

**MISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PEIXES
CONTINENTAIS
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DAS ESPÉCIES AMEAÇADAS DE
EXTINÇÃO DA FAMÍLIA CHARACIDAE CONTEMPLADAS NO PAN
MOGI/PARDO/GRANDE.**

Izadora Ferreira Bittencourt

Orientadora: Dra. Maria Rita de Cáscia Barreto Netto

PIRASSUNUNGA

AGOSTO / 2013

RESUMO

A citogenética de peixes neotropicais disponibiliza informações precisas para a identificação de espécies, populações e indivíduos por meio das técnicas convencionais e de bandamento cromossômico. O conhecimento da diversidade genética de regiões geográficas suscetíveis a alterações ambientais é primordial para ações assertivas para sua conservação. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente espécies da família Characidae a partir das técnicas de obtenção dos cromossomos *air drying* e cultura de linfócitos, além de evidenciar a viabilidade da técnica de cultura de linfócitos para obtenção de metáfases em peixes ameaçados de extinção. Foi factível, principalmente a partir da cultura de linfócitos determinar em *Brycon orbignyanus* o número diploide $2n=50$ (24m, 22sm, 4st), resultando no número fundamental (NF) igual a 100; a impregnação por nitrato de prata evidenciou duas RONS no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos; o padrão de bandamento-C com tratamento de coloração DAPI demonstrou dois blocos de heterocromatina na região análoga ao mesmo par e a aplicação da técnica de hibridação *in situ* utilizando sonda 18S revelou em duas marcações largas e marcantes na região terminal no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, já com a sonda 5S foi observado marcações na região pericentromérica do braço longo de um pequeno par de cromossomos metacêntricos. *Piaractus mesopotamicus* apresentou $2n=54$ (20m, 34sm) e NF=108 e a presença de três regiões organizadoras de nucléolo (RONS) em diferentes cromossomos; no bandamento-C os blocos heterocromáticos marcadores foram observados em dois pares e com a hibridação *in situ* com a sonda 18S, os sítios de DNAr estão localizados na região terminal de dois pares de cromossomos submetacêntricos e com a sonda 5S foram evidenciadas marcações na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos, e num segundo par metacêntrico na região telomérica. Os dados cariotípicos de *B. orbignyanus* e de *P. mesopotamicus* obtidos são coincidentes com os descritos na literatura. Tendo em vista a diversidade de marcadores cromossômicos encontrada nos peixes ósseos, faz-se necessário ampliar amostragens numéricas e geográficas para indicar qualquer alteração que implique em práticas conservacionistas distintas, auxiliando na gestão idônea de proteção à ictiofauna ameaçada de extinção. A partir dos resultados equivalentes entre as duas técnicas citogenéticas utilizadas pode-se concluir que a técnica de cultura de linfócitos é necessária e vantajosa principalmente por não haver a morte dos espécimes, permitindo seu aproveitamento em outras pesquisas. Esse estudo é parte integrante do projeto de Implementação do PAN para as Espécies de Peixes Ameaçadas nos rios Mogi Guaçu, Pardo e Grande.

