolha das melhores metáfases para a montagem dos cariótipos e ordenação dos pares cromossômicos foi feita em ordem decrescente de tamanho, as medidas cromossômicas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro para a determinação da relação entre os braços. A classificação dos cromossomos conforme os valores da relação de braços (RB) foi estabelecida segundo LEVAN, FREGDA e SANDBERG (1964), e os tipos cromossômicos segundo a classificação são:

Metacêntricos (M)                      RB= 1,00 a 1,70

Submetacêntricos (SM)	RB= 1,71 a 3,00
Subtelocêntricos (ST)	RB= 3,01 a 7,00
Acrocêntricos (A)	RB= maior do que 7,01

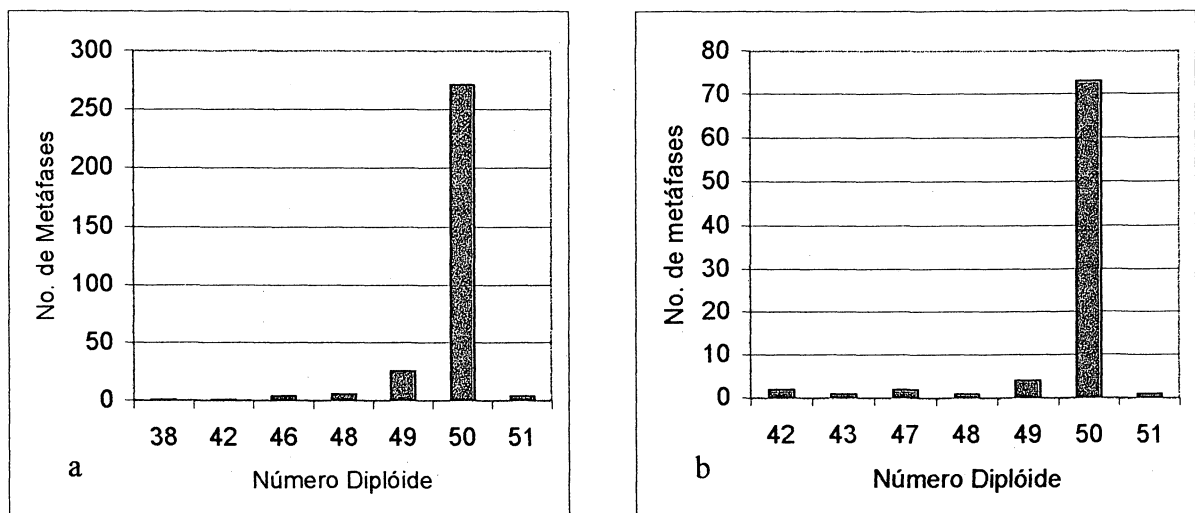
## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Astyanax* sp. C.

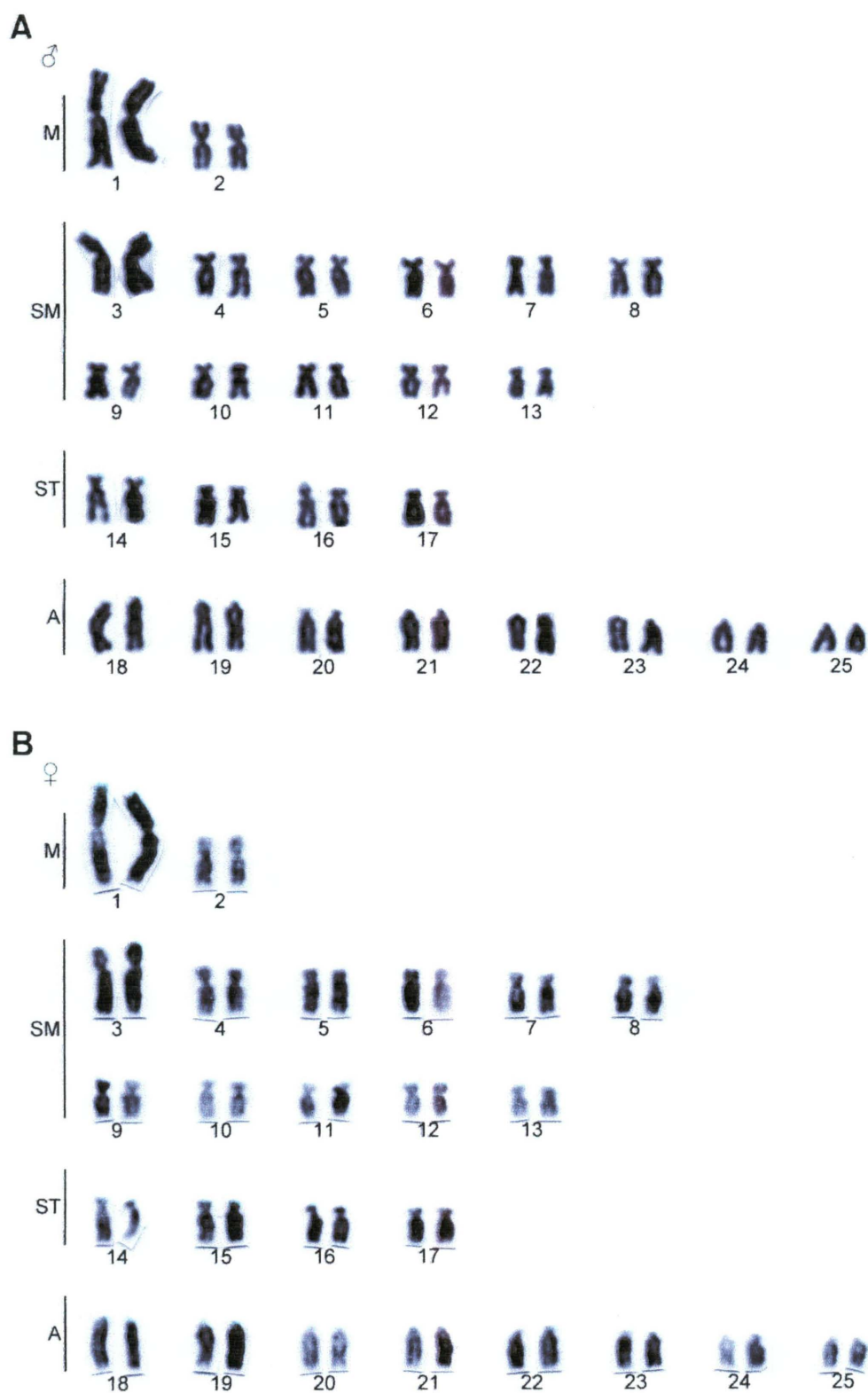
Foram analisados 32 (13 machos, 18 fêmeas e um de sexo indefinido) exemplares de *Astyanax* sp. C provenientes da Chácara da Paz (Figura 1a). Uma segunda população, com 6 exemplares de *Astyanax* sp. C (4 machos e 2 fêmeas)(Figura 1b) proveniente de um córrego no município de Piraquara (PR) próximo à BR-277 também foi analisada, sendo que todos os exemplares apresentaram resultados satisfatórios. Nas duas populações o número diplóide modal encontrado foi de 50 cromossomos (Figura 2).

O cariótipo determinado para os exemplares de *Astyanax* sp. C das duas populações é constituído por 2 pares de cromossomos metacêntricos (M), 11 pares de submetacêntricos (SM), 4 pares de subtlocêntricos (ST), 8 de acrocêntricos (A), perfazendo  $2n=50$  e  $NF=84$  (Figura 3). Não foi detectado dimorfismo sexual cromossômico, sendo que o primeiro par de cromossomos metacêntricos apresentou-se o maior do complemento.

**FIGURA 2** - Histogramas representativos das frequências dos números diplóides encontrados em *Astyanax* sp. C de São José dos Pinhais (a) e de Piraquara (b).

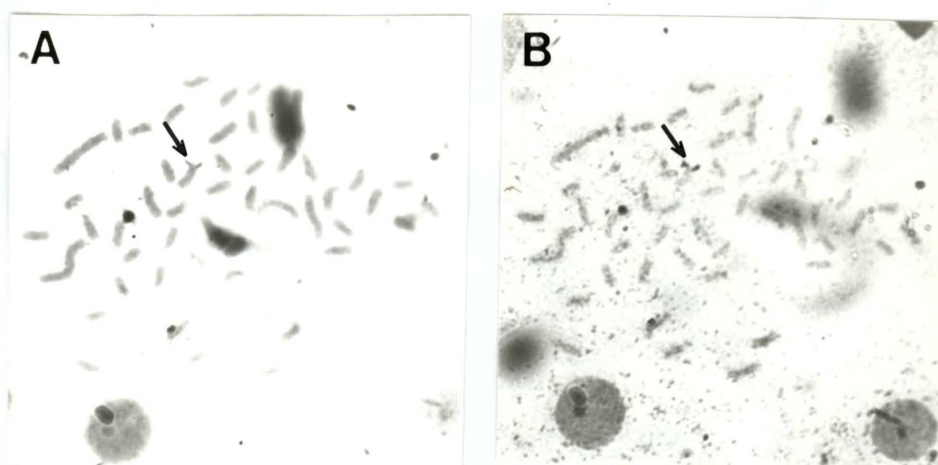


**FIGURA 3** - Cariótipos de macho (No. 861) e de fêmea (No. 290) de *Astyanax* sp C coletado na Chácara da Paz no município de São José dos Pinhais(PR),  $2n=50$  (4M + 22SM + 8ST + 16A); NF=84.



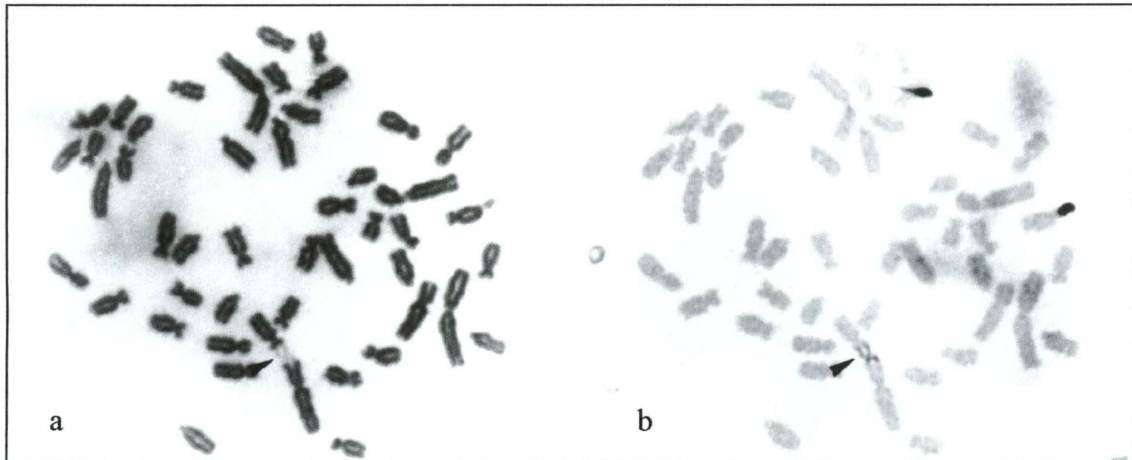
Nos exemplares das duas populações foi observada uma constrição secundária localizada no braço curto de um dos cromossomos do par 16, coincidente com a RON e com a banda-C (Figura 4 Figura 3).