ABSTRACT

Cytogenetics of neotropical fish provides reliable information about identification of species, populations and individuals based on conventional and chromosomal banding techniques. The assessment of genetic diversity in geographic areas susceptible to environmental alterations is essential to conservation. Therefore, the goal of this study was characterizing cytogenetically species of family Characidae using air-drying and lymphocyte culture to obtain chromosomes, besides demonstrating the lymphocyte culture is viable to chromosomal studies in threatened fish. It was feasible, particularly using lymphocyte culture, to determine a diploid number of $2n=50$ (24m, 22sm, 4st) for *Brycon orbignyanus*, resulting in a fundamental number (FN) of 100; silver nitrate staining revealed two nucleolar organizer regions (NORs) on long arms of a submetacentric pair; C-banding pattern using DAPI staining showed two heterochromatin blocks coincident to NORs and *in situ* hybridization using 18S rDNA probe demonstrated two large and conspicuous signals at terminal region of a submetacentric pair whereas 5S rDNA probe identified signals at pericentromeric region on long arms of a small metacentric pair. *Piaractus mesopotamicus* presented $2n=54$ (20m, 34sm) and FN=108 with three NORs in distinct chromosomes. after C-banding, marker heterochromatic blocks were observed in two pairs while *in situ* hybridization with 18S rDNA probe revealed signals at terminal region of two submetacentric pairs while 5S rDNA probe evidenced signals at pericentromeric region of a metacentric pair, and at telomeric region on a second metacentric pair. The karyotype data in *B. orbignyanus* and *P. mesopotamicus* herein obtained are in agreement with previous reports. Taking into account the array of chromosomal markers available in bony fishes, it is necessary to increase both the number and sites of samplings to verify any changes that justify distinctive conservation practices, thus assisting to a proper protection management of threatened ichthyofauna. Based on similar results observed by both cytogenetic methods, we conclude that lymphocyte culture should be performed once it has the main advantage of disregarding euthanasia of specimens to be used in further research. This survey is a part of the Projeto: PAN for Threatened Fish Species of Mogi Guaçu, Pardo and Grande Rivers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i> - Valenciennes, 1849) Fonte: Arquivo Pessoal.....	14
Figura 2: Exemplar de Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> - Holmberg, 1887).....	17
Figura 3: CEPTA - ICMBio - Pirassununga/SP fonte: Arquivo pessoal	27
Figura 4: Área de atuação do PAN Mogi/Pardo/ Grande.....	28
Figura 5: Pontos de coleta na área de abrangência do PAN Mogi-Guaçu/Pardo/Grande.....	29
Figura 6: Fotos dos Pontos de Coleta: (A) CEPTA/ICMBio; (B) rio das Pedras-remanso; (C) rio Grande; (D) rio das Pedras-corredeira; (E) Lagoa Marginal; (F) rio Pardo.....	30
Figura 7: Suspensão celular de <i>Brycon orbignyanus</i> . Fonte: Arquivo Pessoal.....	32
Figura 8: Solução final a partir de células renais da espécie <i>Brycon orbignyanus</i> . Fonte: Arquivo Pessoal.....	33
Figura 9: Seringa contendo o material já decantado para retirada da camada de linfócitos. Fonte: Arquivo Pessoal.	35
Figura 10: Resumo da técnica de cultura de linfócitos. Fonte: Arquivo Pessoal.....	36
Figura 11: Banho-maria e o uso de Nitrato de Prata para identificação das RONS.	37
Figura 12: Cariótipo da <i>Brycon orbignyanus</i> , n°01 - CEPTA.	42
Figura 13: (a) RONS com coloração GIEMSA de <i>Brycon orbignyanus</i> ; (b) Distribuição do padrão de heterocromatina constitutiva em Piracanjuba (<i>B. orbignyanus</i>) após coloração com DAPI.....	42
Figura 14: Técnica FISH – Sonda 18S e 5S de <i>Brycon orbignyanus</i> , n°01 - CEPTA.....	43
Figura 15: Cariótipo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> , n°17 - CEPTA.....	45
Figura 16: (a) RONS com coloração GIEMSA de <i>Piaractus mesopotamicus</i> ; (b) Distribuição do padrão de heterocromatina constitutiva em Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) após coloração com DAPI.	45
Figura 17: Técnica FISH – Sonda 18S e 5S de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de esforço de coleta dos caracídeos	28
Tabela 2: Comparação de resultados entre as técnicas <i>Air drying</i> e Cultura de linfócitos em <i>Brycon orbignyana</i>	44
Tabela 3: Dados cariotípicos de espécies de peixes ameaçadas de extinção relacionadas ao PAN Mogi-Guaçu/Pardo/Grande.	51
Tabela 4: Exemplos de estudos citogenéticos envolvendo espécies de peixes ameaçados de extinção desenvolvidos a partir de técnicas citogenéticas no período de 2003 a 2013.....	53
Tabela 5: Número de metáfases encontrados nas lâminas dos peixes estudados.....	55