**FIGURA 4** – Coloração seqüencial, banda C (a) e  $\text{AgNO}_3$  (b) em *Astyanax* sp. C (No. 870) de São José dos Pinhais (PR), as setas indicam um dos cromossomos do par 16, portador da RON.

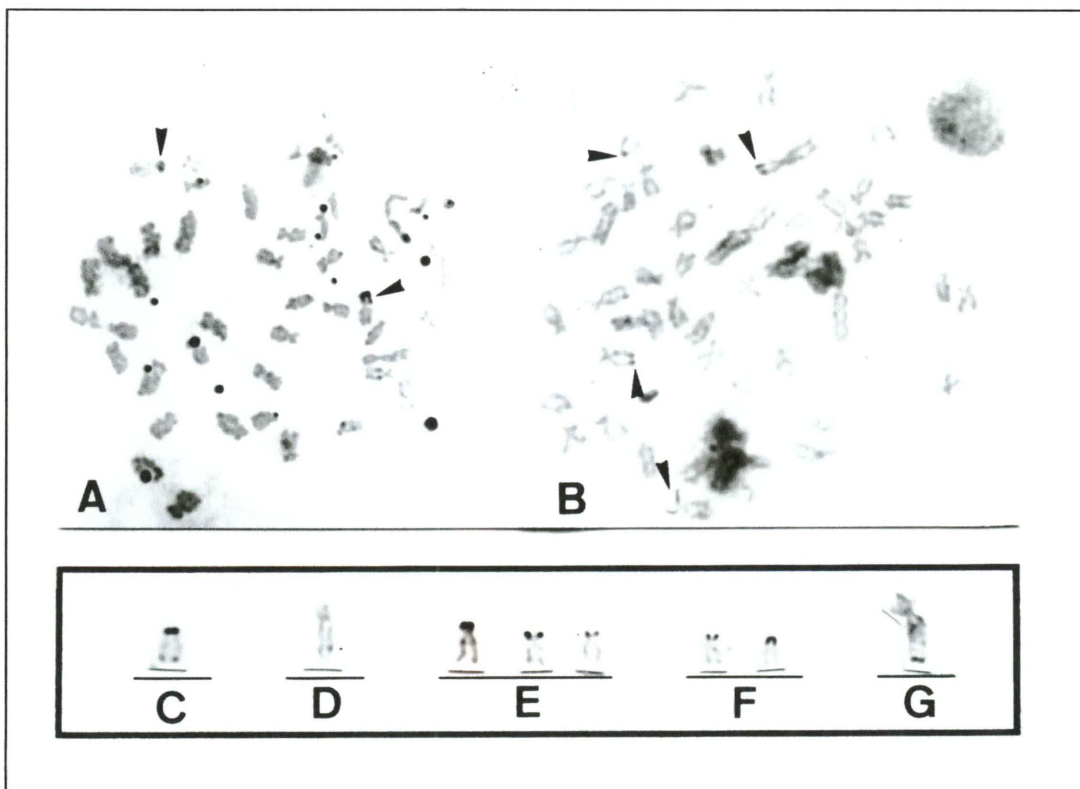


*Astyanax* sp. C (São José dos Pinhais) apresentou freqüentemente associações entre cromossomos portadores de RONs (Figura 5) e RONs múltiplas variando de 1 a 4 cromossomos marcados simultaneamente em uma só metáfase (Figura 6). O cromossomo que apresenta a constrição foi o único que esteve sempre marcado (Figura 4). As outras marcações apresentaram uma grande variação intraindividual e interindividual tanto em relação ao número quanto às suas localizações. Em apenas dois indivíduos foi possível detectar uma marcação forte da prata no braço curto de um dos cromossomos do par nº3 (Figura 5).

**FIGURA 5** - Coloração seqüencial indicando a associação entre os cromossomos dos pares 3 e 16, Giemsa (a) e AgNO<sub>3</sub> (b) em *Astyanax* sp. C (No. 824) coletado em São José dos Pinhais(PR).



**FIGURA 6** – AgNO<sub>3</sub> em *Astyanax* sp. C mostrando a variação encontrada nos cromossomos marcados pela prata em diferentes metáfases nos indivíduos de São José dos Pinhais (b-f), e a constância destas marcações em exemplares de Piraquara (a).



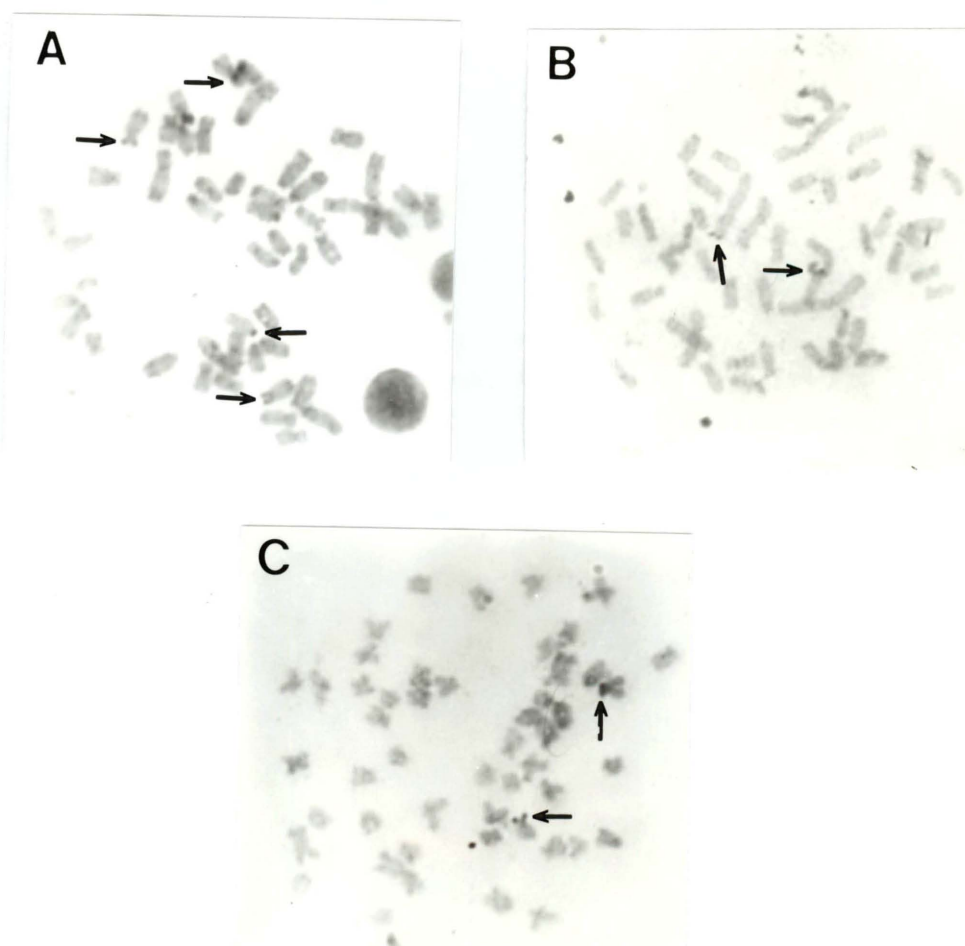
Nos indivíduos provenientes de Piraquara observou-se apenas um par de cromossomos com RONS positivas heteromórficas (Figura 6a).

As bandas C de *Astyanax* sp. C de São José mostraram-se polimórficas.(Figura 7a e b). Como nas RONS, observou-se que apenas o cromossomo portador da constrição secundária (Figura 4) aparece marcado em todos os indivíduos analisados. Normalmente a quantidade de blocos C<sup>+</sup> excede a quantidade de marcas deixadas pela prata.

Na população de Piraquara todos os indivíduos demonstraram um padrão C<sup>+</sup> constante (Figura 7c), o qual corresponde às marcações da prata.

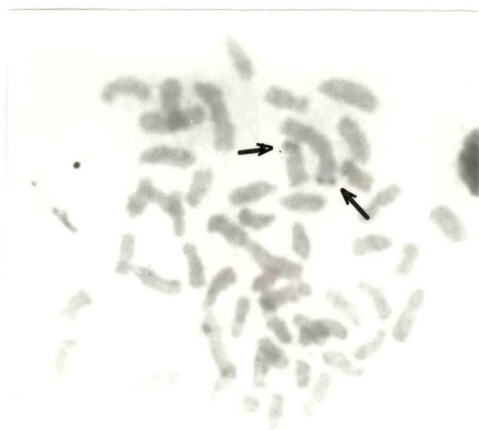
Ambas as populações demonstraram possuir heterocromatina centromérica, porém estas só são visíveis quando os cromossomos estão bem distendidos.

**FIGURA 7** - a-b) Metáfases de *Astyanax* sp. C de São José mostrando alguns padrões C<sup>+</sup>. c) padrão C<sup>+</sup> constante em exemplares de Piraquara.



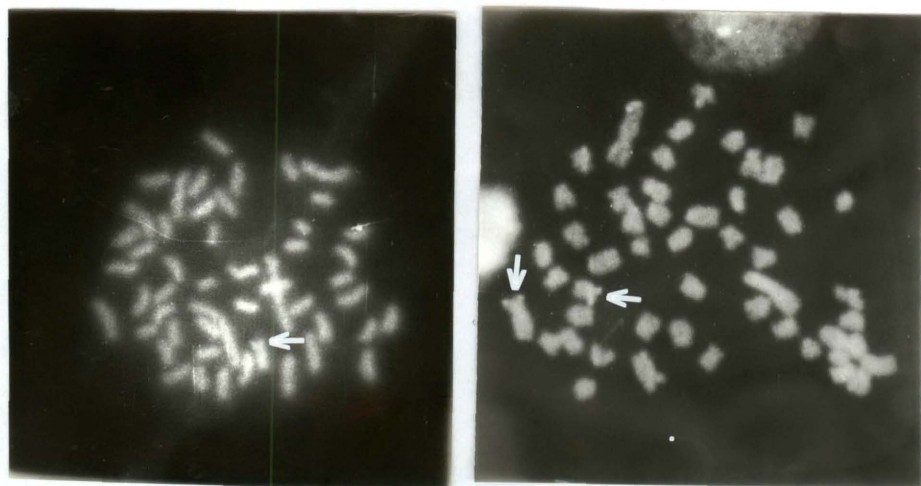
A endonuclease de restrição *AluI* demonstrou um padrão similar ao observado para a o bandamento C, com uma coloração forte em Giemsa na constrição secundária e nas regiões heterocromáticas. Porém as marcas C<sup>+</sup> centroméricas não ficaram evidenciadas pela endonuclease (Figura 8).

**FIGURA 8** - Metáfese de *Astyanax* sp. C de São José após tratamento com *AluI*, demonstrando um padrão similar ao C<sup>+</sup>.



A coloração com Cromomicina A<sub>3</sub> destacou as regiões C<sup>+</sup> nas duas populações analisadas (Figura 9). Como na enzima de restrição *AluI*, os centrômeros não foram marcados.

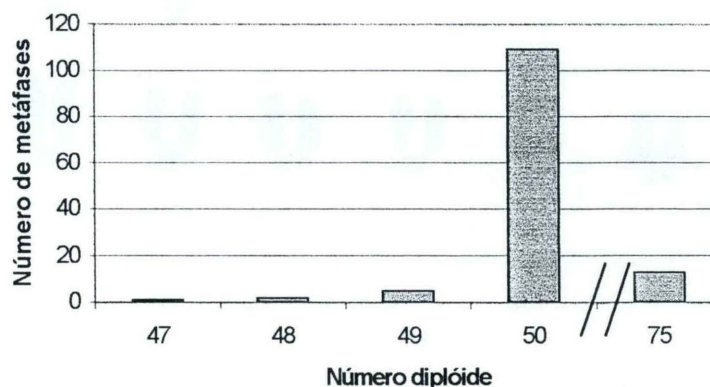
**FIGURA 9** – Metáfeses de *Astyanax* sp. C de São José após tratamento com CMA<sub>3</sub>, demonstrando um padrão similar ao C<sup>+</sup>.



#### 4.1 *Astyanax* sp. D

Foram analisados 07 exemplares de *Astyanax* sp. D (Figura 1c) (05 machos e 02 fêmeas). Os animais apresentaram um número diplóide modal de 50 cromossomos (Figura 10). A macroestrutura cariotípica apresentou 2 pares de cromossomos metacêntricos (M), 12 pares de submetacêntricos (SM), 3 pares de subtelocêntricos (ST), 8 de acrocêntricos (A) e um NF=84 (Figura 11). Não houve, aparentemente, dimorfismo sexual cromossômico.

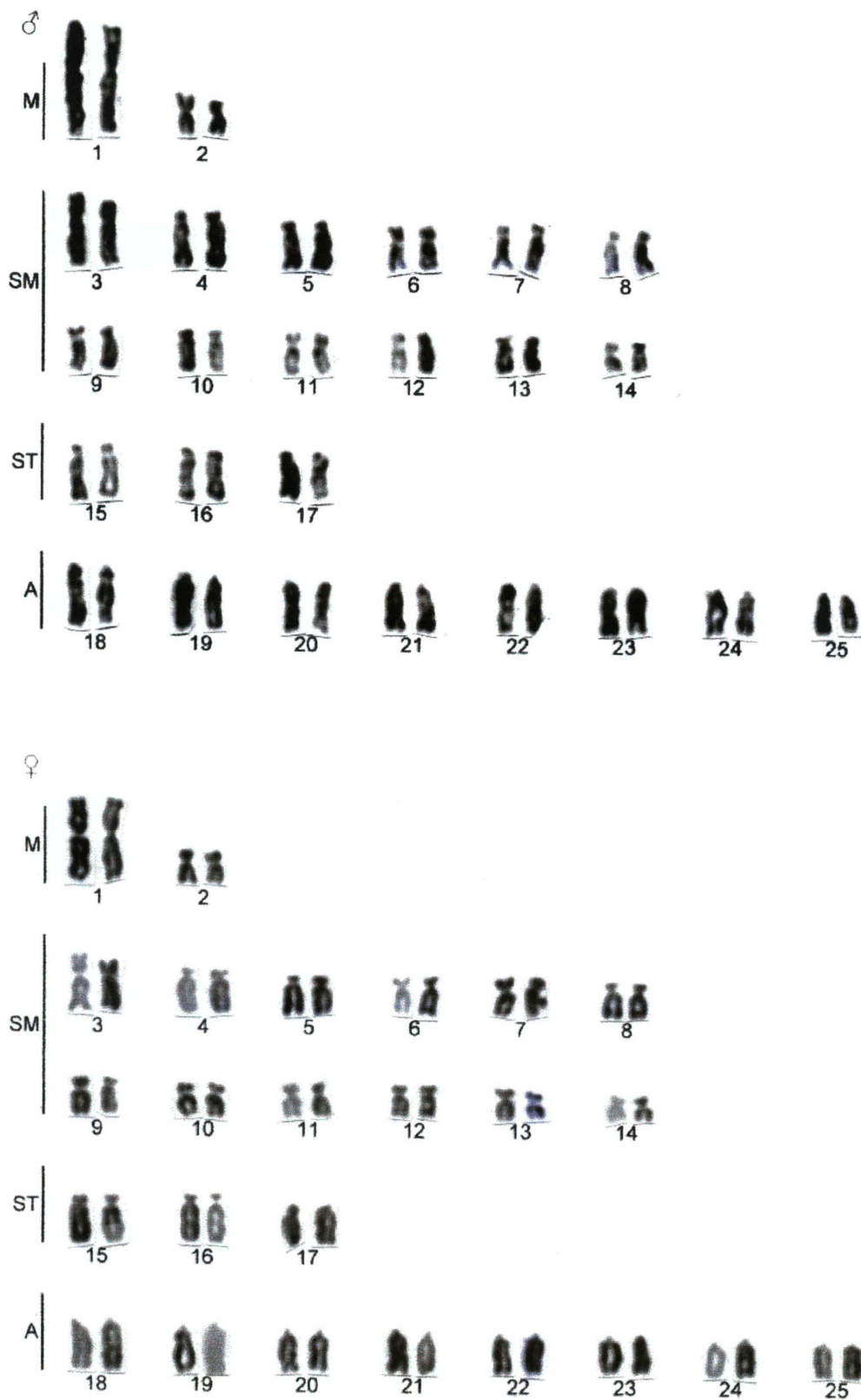
**FIGURA 10** - Histograma representativo das frequências dos números diplóides encontrados para *Astyanax* sp. D.



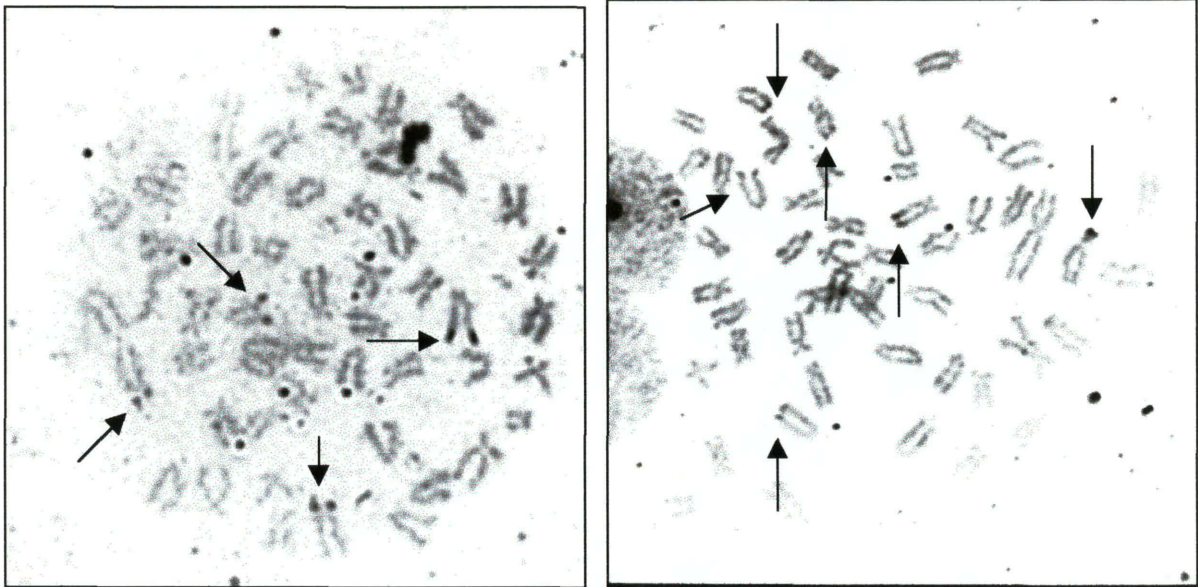
Dentre os animais estudados, um indivíduo apresentou 75 cromossomos (Figura 10), representando um caso de triploidia natural nesta espécie.

Análises das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) demonstraram uma alta variação inter e intra-individual relacionadas com o número e a localização das RONS. Foi possível identificar de duas a seis marcações de  $\text{AgNO}_3$  por metáfase (Figura 12).

FIGURA 11 - Cariótipos de macho (No. 799) e de fêmea (No. 797) de *Astyanax* sp D.  $2n=50$  (4M; 24SM; 6ST; 16A); NF=84



**FIGURA 12** - Metáfases de *Astyanax* sp D indicando as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)(setas).



A distribuição das regiões heterocromáticas (Figura 13) evidenciadas pela banda C também apresentou uma variação inter-individual. Foram identificados pelo menos 3 tipos heterocromáticos:

- (1) pequenas marcações  $C^+$  centroméricas fracas em alguns cromossomos do complemento (Figura 13a), as quais são  $CMA_3^-$  e  $AluI^-$ ;
- (2) blocos C positivos teloméricos,  $CMA_3^+$ ,  $AluI^-$ , correspondentes às marcações obtidas pela prata, localizadas em diferentes tipos e regiões cromossômicas (Figura 16 e 17);
- (3) largos blocos  $C^+$ ,  $AgNO_3^-$ ,  $CMA_3^+$  (Figura 16),  $AluI^+$  (Figura 17) visíveis nos telômeros dos braços longos de todos os cromossomos subtelocêntricos, de vários cromossomos acrocêntricos e de alguns submetacêntricos (Figura 13).

Os dois maiores pares de cromossomos acrocêntricos (par 18 e 19), os quais são portadores de bandas C do tipo três, podem ser encontrados, em indivíduos distintos, nas seguintes situações:

- ambos os homólogos com os blocos positivos intersticiais (Figura 14a).
- um dos homólogos com o bloco positivo telomérico e o seu correspondente com uma marcação intersticial (Figura 14b);

- um dos homólogos com o bloco positivo telomérico e o seu correspondente com uma marcação intersticial (Figura 14b);
  - ambos os homólogos com os blocos positivos teloméricos (Figura 14c);
- Pode-se ainda observar que as marcas intersticiais nem sempre estavam presentes na mesma posição (Figura 14).

Ainda com relação ao terceiro padrão de bandas, foi observado que em alguns tipos cromossômicos estas marcas se localizam um pouco acima do telômero (par 5 - Figura 13a).