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	5
SUMÁRIO	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Planos de Ação Nacionais	7
1.2. Características da família Characidae	12
1.3. Características da Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i> - Valenciennes, 1849).....	12
1.4. Características do Pacu-caranha (<i>Piaractus mesopotamicus</i> - Holmberg, 1887)	14
1.5. A Genética da Conservação	17
1.6. A aplicabilidade da citogenética	19
1.7. Objetivo.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. MATERIAL	26
2.2. ÁREA DE ESTUDO	27
2.3. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS.....	30
2.3.1. Estimulação de metáfases	31
2.3.2. Técnica de air drying: estudos in vivo.....	31
2.3.3. Técnica de cultura de linfócitos.....	34
2.3.5. Bandamento C	37
2.3.6. Marcação da sonda (reação de nick translation).....	38
2.3.7. FISH com sondas 5S e 18S.....	39
Pré-hibridação (Tratamento com RNase).....	39
2.4. Processamento das imagens citogenéticas	39
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO	47
5. ANEXOS	55
6. AGRADECIMENTOS	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Planos de Ação Nacionais

A introdução de peixes exóticos e a destruição de habitat fazem parte dos principais fatores na diminuição da diversidade na região Neotropical, fazendo com que mesmo uma família de peixes abundante antigamente, hoje corra o risco de desaparecer sem ao menos ter sido estudada sua biologia e seu valor econômico (LATINI & PETRERE JR., 2004).

Em relação à introdução de espécies, ainda hoje existem erros no conceito de espécie exótica e alóctone, como pode ser observado em alguns sites com conteúdo ambiental (ambiente Brasil, 2013; fauna nativa, 2013), que fazem referência à espécie alóctone como sinônimo de exótica. Langeani *et al.* (2007) descrevem o significado correto desses dois conceitos tão pertinentes no contexto ambiental. Quanto à origem da fauna, as espécies podem ser classificadas em autóctones, as nativas; alóctones, aquelas descritas de outras bacias e introduzidas; ou espécies exóticas, aquelas provenientes de outros continentes. Aplicando esses conceitos, os autores determinaram que na bacia do Alto Paraná, depois da construção da barragem de Itaipu foram encontradas 236/76,1% espécies autóctones, 67/21,6% alóctones e 07/2,3% exóticas. Das espécies alóctones encontradas pelos autores cinco espécies foram introduzidas pela pesca esportiva ou como isca do mesmo (LANGEANI *et al.*, 2007). O uso de peixes vivos para a pesca esportiva pode introduzir não apenas espécies de outras bacias, mas também indivíduos de populações diferenciadas, que dependendo da quantidade e variabilidade genética desta, podem desestabilizar ambientalmente a população original.

Outra ameaça a ictiofauna nativa é a degradação do habitat fluvial devido à redução da mata ciliar pela implementação de hidrelétricas faz com que determinadas espécies como o

jaú e a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) sofram uma severa redução de seus estoques, sendo hoje em dia espécies consideradas ameaçadas de extinção em Minas Gerais, segundo os critérios da IUCN (MACHADO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2007).

Ainda como exemplo de destruição de habitat existe dezenas de represamentos para construção de hidrelétricas que modificam o habitat fluvial e de acordo com dados publicados pela IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (2008) que afetam principalmente seis espécies que habitam a calha de grandes rios, como a do rio Paraná e seus tributários Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema. Uma delas (*Crenicichla jupiaiensis*) é um pequeno peixe reofílico da região de Urubupungá (divisa dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul) e que, após a construção das usinas hidrelétricas de Jupia e Ilha Solteira, não voltou a ser reencontrada; o Ituí (*Sternachorhynchus britskii*) encontrado nos trechos mais profundos de grandes rios presumivelmente ameaçados devido à intensa modificação da calha dos rios da bacia do Paraná; alguns caracídeos da região, como a pirapitinga (*B. nattereri*); a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o pacu-prata (*Myleus tiete*) estão na lista oficial de espécies ameaçadas por sofrerem esse tipo de impacto antrópico, porque são peixes de médio à grande porte que realizam migrações reprodutivas (piracema).