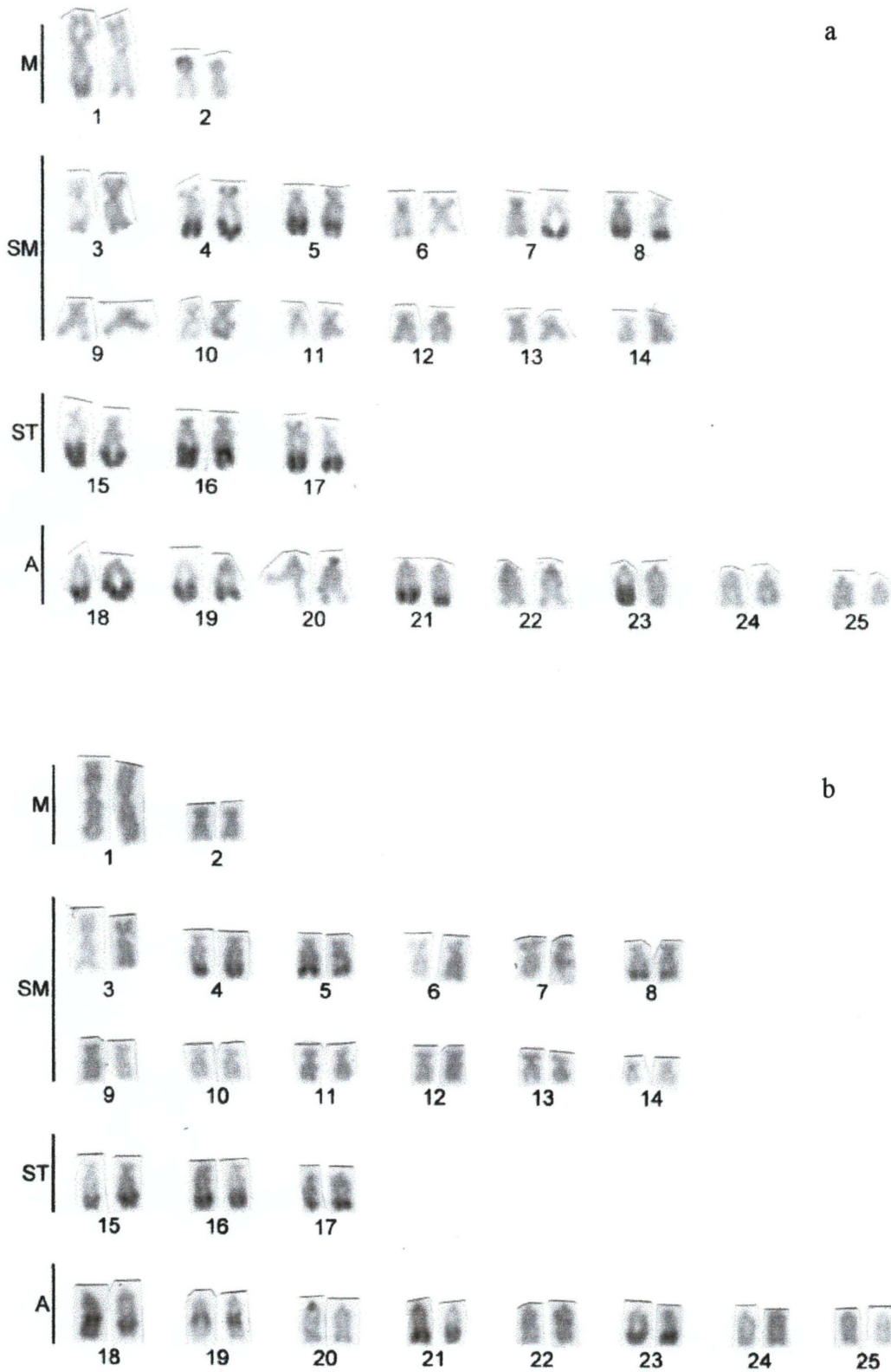
Também foi observado heteromorfismo em relação ao tamanho dos blocos heterocromáticos (tipo 3) entre homólogos (Figura 13). Em alguns indivíduos, determinados cromossomos são portadores de pequenas marcações heterocromáticas (do tipo 3) intersticiais ao lado dos blocos C<sup>+</sup> (par 16 - Figura 13a).

A endonuclease de restrição *AluI* apresentou um padrão idêntico ao descrito para o tipo heterocromático 3 (Figura 17). Ao comparar os cariótipos de banda C e da enzima de um mesmo animal, é possível detectar que existem mais blocos positivos nos cariótipos de banda C (Figura 17).

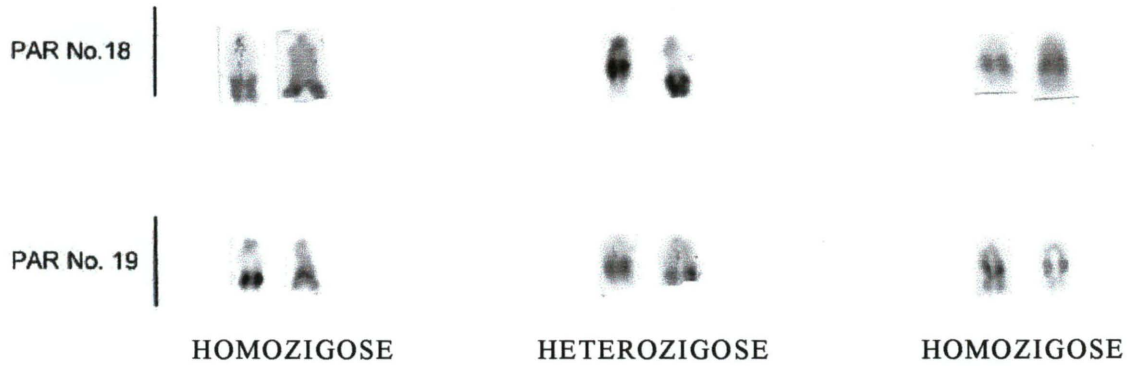
Dados relativos ao indivíduo triploide (3n=75) (Figura 10) encontrado nesta população demonstram o mesmo tipo de características apontadas para os indivíduos diplóides (2n=50), sendo possível verificar os padrões de Giemsa (Figura 18), banda C (Figura 19), CMA<sub>3</sub> (Figura 20) AgNO<sub>3</sub> e da endonuclease *AluI* (Figura 21). Além das marcas teloméricas AgNO<sub>3</sub><sup>+</sup> foi identificada uma marca intersticial em apenas um dos cromossomos acrocêntricos (Par 20), a qual é C<sup>+</sup>, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e se localiza numa constrição secundária (Figura 22).

Utilizando-se dos dados obtidos pela banda C, principalmente nas trissomias onde há inversões, verifica-se que há sempre dois cromossomos iguais e mais um diferenciado para cada trissomia cromossômica (Figura 21).

**FIGURA 13** - Cariótipos (bandas C) de *Astyanax* sp. D dos indivíduos 804 (a) e 797 (b).



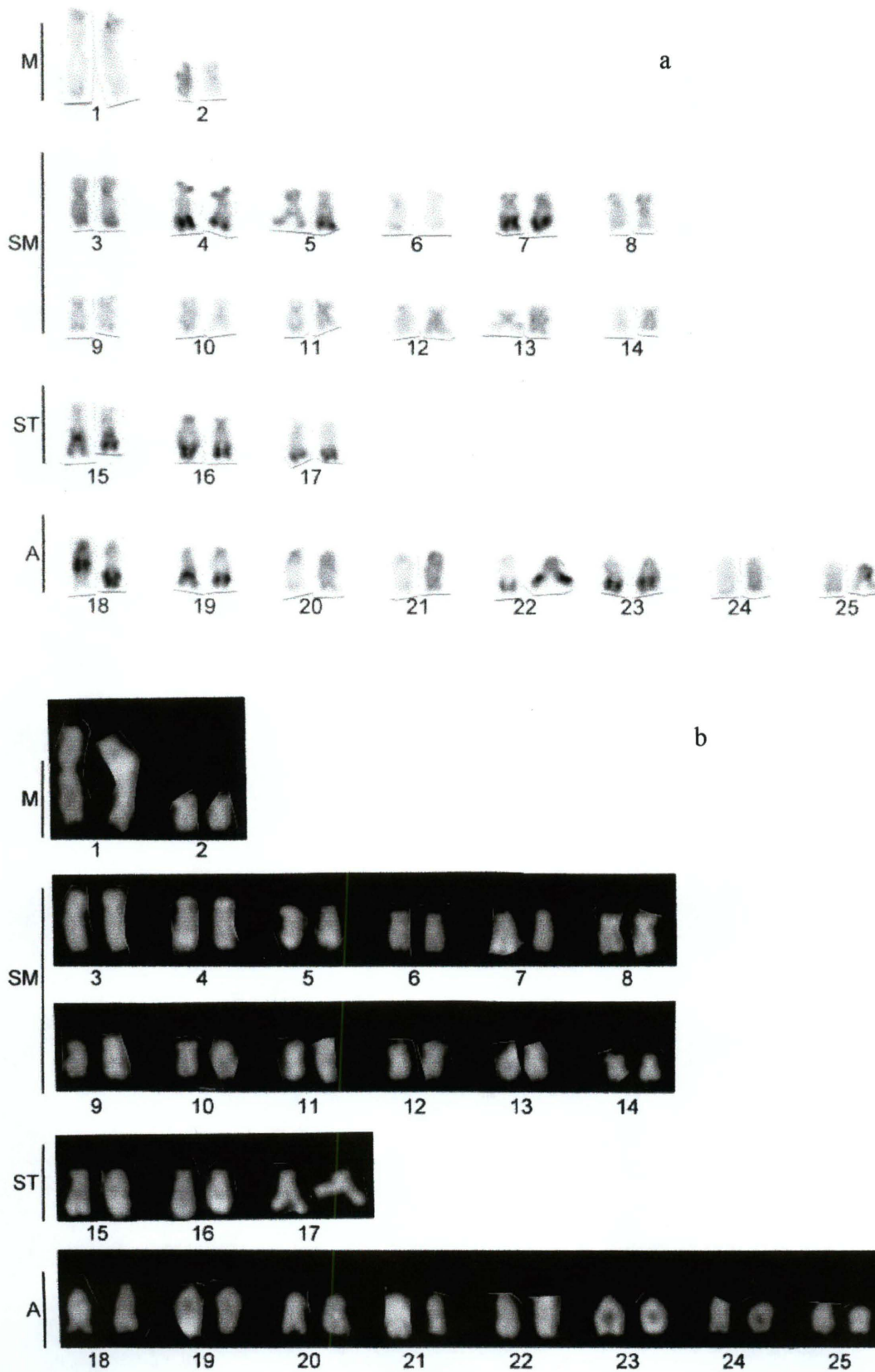
**FIGURA 14** - Variação de heterocromatina nos pares 18 e 19. a) homozigose p/ blocos intersticiais, b) heterozigose e c) homozigose p/ blocos telomerais.



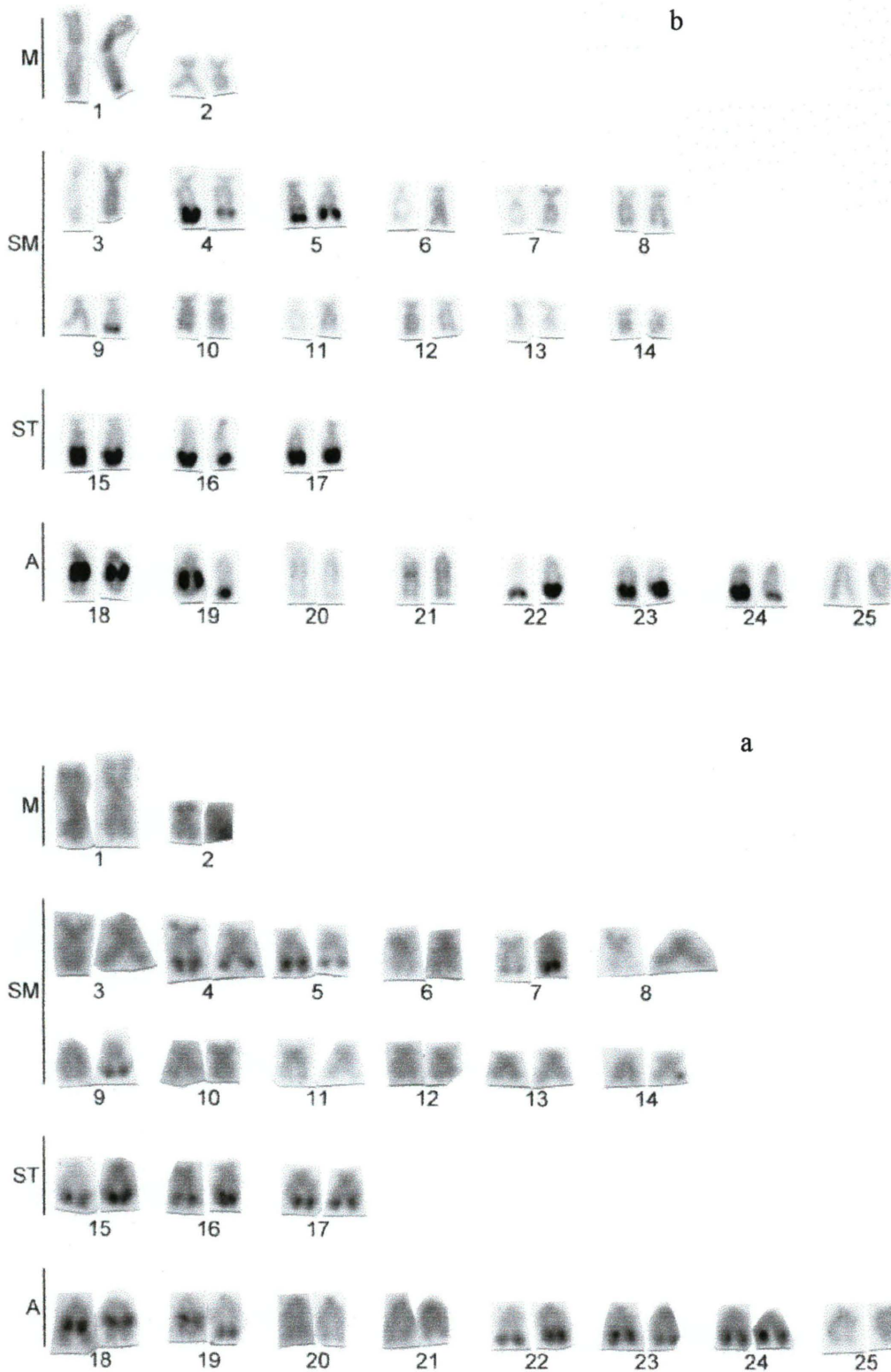
**FIGURA 15** - Variação da localização dos blocos intersticiais heterocromáticos nos pares 18 e 19.



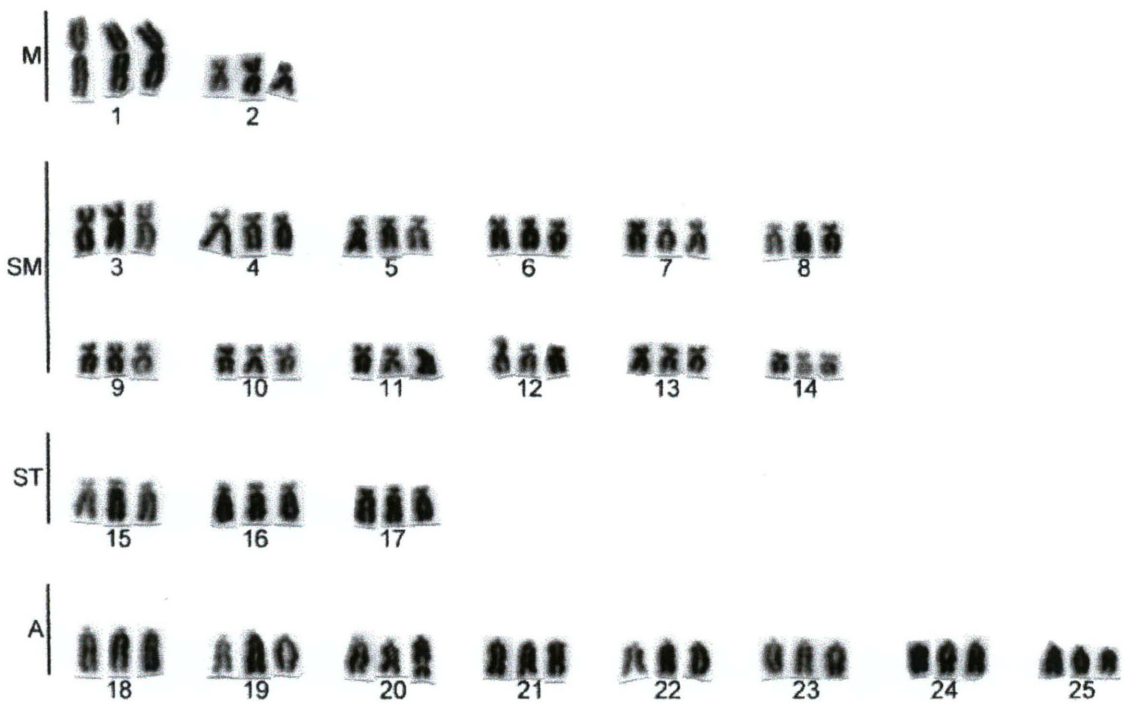
**FIGURA 16** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D (No. 798). a) bandas C e b) coloração com CMA<sub>3</sub>.



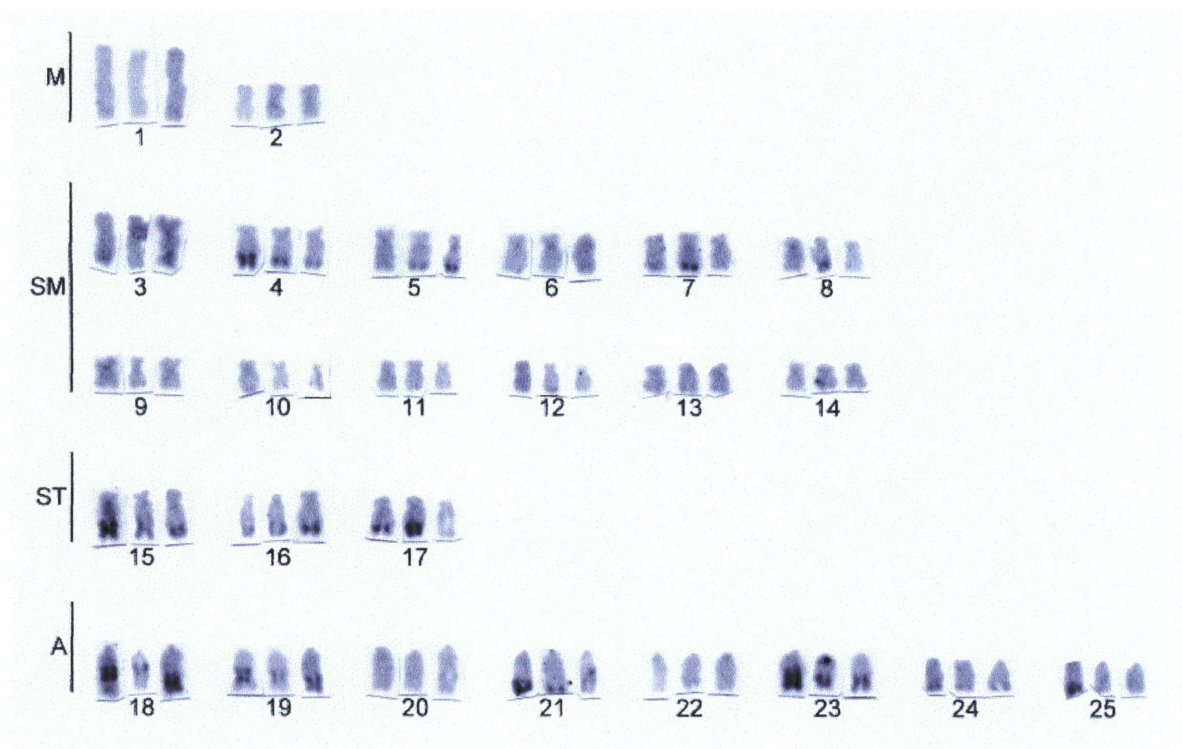
**FIGURA 17** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D (No. 803). a) banda C e b) após clivagem com endonuclease de restrição *AluI*.



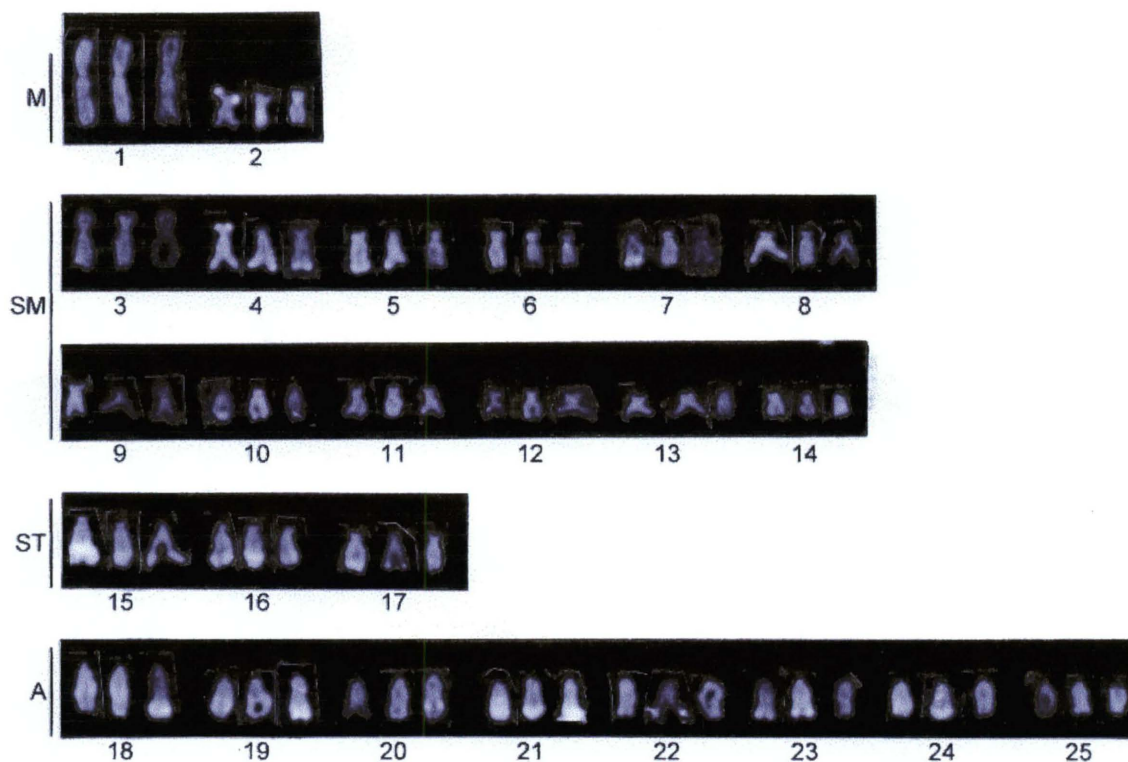
**FIGURA 18** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D coloração convencional.  $3n=75$  (12M; 36SM; 9ST; 24A).