Para tentar remodelar essa situação, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) realiza Planos de Ação Nacionais (PAN) que são um importante instrumento de gestão, pois reúnem um conjunto de medidas, articuladas e programadas para serem cumpridas por vários setores sociedade em prazos pré-estabelecidos, com o objetivo de proteger determinada espécie da fauna ou flora ou um ambiente de relevante interesse ecológico. Em relação à proteção dos caracídeos citados acima e outras espécies da ictiofauna brasileira foram elaborados até o momento quatro planos de ação (www.icmbio.gov.br, 2013) que propõem aproximadamente 30 metas e 180 ações. Este projeto é parte integrante do Plano

de Ação Nacional para a Conservação das Espécies Ameaçadas da Fauna Aquática do Ecossistema Mogi, Pardo e Grande – PAN Mogi-Pardo-Grande.

De acordo com o Sumário do PAN Mogi, publicado no *site* do ICMBio, as espécies-alvo são:

Pirapitinga-do-Paraná *Brycon nattereri* (Günther, 1864)*
Piracanjuba, Bracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850)*
Pacu, Pacu-caranha, Caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)*
Lambarizinho-do-rabo-vermelho *Astyanax trierythropterus* (Godoy, 1970)*
Surubim *Steindachneridion scriptum* (Miranda-Ribeiro, 1918)
Jaú *Zungaro jahu* (Ihering, 1898)
Guarú-listrado-do-Cerrrado, Barrigudinho *Phallotorynus jucundus* (Ihering, 1930)
Pacu-prata *Myleus tiete* (Eigenmann & Norris, 1900)*
Curimatá, Curimatá-de-lagoa *Prochilodus vimboides* (Kner, 1859)
Rebeca *Bunocephalus larai* (Ihering, 1930)
Bagrinho-de-Emas *Chasmocranus brachynema* (Gomes & Schubart, 1958)
Cascudo-peito-duro-do-Pardo *Neoplecostomus paranensis* (Langeani, 1990)
Jaú-sapo *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1840)
Ituí-corcunda *Sternarchella curvioperculata* (Godoy, 1968)

* Espécies incluídas no plano de trabalho “Caracterização Citogenética das espécies ameaçadas de extinção da família Characidae contempladas no PAN Mogi-Pardo-Grande” PIBIC/ICMBio.

A área de atuação do PAN abrange os rios Mogi-Guaçu, Pardo e parte do Grande ocupando aproximadamente uma área de 37.379,09 Km² localizada nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Na época da implementação das primeiras hidrelétricas no Brasil existiam poucos estudos sobre a ictiofauna brasileira, entretanto atualmente existem vários levantamentos principalmente para as bacias hidrográficas da região Sudeste (OYAKAWA & MENEZES, 2011; MESCHIATTI & ARCIFA, 2009; APONE *et al.*, 2008; LANGEANI *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2004; CEMIG, 2000;).

Um dos trabalhos mais recentes publicado por Oyakawa & Menezes, em 2011, foi o *Checklist* dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. Os autores destacaram que o estado de São Paulo pode ser dividido em quatro bacias hidrográficas principais: Alto Paraná, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e um conjunto de pequenas drenagens costeiras que

desembocam diretamente no oceano Atlântico a partir da variação de vegetação, solos e geologia. Na bacia do Alto Paraná, compreendendo o Rio Paraná e alguns de seus maiores afluentes (Tietê, Paranapanema e Grande), 70 a 80% da ictiofauna é composta por espécies de pequeno porte em pequenos riachos, incluindo as de cabeceira, cujas muitas são endêmicas e o restante, as de grande porte, mantém a pesca comercial e a de subsistência local.