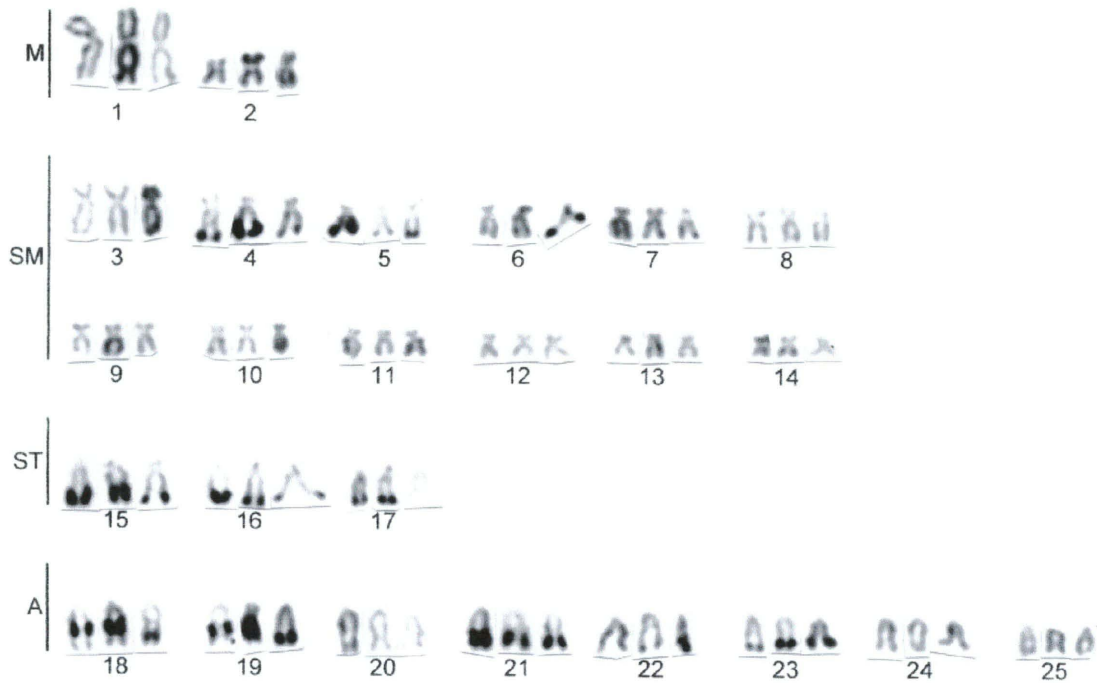
**FIGURA 19** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D Banda C.  $3n=75(6M; 36SM; 9ST; 24A)$ .



**FIGURA 20** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D CMA<sub>3</sub>. 3n=75 (6M; 36SM; 9ST; 24A).



**FIGURA 21** - Cariótipo de *Astyanax* sp. D *AluI*.  $3n=75$  (6M; 36SM; 9ST; 24A).



**FIGURA 22** - *Astyanax* sp. D triplóide ( $3n=75$ ). Região com RON intersticial  $C^+$  e  $CMA_3^+$  em um cromossomo do tipo acrocêntrico (Par 20).



## 5. DISCUSSÃO

O número diplóide observado neste trabalho,  $2n=50$  cromossomos, é o mais frequente em espécies do gênero *Astyanax*, sendo descrito para *A. bimaculatus* (SCHEEL, 1973; PAGANELLI; GALETTI JR.; MOREIRA-FILHO, 1986), *A. taeniatus* (PAGANELLI, 1990), e *A. eigenmanniorum* (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994). Apesar da diversidade cariotípica dos Characidae, *Astyanax* apresenta características básicas da família como o número diplóide de 50 cromossomos e o primeiro par de metacêntricos como o maior do complemento. Dados estes, que são apoiados pelos resultados do presente trabalho (Figura 2 e 10), mostrando que *Astyanax* sp. C e *Astyanax* sp. D mantém o mesmo padrão cariotípico de outras espécies do gênero.

### 5.1 *Astyanax* sp. C

Com relação a fórmula cariotípica de *Astyanax* sp. C, nota-se uma diferença entre os resultados relatados anteriormente por DALABONA e CESTARI (1995) e os do presente trabalho. Estes últimos, realizados com indivíduos provenientes do rio da Várzea, apresentaram um par a menos de cromossomos metacêntricos.

As bandas RONS de *A. sp. C* de São José dos Pinhais se mostraram diferentes dos resultados disponíveis para *A. sp. C* do rio da Várzea (DALABONA; CESTARI, 1995), o qual apresentou um par de cromossomos com RONS positivas heteromórficas. Os exemplares de Piraquara apresentaram as marcações semelhantes às dos indivíduos do rio da Várzea.

A presença de RONS múltiplas é uma característica comumente relatada para a subfamília Tetragonopterinae (MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1998), sendo portanto esperado encontrar este tipo de RONS em *Astyanax* sp. C. Associações das RONS vem sendo descritas em várias espécies de vertebrados, ocorrendo em cromossomos homólogos ou não homólogos, sendo menos frequente a presença de mais de um cromossomo (DENTON; HOWELL; BARRET, 1976). Como observado no presente estudo, estas associações são o

resultado da tendência ao agregamento dos crômosomos portadores de RONS (HOWELL, 1982).

A presença de um maior número de blocos heterocromáticos em relação à quantidade de marcas deixadas pela prata em *A. sp. C* é um indicativo de que os cistrons ribossômicos não estão sempre ativos.

A observação de poucos blocos heterocromáticos, revelou um padrão diferente do já relatado para outras espécies do gênero *Astyanax*, podendo então servir como um marcador para *A. sp. C*. A enzima de restrição *AluI* e a Cromomicina  $A_3$  apresentaram um padrão próximo à banda C, o que é relatado na literatura para algumas espécies de peixes (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1999). Como freqüentemente relatado para peixes (SOLA et al., 1997), *Astyanax sp. C* possui bandas  $CMA_3^+$  correspondentes às regiões  $AgNO_3^+$ .

A Cromomicina  $A_3$  e outros fluorocromos GC-específicos vem sendo usados em peixes para identificar RONS, possibilitando o estudo de estrutura do rDNA e de polimorfismos (SOLA et al., 1997). Entretanto, ainda há dúvidas se os fluorocromos coram os cistrons ribossômicos (SCHMID; VITELLI; BATISTONI, 1987) ou a heterocromatina intercalada (DNA espaçador não transcricional) do rDNA (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VASQUEZ, 1993).

Através dos resultados obtidos com  $CMA_3$ , em *Astyanax sp. C* foi possível detectar algumas situações:

- Aqueles indivíduos que possuíam apenas um cromossomo marcado pela prata, quando analisados através da  $CMA_3$  apresentaram apenas uma RON, não ocorrendo outras regiões GC positivas.

- Nem todas as marcações  $C^+/AgNO_3^+$  possuem seus respectivos blocos  $CMA_3^+$ . Estas diferenças talvez se devam à dificuldade de identificação destas bandas, ou realmente existem tipos diferentes de rDNA.

- A possibilidade da diferenciação de pelo menos dois tipos heterocromáticos, sendo que um deles localizado nos centrômeros, é  $CMA_3^-$  e  $AluI^-$ , e um outro tipo que está associado às RONS e é marcado pela cromomicina e pela enzima.

A coloração escura obtida para as RONS após a aplicação das enzimas pode estar relacionada a ausência de seqüências de corte da enzima nestas regiões ou a inacessibilidade de digestão da enzima devida a alta compactação de regiões heterocromáticas, ou por ambos os fatores (MEZZANOTE; FERRUCCI, 1984). Segundo MEZZANOTE et al.(1983), a organização da cromatina é o principal requisito para a indução dos efeitos das enzimas de restrição. Estudos em cromossomos de peixes através de enzimas de restrição (SANCHÉS et al., 1990; ABUIN; AMARO; SANCHÉS, 1994) do tipo *AluI*, revelaram um padrão similar ao bandamento C, como observado em *Astyanax* sp. C. É importante notar que a enzima *AluI* digere alguma partes, mas não toda a heterocromatina observada em *Astyanax* sp. C. Isto pode ser interpretado como uma evidência da existência de classes estruturais de heterocromáticas, possibilitando ataques diferenciados da enzima.

As diferenças identificadas entre as duas populações de *Astyanax* sp. C através das diversas técnicas empregadas pode servir como um marcador para estas populações e para uma possível comparação com outras populações.

## 5.2. *Astyanax* sp. D

O número diplóide de  $2n=50$  (Figura 10) encontrado no presente trabalho para *Astyanax* sp. D não difere da maioria das espécies deste gênero, inclusive de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MAISTRO, 1991; MAISTRO et al., 1998; SOUZA et al., 1995; entre outros), além disso ao se comparar os cariótipos em coloração convencional de *Astyanax* sp. D e *A. scabripinnis* (SOUZA et al., 1995; SOUZA et al., 1996; MAISTRO et al., 2000; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991) observa-se uma relativa proximidade entre as fórmulas cariotípicas.

O padrão de distribuição de heterocromatina do tipo 3 observado para estes indivíduos pode ser considerado como equilocal (Figura 13), ou seja, os blocos C<sup>+</sup> observados são equidistantes em relação ao centrômero em cromossomos não homólogos do mesmo conjunto cromossômico.

Uma possível explicação para a dispersão da heterocromatina nos braços cromossômicos pode ser baseada no modelo proposto por SCHWEIZER e LOIDL (1987), o qual diz respeito a orientação dos cromossomos durante a interfase meiótica (Orientação de Rabl). Esta conformação permitiria a transferência de heterocromatina entre locais equidistantes de cromossomos não homólogos.

Ao serem comparadas as bandas  $C^+$  de *Astyanax* sp. D com *A. scabripinnis* é possível observar a similaridade dos blocos heterocromáticos entre elas. Ambas espécies apresentam blocos teloméricos equidistantes localizados nos braços maiores dos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos.

A presença de blocos intersticiais  $C^+$  (Figura 15),  $AluI^+$  e  $CMA_3^+$  bem nítidos pode ser considerada uma consequência de inversões paracêntricas, as quais não alteram a forma do cromossomo, porém modificam as posições das bandas. Até o momento não foram registrados em *A. scabripinnis* blocos  $C^+$  resultantes de inversões como as apontadas para *Astyanax* sp. D. Sendo assim, é possível sugerir que essas inversões são uma característica derivada e específica de *Astyanax* sp. D. A identificação de variação na localização destas marcas intersticiais pode ser interpretada como uma mudança nos pontos de quebra cromossômica no momento da inversão.

Segundo SOUZA, MOREIRA-FILHO e GALETTI Jr. (1996), *Astyanax scabripinnis* coletado no rio Canta Galo também apresenta três tipos heterocromáticos muito semelhantes aos relatados no presente manuscrito. O primeiro tipo descrito para ambas as espécies ( $C^+$  centromérica, Figura 13) é diferente, já que em *Astyanax* sp. D estes blocos  $C^+$  são pouco aparentes e em menor número do que as marcas correspondentes obtidas por SOUZA MOREIRA-FILHO e GALETTI Jr. (op. cit.). Os outros dois tipos heterocromáticos se enquadram com a descrição feita para *A. scabripinnis*. Isto suporta a proposta de SAMPAIO (1988), indicando proximidade entre *Astyanax* sp. D e *A. scabripinnis*. Porém, apesar da proximidade relatada, os blocos heterocromáticos do tipo três não se apresentaram perfeitamente iguais nestas duas espécies. Elas possuem em comum somente o resultado para a banda C. A cromomicina, quando aplicada em *A. scabripinnis* marcou

apenas as RONS, entretanto ela foi utilizada com contracolorante Distamicina A (DA), o que pode alterar o resultado das marcações. Após tratamento com DAPI (fluorocromo AT-específico), *A. scabripinnis* demonstrou possuir blocos teloméricos DAPI<sup>-</sup>/C<sup>+</sup>, as quais seriam regiões pobres em AT, e conseqüentemente ricas em GC, como em *Astyanax* sp. D registrado neste trabalho. Após esta análise comparativa pode-se considerar que as correspondentes regiões para estes dois táxons são praticamente homeólogas, já que as duas apresentam a mesma localização e mesma composição de bases.

As diferenças na quantidade de heterocromatina entre homólogos registradas neste trabalho podem ser explicadas como sendo o resultado de crossing-over desigual, levando a um acréscimo ou decréscimo do número de repetições (SMITH, 1976). Este polimorfismo de regiões heterocromáticas geralmente é discreto em peixes (envolvendo apenas poucos pares cromossômicos)(MANTOVANI et al., 2000), podendo estes estar relacionados ao tamanho dos blocos (MARTINEZ et al., 1991) ou serem resultantes da associação entre regiões de heterocromatina e RONS polimórficas (HARTLEY, 1988; AMORES et al., 1993). Embora o polimorfismo de blocos seja pouco freqüente em peixes, ele se encontra registrado para *A. scabripinnis* (MANTOVANI et al., 2000; MAISTRO et al., 2000; entre outros) e agora também para *Astyanax* sp. D, sendo esta então mais uma similaridade entre estes táxons.

Como em *Astyanax* sp. C, as RONS de *Astyanax* sp. D se mostraram C<sup>+</sup> e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Entretanto as RONS não se mostraram marcadas pela *AluI* em *A. sp. D*, e desta maneira, comparando-se os cariótipos de Banda C e de *AluI* (Figura 17) torna-se possível identificar os cistrons ribossômicos como sendo aquelas marcas não centroméricas C<sup>+</sup>/*AluI*<sup>-</sup>.

A marcação dos grandes blocos teloméricos C<sup>+</sup> pela endonuclese *AluI* é uma característica comum em peixes (SWARÇA; CAETANO; DIAS, 1999), porém regiões AgNO<sub>3</sub><sup>+</sup>/*AluI*<sup>-</sup>/C<sup>+</sup> são consideradas exceções, e deste modo esta poderia ser um marcador citogenético para esta espécie.

Considerando a possível causa do polimorfismo heterocromático e de RONS duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a divergência encontrada:

- as diferenças heterocromáticas teriam surgido devido a uma mistura de vários estoques populacionais com diferentes padrões  $C^+$  que chegaram ao local de coleta através de diversos riachos e rios ou por ação antrópica, com introdução de diferentes populações de *Astyanax* sp. D neste mesmo local.
- a população possuiria apenas um estoque ancestral e o polimorfismo de regiões  $C^+$  teria se originado através de rearranjos cromossômicos, seguidos de perda ou ganho de heterocromatina.

Considerando a última hipótese, JOHN e LEWIS (1979), discutindo sobre o polimorfismo devido a inversões em várias populações naturais de *Drosophila*, sugeriram que ele seria adaptativo, porque a população pode responder geneticamente às mudanças espaciais e temporais de maneira mais eficiente do que seria possível se essas espécies fossem monomórficas.

Ainda refletindo sobre o hipótese de haver apenas um estoque ancestral, deve-se atentar ao fato de que os rearranjos não são generalizados, isto é, ocorrem apenas em uma pequena parcela da população. É muito difícil que estes ocorram em ambos os homólogos em um espaço de tempo relativamente pequeno a partir do momento em que o rearranjo foi introduzido na população. Os rearranjos estruturais são introduzidos nas populações naturais através de sistemas de cruzamento, os quais poderão originar uma descendência homozigota. Pode-se então levantar uma hipótese de que as inversões observadas em *A. sp. D* (Figura 14), as quais se apresentam em heterozigose e homozigose, estariam presentes na população há várias gerações.

Além disso, é ainda possível destacar o alto grau de polimorfismo nas bandas C em relação ao número de exemplares da amostra, ou seja, com apenas sete (7) indivíduos analisados foi possível identificar diversos padrões  $C^+$ .

Dois grupos de padrão de distribuição de RONS podem ser identificadas em peixes. Alguns grupos tem seus cistrons ribossômicos localizados em um simples par cromossômico (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALLETI Jr., 1984) enquanto outros têm demonstrado RONS distribuídas em muitos cromossomos (GALLETI Jr.; SILVA; CERMINARO, 1985; CESTARI; GALETTI, 1992; entre outros). Independentemente do padrão de distribuição, alguns grupos taxonômicos são extremamente conservativos com relação a estes padrões, enquanto que outros grupos apresentam uma grande variabilidade entre espécies “irmãs” (GALETTI, 1998). *Astyanax* pertence ao grupo no qual existe variação inter-específica e intra-específica. RONS múltiplas têm sido uma característica comum entre as diversas populações estudadas de *A. scabripinnis*, sendo que algumas possuem um largo número (10-15) de regiões marcadas pela prata (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993; SOUZA; MOREIRA-FILHO, 1995).

Os indivíduos analisados neste trabalho demonstraram ter um alto grau de polimorfismo tanto intra-individual, devido provavelmente a regulação genética (atividade) das RONS, quanto inter-individual, podendo estar relacionada com a localização das RONS desiguais para cada indivíduo estudado e/ou da própria função.

De acordo com HSU, SPIRITO e PARDUE (1975), os cariótipos com um único par de RONS poderiam ser considerados como ancestrais em relação a aqueles cujas RONS estão distribuídas em diversos cromossomos. Nesse sentido, grupos como a família Characidae, à qual pertence o gênero *Astyanax*, que possuem RONS múltiplas, seriam considerados derivados.

Dentre os *Astyanax* sp. D estudados, um indivíduo apresentou 75 cromossomos (Figura 10 e 18), representando um caso de triploidia natural nesta espécie. No gênero *Astyanax*, bem como na maioria dos peixes, a fertilização é externa, com o oócito terminando a segunda divisão meiótica no meio externo (na água), o que possibilitaria uma não disjunção das cromátides irmãs (meiose II), caso as condições ambientais sejam adversas, como por exemplo alteração de temperatura, produzindo assim 1 oócito com  $2n$  cromossomos (FAUAZ; VICENTE; MOREIRA-FILHO, 1994)

A indução da triploidia em híbridos heteroespecíficos têm sido usada para aumentar a viabilidade destes peixes (TSUKOMO; RIGOLINO, 1993). Análises eletroforéticas de híbridos resultantes do cruzamento de duas espécies de carpa demonstraram que os indivíduos triplóides possuem duas doses de um alelo materno para uma dose do alelo paterno (MAGEE; PHILLIP, 1982, apud TSUKOMO; RIGOLINO, 1993), suportando a hipótese de que os triplóides naturais surgem através da retenção do segundo corpúsculo polar no óvulo.

Através da observação do cariótipo do triplóide de *Astyanax* sp. D com bandas C (Figura 19), Cromomicina A<sub>3</sub> (Figura 20) e de *AluI* (Figura 21), e tendo em vista que através das inversões paracêntricas detectadas é possível visualizar que as trissomias cromossômicas apresentam dois cromossomos idênticos, indicando uma provável origem comum (materna), e um terceiro possivelmente de origem paterna, diferenciado dos dois outros cromossomos da trissomia. Neste caso isto poderia ter acontecido por retenção do segundo corpúsculo da fêmea.

A incidência de triploidia no gênero *Astyanax* pode ser devida à grande diversidade de ambientes que estes peixes ocupam, juntamente com a grande exposição a mudanças abruptas na temperatura, que podem facilitar a indução da triploidia natural por choque térmico, como citado por VALENTI, 1975. Assumindo que *Astyanax* sp. D possui reprodução contínua ao longo do ano, como *A. scabripinnis*, o indivíduo poliplóide pode ter sido originado durante a estação fria do ano, devido a um choque térmico natural.

A presença de cromossomos ST-A nas espécies da subfamília Tetragonopterinae é considerada uma exceção, e desta maneira considera-se o cariótipo ancestral como  $2n=50$  M-SM (PORTELLA, 1988). Pode-se supor, com base nos dados da literatura e do presente trabalho que *Astyanax* representa um gênero mais derivado dentro dos Tetragonopterinae.

Tal como *A. scabripinnis*, *Astyanax* sp. D estudado no presente trabalho também vive exclusivamente em cabeceiras de pequenos rios formando

pequenas populações isoladas (SAMPAIO, 1988), possibilitando a ocorrência de diferenciações cromossômicas e morfológicas entre populações.

Os presentes dados confirmam que *Astyanax* sp. D é uma espécie próxima do “complexo” *Astyanax scabripinnis*, e esta também se apresenta como mais um excelente material biológico para estudos evolutivos.

Comparando-se os resultados obtidos para as duas espécies estudadas torna-se evidente que elas são citogeneticamente distintas. Mesmo que através da coloração convencional não se consiga uma boa distinção entre *A.* sp. D e *A.* sp.C, estas diferenças ficam bastante claras com o bandamento C, com a aplicação da enzima de restrição *AluI* e com a Cromomicina A<sub>3</sub>.

*Astyanax* sp. C de Piraquara é monomórfico para banda C e RONS, no entanto os indivíduos de São José dos Pinhais mostram-se polimórficos para estas características. Estas variações poderiam ter aparecido e se fixado nesta última população a partir de migrações ou até de ação antrópica ao introduzir formas distintas daquelas que apresentam NORs e Bandas C simples.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCARMA, M. **Caracterização cromossômica de espécies de *Rhamdia* (Pisces, Pimelodidae) endêmicas da Bacia do Rio Iguaçu.** Maringá (PR), 1998. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá.

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cromossomos B em espécies do gênero *Rhamdia* (Pisces, Pimelodidae) endêmicas da Bacia do Rio Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA AOS PEIXES NEOTROPICAIS VII. **Resumos B.5.** 1998.

ABUIN, M; AMARO, R.; SANCHEZ, L. Improving *Salmo salar* karyotype: restriction enzyme and replication banding. **Cytobios**, v.78, p.143-152.

AGOSTINHO, A.A; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: EDUEM. 387p, 1997.

AMEMIYA, C.T.; GOLD, R. Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolos organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, v.1, p.226-231, 1986.

AMORES, A.; MARTINEZ, G.; REINA, J.; ALVAREZ, M.C. Karyotype, C-banding, and Ag-silver NOR analysis of *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes): intra-individual polymorphism involving heterocromatic regions. **Genome**, v.36, n.4, p.672-675, 1993.

AREFJEV, V.A. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia**, v.43, n.3/4, p.291-304, 1990a.

AREFJEV, V.A. (1990b). Problems of Karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. **Caryologia**, v.43, n.3/4, p.305-319, 1990b.

ARTONI, R.F; BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genética**, v.106, p.209-214, 1999.

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, 1998. p.205-275.