O sistema do Alto Rio Paraná representa a segunda maior drenagem hidrográfica na América do Sul, com 3,2 milhões de km², incluindo os sistemas dos Rios Prata, Uruguai, Paraná e Paraguai (LOWE-McCONNELL, 1987 *apud* CASTRO *et al.*, 2004), cujos pertencem à região ictiofaunística do Paraná (GÉRY, 1969 *apud* CASTRO *et al.*, 2004). Esse sistema possui uma área de drenagem de 143.000 km² sendo 86.500 km² (60,7 %) em território mineiro.

O Alto Paraná abriga 310 espécies de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias, com 80% do seu total distribuídos em Siluriformes e Characiformes, compondo os grupos dominantes na maior parte dos ambientes lóticos do Alto Paraná (LANGEANI *et al.*, 2007).

Alves *et al.* (2007) também observa esta predominância, visto que seus resultados demonstraram a presença de 63 espécies da ordem Characiformes (47%) e 43 espécies de Siluriformes (32%) em relação ao número total de espécies encontradas na bacia hidrográfica do Alto Paraná. Lowe-McConnell (1987) *apud* Castro *et al.* (2004) descreveu essa situação como um padrão geral encontrado nos rios da América do Sul.

A Instrução Normativa N^o 05/04 e suas alterações (Instrução Normativa N^o 52/05) listam 135 espécies ameaçadas de peixes de água doce da classe Actinopterygii, e outras sete na categoria de Sobreexplotadas ou Ameaçadas de Sobreexplotação. A família Rivulidae com 52 espécies, seguida pela família Characidae com 32 espécies, Trichomycteridae (10 espécies), Loricariidae (09 espécies), Heptapteridae (06 espécies), Pimelodidae (05 espécies),

Cichlidae (05 espécies), Crenuchidae (03 espécies), Poeciliidae (03 espécies), Callichthyidae (02 espécies), Anostomidae (02 espécies), Doradidae, Batrachoididae, Apterodontidae, Sternopygidae e família *incerta sedis* (cada uma com uma espécie).

A bacia do rio Paraná possui um total de 29 espécies de peixes ameaçadas de extinção de acordo com Rosa & Lima, autores do Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção, publicado em 2008.

Dentro do escopo da área de atuação do PAN Mogi/Pardo/Grande, Castro *et al.* (2004) publicou um levantamento da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, onde foram coletados 3.070 exemplares, distribuídos em seis ordens, 17 famílias, 44 gêneros e 64 espécies. A proporção encontrada foi de 50% para a ordem Characiformes, 26,5% para Siluriformes, 11% para Perciformes, 6% para Gymnotiformes, 5% para Cyprinodontiformes e 1,5% para Synbranchiformes. As espécies mais abundantes foram *Astyanax altiparanae* (17,4%) e *Hypostomus ancistroides* (9%).

O rio Mogi-Guaçu está inserido na segunda maior bacia hidrográfica da América do Sul, o sistema Paraná-Paraguai, na bacia do alto Paraná (APONE *et al.*, 2008). O levantamento da ictiofauna na bacia mogiana pode ser encontrado em diversos trabalhos como os de Schubart (1962), Britski (1972) e Godoy (1975). Schubart (1962) apresentou uma lista com 97 espécies que podiam ser encontradas no rio Mogi-Guaçu.

Mais recentemente, Apone *et al.* (2008) realizaram um levantamento da ictiofauna do rio Quilombo, afluente do rio Mogi-Guaçu, a partir da coleta de 2.982 exemplares e determinaram a ocorrência de seis ordens, 19 famílias, 52 gêneros e 68 espécies, sendo Characiformes com 57,3% das espécies e Siluriformes com 30,9% somando 88,2% do total de espécies. Perciformes (4,5%), Gymnotiformes (2,9%), Cyprinodontiformes (2,9%) e Synbranchiformes (1,5%) somaram 11,8%.

Atualmente nas águas doces neotropicais podem ser encontradas 4.475 espécies válidas de peixes e cerca de 1.550 espécies ainda não descritas, totalizando 6.025 espécies nestes (REIS *et al.*, 2003). Destas, 2.587 espécies pode ser encontrada no Brasil, isso ocorre devido à grande biodiversidade resultante da variação climática e geomorfológica, segundo Buckup *et al.* (2007). Adicionalmente, estimativas relatam que possam existir 8.000 espécies de peixes neotropicais (SHIBATTA & CHEIDA, 2003; SCHAEFER, 1998).

Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Cichlídídeos são os grupos dominantes nessa biodiversidade neotropical (LUNDBERG *et al.*, 2000).

1.2. Características da família Characidae

A ordem Characiformes, que inclui a família Characidae, compreende mais de 776 espécies distribuídas em 152 gêneros, sendo uma das maiores e mais complexas famílias dessa ordem (FROESE & PAULY, 2005).

A família Characidae abriga espécies comumente conhecidas como lambaris, dourados, pacus, matrinhãs, peixe-cachorro, entre outros (BRITSKY *et al.*, 1988). Seus representantes possuem hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e, com isto, exploram diversos habitats (PERES, 2005).

1.3. Características da Piracanjuba (*Brycon orbignyanus* - Valenciennes, 1849)

Agostinho *et al.* (2008) descrevem o gênero *Brycon* como grandes migradores e a lista possui seis espécies desse gênero, incluindo a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), considerada em perigo de extinção de acordo com a classificação da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN).

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), foi classificada taxonomicamente por Britski *et al.* (1988) na subfamília Bryconinae, família Characidae da

ordem Characiformes, com o gênero constante, *Brycon*. Porém, recentemente Oliveira *et al.* (2011) descreveu esse gênero não mais como um gênero, mas como uma família chamada de Bryconidae com duas subfamílias, a Salmininae e Bryconinae. Redescreveu o gênero *Brycon*, elevando-o à categoria de família, denominada Bryconidae com duas subfamílias, a Salmininae e Bryconinae, porém nessa classificação há vários táxons incertos e sua classificação não está totalmente elucidada, por esse motivo foi adotado no presente trabalho a classificação mais antiga.

Sua morfologia descrita por Godoy (1975) consiste num corpo alongado, com duas fontanelas na cabeça, com escamas parecidas tanto embaixo quanto em cima da linha lateral, seu formato é fusiforme devido seu ventre arredondado, sua mandíbula e maxilar apresentam dentes tricúspides externos e internos além de quantitativos branquiespinhos de raios médios na cauda que formam uma ponta marginal. Revelam maturação sexual em machos aos 20,0 cm de comprimento e as fêmeas perto dos 25,0 cm, mas normalmente mais facilmente identificado pela aspereza na nadadeira anal nos machos (MURGAS *et al.*, 2009).

Sua distribuição geográfica está entre as bacias dos rios Paraná e Uruguai, em São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, tendo relatos de sua ocorrência no Paraguai, Uruguai e Argentina (BRESSAN *et al.*, 2009), e vem sendo ameaçada pela destruição de florestas ciliares, introdução de espécies, poluição e represamentos dos rios (AGOSTINHO *et al.*, 2008).

Margarido & Galetti Jr (1996) descreveram a espécie *Brycon orbignyanus* com um número diploide igual a 50 cromossomos, divididos em 12 pares metacêntricos, 11 pares submetacêntricos e 2 subtelocêntricos, com um número fundamental igual a 100.

Estudos cromossômicos anteriores sobre espécies de *Brycon* de várias bacias hidrográficas revelaram significativa estabilidade cariotípica, caracterizado pelo mesmo

número cromossômico ($2n = 50$) e grande semelhança na estrutura dos cromossomos entre as espécies (GALETTI *et al.*, 1999).