BARROS, N.M.T.; GAVASSO, E.; CENCI, M.A.; PAZZA, R. MARGARIDO, V.P. Descrição do cariótipo de *Astyanax* sp (Characidae, Tetragonopterinae) coletado no Rio Vorá- Bacia do Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA AOS PEIXES NEOTROPICAIS, VII. 1995, **Resumos**. A.14, 1995.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations of *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.1, n.2, p.103-102, 1978.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. **Poluição e Piscicultura**, São Paulo, 1972.

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)**. 3<sup>a</sup> ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1998.

CENCI, M.A.; GAVASSO, E.; BARROS, N.M.T; PAZZA, R.; MARGARIDO, V.P. Análise cromossômica de *Astyanax bimaculatus* (Characidae, tetragonopterinae), coletado na Bacia do Rio Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS VII. **Resumos**. B.19, 1998.

CESTARI, A.N. Método de estudo dos cromossomos de vertebrados. In: AZEVEDO, T.L.C. Exercícios Práticos de Genética. São Paulo: EDUSP, 1973. p.29-31.

CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos preliminares de peixes pertencentes à Bacia do Rio Iguaçu. In: ENCONTRO PARANAENSE DE GENÉTICA, III. Curitiba (PR). **Resumos** 3.1.1.9. 1996.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from de Paraná-Paraguai rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v.1, p.108-112, 1992.

DALABONA, G.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos preliminares em peixes do gênero *Astyanax* do Rio Iguaçu (PR). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41, 1995. Caxambu. **Resumos**. p.454, 1995.

DANIEL-SILVA, M. de F.Z. **Estudos Citogenéticos Comparativos em Quatro Espécies do Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. 176f. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

DENTON, T.E.; HOWELL, W.M.; BARRET, J.V. Human nucleolar organizer chromosomes associations. **Chromosoma**, v.55, p.81-84, 1976.

EGOZCUE, J. **Técnicas en citogenética**. Barcelona: Expaxs, 1971.

FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. An additional chromosome in two fish species. **Revista Brasileira de Genética**. v.7, n.1, p.109-118, 1984.

FALCÃO, J.N. **Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae)**. Ribeirão Preto (SP), 1988. 137f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

FAUAZ, G.; CESTARI, M.M.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos cariotípicos preliminares em *Astyanax* sp da Bacia do Rio Iguaçu (PR). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, III. 1990, Botucatu (SP). **Resumos**. p.17, 1990.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B cromossomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.2, p.157-163, 1994.

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**, v.44, p.161-166, 1991.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.72, n.4, p.297-353, 1981.

GALLETI Jr., P.M.; SILVA, E.B.; CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Braz. J. Genet.**, v.7, p.479-484, 1985./

GALLETI Jr., P.M. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v.65, p.53-56, 1998.

GALETTI JR., P.M.; RASCH, E.M. NOR variability in diploid and triploid forms of the amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A<sub>3</sub> staining. **Braz. J. Genet.**, v.16, p.927-938, 1993.

GALETTI JR., P. M.; MESTRINER, C. A.; MONACO, P. J.; RASCH, E. M. Post-zygotic modifications and intra- and interindividual nucleolar organizing

regions variations in fish: report of case involving *Leporinus friderici*. **Chrom. Res.**, v.3, p.285-290, 1995.

GODOY, M.P. **Rio Iguçu, Paraná, Brasil. Reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios.** Florianópolis, ELETROSUL/AMA, 1979. 33p.

GODOY, M.P. **Peixes do estado de Santa Catarina.** Florianópolis, UFSC/ELETROSUL/FURB, 1987. 572p.

GOODLAND, R. **Usina Hidrelétrica Foz do Areia: reconhecimento do impacto ambiental.** Curitiba, COPEL, 1975.

HARTLEY, S.E. Cytogenetic studies of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. **J. Fish. Biol.**, v.33, p.735-740, 1988.

HARTLEY, S. E. C, Q and restriction enzyme banding of the chromosomes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Artic charr (*Salvelinus alpinus*). **Hereditas**, v.114, p.253-261, 1991.

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

HOWELL, W.M. Selective staining of nucleolus organizer regions (RONs). In: **The Cell Nucleus.** Academic Press inc., 1982. p.89-142.

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

JOHN, B.; LEWIS, K.R. **Hierarquia cromossômica.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1979.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas.** São Carlos (SP), 1993. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

KANTEK, D.L.Z.; A. S. FENOCHIO; CESTARI, M.M. Estudo citogenético em duas populações de *Astyanax* sp C (Tetragonopterinae, Characidae), pertencente ao primeiro planalto do rio Iguaçu (PR). In: Congresso Nacional de Genética, 47, 2001. Águas de Lindóia, SP. **Resumos**, 2001.

LARA, M.C.S.; JULIO Jr., H.F. Polimorfismo cromossômico em populações de duas espécies de *Ancistrus* de diferentes bacias hidrográficas. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VII. **Resumos** R.13. 1998.

LEMOS, P.M.; CESTARI, M.M. Estudo citogenético em *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) do primeiro planalto do Rio Iguaçu. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, III. **Resumos** 139. 1999.

LEVAN, A.; FREGDA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p210-220, 1964.

MAISTRO, E.L. **Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes.** Botucatu (SP), 1996, 152p. Tese (Doutorado em Genética) - Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. R- and G-Band Patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Characiformes). **Genet. Mol. Biol.**, v.22, 1999.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genet. Mol. Biol.**, v.23, 2000.

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

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

MARTINEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C.; ARIAS, J.; AMARO, R.; SÁNCHEZ, R. Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. **Heredity**, v.66, p.9-17, 1991.

MAYR, B.; RÀB, P.; KALAT, M. Localization of NORs and countainstain-enhanced fluorescence in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). **Genetica**, v.67, p.51-56, 1985.

MAYR, B.; KALAT, M.; RÀB, P. Sequential countainstain-enhanced fluorescence chromosome banding in the fish *Anguilla anguilla* (Pisces, Percidae). **Caryologia**, v.43, p.277-281. 1990.

MDK/CENCO. **Usina Hidrelétrica de Segredo: Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Relatório de Impacto Ambiental**. Curitiba, 1987.

MEZZANOTE, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R.; FERRUCI, L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.36, p.562-566, 1983.

MEZZANOTE, R.; FERRUCI, L. Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. **Genética**, v.64, 123-128, 1984.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá Region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.1, p.55-61, 1998.

MOLINA, W.; SCHMID, M.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin and sex chromosomes in the neo tropical fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, v.94, p.141-149, 1998.

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

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALLETTI Jr., P.M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Can. J. Genetic. Cytol.**, v.26, n.5, p.564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O. **Analises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no "complexo" *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. São Carlos (SP), 1989. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.331-357, 1991.

MURAMOTO, J; OHNO, S.; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, v.24, p.59-66. 1968.

NELSON, S.J. **Fishes of the world**. 3<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons. 1994.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical Freshwater Fishes. **Braz. J. Gen.**, v.11, n.3, p.577-624. 1988.

PAGANELLI, H.H.; GALETTI, P.M.; MOREIRA-FILHO, O. Análise cariotípica nos gêneros *Probolodus* e *Astyanax* (Pisces, Characidae). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, I., 1986, São Carlos. **Resumos**. p.53, 1986.

PAGANELLI, H.H. **Diversidade Cromossômica do Gênero *Astyanax* com especial referência a *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Considerações Taxonomias e Evolutivas.** São Carlos, 1990. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic Cell Genetic**, v.63, p.128-130, 1993.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**, v.103, p.128-130, 1994.

PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. S. Heterocromatina Constitutiva. In: **Série Monografias nº7/Sociedade Brasileira de Genética**. Funpec Editora. 1997. p.185-225.

PORTELA, A.L.B.S., GALETTI JR, M., BERTOLLO, L.A.C. Considerations on the Chromosome Evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazil. J. Genet.**, v.11 n.2, p.307-316, 1988.

POST, A. Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süßwasser Teleosteen. **Zeitschrift fuer Zoologische Systematik und Evolutionforschung**, v.3, p.47-93, 1965.

QUIJADA, C.C.D.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos em *Cichlasoma facetum* e *Geophagus brasiliensis*, da bacia do Rio Iguaçu. ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, III. **Resumos** 144. 1999.

RÀB, P.; MAYR, B. Chromosome banding studies in european esocoid fishes: localization of nucleolar organizer regions in *Umbra krameri* and *Esox lucius*. **Copeia**, v.1987: 1062-1067, 1987.

ROBAINA, T.F.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos em em *Astyanax* sp B (Characidae) do riacho Cachoeira- Petrocix, São Mateus do Sul (PR). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. GENÉTIC AND MOLECULAR BIOLOGY, 44, 1998. **Resumos**. A.75, 1998.

ROCON-STAGE, E.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.16, n.3, p.601-615, 1993.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da Bacia do Rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna**. São Carlos (SP), 1988. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos.

SÀNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C. Analysis of the structure and variability of nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag and restriction endonuclease banding. **Cytogenetic Cell Genetic**, v.54, p.6-9, 1990.

SÀNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, P.; BOUZA, C.; VIÑAS, A. Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes. **Heredity**, v.66, p.241-249, 1991.

SCHEEL, J.J. Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Danmarks Akvarium**. Charlottenlund (Denmark). p22, 1973.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, v.87, p.327-344, 1982.

SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive Heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v.95, p.271-284, 1987.

SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse R fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, v.97, p.101-114, 1988.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet Cell Genet**, v.62, p.42-48, 1993.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today**, v.9, 1987.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A.A.M. **Catálogo de Peixes da Bacia do Rio Iguçu**. Curitiba: IAP/GTZ, 1994. 128p.

SOLA, L.; GALETTI JR, P.M.; MONACO, P.J.; RASCH, E.M. Citogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Additional nucleolar organizer region chromosomal clones of *Poecilia formosa* (Amazon molly) from Texas, with a survey of chromosomal clones detected in the Amazon molly. **Heredity**, v.78, p.612-619, 1997.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, v.60, p.1-11, 1995.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JUNIOR, P.M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Bras. J. Gen.**, v.19, n.3, p.405-410, 1996.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.**, v.74, p.304-306, 1972.

SWARÇA, A.C.; CAETANO, L.G.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization through chromosomal banding of *Pirirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brasil. **Caryologia**, v.52, p.31-35, 1999.

TSUKAMOTO, R.Y.; RIGOLINO, M.G. Aplicação da biotecnologia à aquicultura. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, X, 1993, USP, São Paulo, **Resumos**. P.314-333, 1993.

VALENTI, R.J. Induced polyploidy in *Tiplábia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. **J. Fish. Biol.**, v.7, p.519-628, 1975.

VASCON, S.A.; PILEGGI, N.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos citogenéticos em *Brycon lundii* (Pisces, Characidae). **Cienc. Cult.**, v.36, p.813, 1994.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes: Principles and Techniques**. 2 ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1995.

WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. Citogenética de pequenos peixes caracideos do grupo Cherodontinae. Cromossomos mitóticos de *Odontostilbe paranensis*, *O. claudiae* e *Holoshestes heterodon*. **Brazil J. Genet.**, v.17, n.3, p.122, 1994.

WEITZMAN, S.H.; FINK, W.L. Relationship of the neon tetras, a group of South American freshwater fish (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiforms. **Bull Mus.Comp. Zool**, v.150, p.339-395, 1983.