Segundo Galetti *et al.* (2001) o gênero *Brycon* é encontrado por todo o sistema hidrográfico brasileiro e representado por peixes importantes para a preservação, apresentando uma região altamente conservada de 95% entre as espécies do gênero *Brycon*, a qual corresponde ao gene RNAr 5S, já as poucas diferenças observadas podem estar relacionadas com substituições de bases, com o resultado de incorporação errada de nucleotídeos pela *Taq* Polimerase, bem como a concentração de dNTP e $MgCl^2$ utilizado nas reações de amplificação podem levar a uma frequência acumulada de erros de cerca de 0,25% após 30 ciclos de PCR (SAIKI *et al.* 1988).

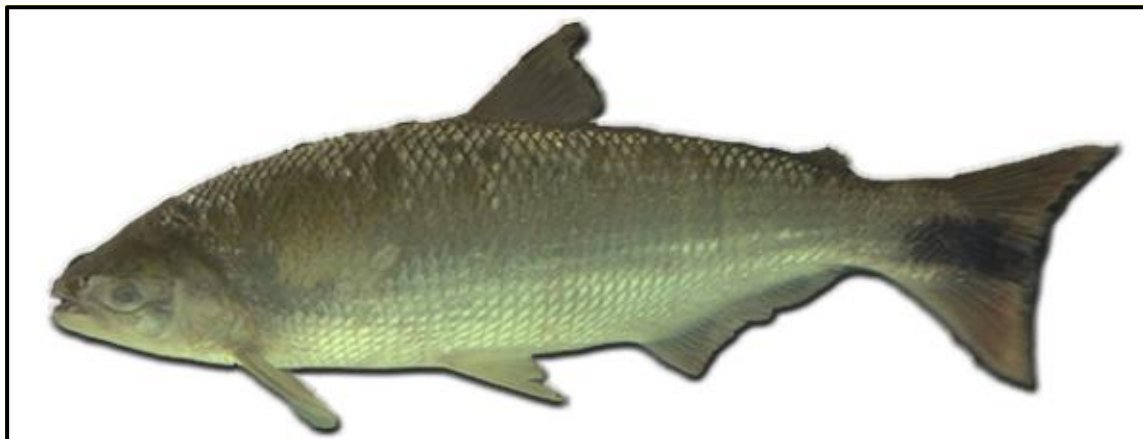


Figura 1: Exemplar de Piracanjuba (*Brycon orbignyianus* - Valenciennes, 1849) Fonte: Arquivo Pessoal.

1.4. Características do Pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887)

O gênero *Piaractus* inclui duas espécies, o Pacu (*P. mesopotamicus*) na Bacia do Paraná-Paraguai e a Pirapitinga (*P. brachipomus*) presente no Orinoco-Amazonas (CALCAGNOTTO, 1998).

O nome popular dessa espécie pode ser pacu, pacu-caranha, caranha, pacu-guaçu. Identificada em 1887 por Holmberg como *Piaractus mesopotamicus* (BRITSKI *et al.*, 2007),

tendo ampla distribuição na bacia do Paraná e do Prata (RESENDE, 2003), caracteriza-se como um serrasalmídeo de grande importância comercial (SEVERI *et al.*, 1999).

O pacu é um peixe de ambientes lóticos e semi-lóticos (AGOSTINHO *et al.*, 2004) com maturidade sexual de três anos (FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984), medindo aproximadamente 34 cm do comprimento total e só desova após longa distância de migração percorrida (VAZZOLER *et al.*, 1997), o que geralmente acontece em novembro (FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984).

Apresenta um grande potencial para a piscicultura nacional sendo considerada como uma das espécies de grande valor comercial (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985; CALCAGNOTO, 1998; JOMORI *et al.*, 2003; RESENDE, 2003; PEIXER & PETRERE, 2007), a primeira espécie em captura (CATELLA *et al.*, 1996; RESENDE, 2003) e piscicultura internacional (PULLELA, 1997 apud SUGANUMA, 2008), muito utilizado em programas de aquicultura, juntamente com o tambaqui e seus híbridos (SAINT-PAUL, 1985). Sua morfologia é identificada como um corpo robusto e ovalado, com ventre amarelado e dorso cinza escuro (BRITSKI *et al.*, 2007) (figura 2). Sua dieta é em sua maioria vegetariana podendo se alimentar de alguns insetos (HAHN *et al.*, 2004), possui uma dentição específica para quebrar e esmagar frutos e sementes, com formatos molariformes grandes multicuspidados (RESENDE *et al.*, 1998).

Seus estoques estão diminuindo nas últimas décadas devido principalmente à sobrepesca (RESENDE, 2003) e as grandes alterações em seu habitat (SMITH *et al.*, 2003). Devido a sua rusticidade, com fácil adaptação ao meio e a alimentação artificial, o seu desenvolvimento é rápido pelo manejo facilitado (CARNEIRO *et al.*, 1995).

Com relação a caracterização genética, essa espécie apresenta um número diplóide de $2n=54$, com dez pares de metacêntricos e dezessete pares submetacêntricos (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1988). Segundo Oliveira *et al.* (2004) essa espécie apresenta RONS na região

telomérica no braço longo de três cromossomos do tipo submetacêntrico; a presença de blocos heterocromáticos localizados na posição pericentromérica em vários pares cromossômicos, sendo o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva com dois pares marcadores, muito úteis à aplicação em projetos de Piscicultura. Daniel-Silva (2001) verificou a presença de até 5 RONS em *P. mesopotamicus* em exemplares também provenientes do CEPTA, porém segundo BARONI (2005) animais da mesma origem exibiu três RONS ativas, presentes na região telomérica do par cromossômico metacêntrico n° 6 e um par submetacêntrico n° 22. O padrão de banda-C marcou os dois pares cromossômicos característicos da espécie com um grande bloco pericentromérico no par n° 5, e o par n° 6, com um bloco intersticial no braço curto, um bloco centromérico e ainda, um bloco terminal no braço longo. A autora identificou também quatro sinais de hibridação 5S, presentes na porção proximal do braço curto em um par cromossômico submetacêntrico e na região proximal do braço longo em um par cromossômico metacêntrico.

Em relação às marcações 18S foi identificada uma banda proximal no braço curto de um cromossomo submetacêntrico, segundo DANIEL-SILVA (2001) *apud* BARONI (2005), e um na região telomérica de outro par de cromossomos.

Zamparetti (1996) estudou quatro populações de Pacu oriundas de estoques selvagens, utilizando marcadores citogenéticos (coloração convencional, bandamento C e RON, biometria cromossômica) e moleculares verificando não haver diferenças nas populações. Porém no bandamento C, alguns cromossomos apresentaram variações nas marcações dos blocos de heterocromatina constitutiva, indicando uma hipótese para caracterização populacional com base nesta característica. Já nas análises moleculares com o uso da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) com 160 *primers*, o autor não observou marcador populacional discriminativo entre as quatro populações (CALCAGNOTTO *et al.*, 2001).



Figura 2: Exemplar de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887).

1.5. A Genética da Conservação

Geralmente, o termo biodiversidade é tratado como um sinônimo para o termo riqueza de espécies, porém ele engloba um conceito mais amplo, abrangendo desde a variedade de comunidades até a variação genética (BEGON *et al.*, 2006). A diversidade genética constitui o cerne da origem da biodiversidade, uma vez que ela representa o material bruto para a seleção natural e é fundamental para a adaptação e a especiação. Seguindo essa lógica, o declínio na diversidade genética reduz diretamente o poder adaptativo das populações (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Nesse cenário, surge a chamada genética da conservação que tem como objetivos principais (ALLENDORF & LUIKART, 2007; FRANKHAM *et al.*, 2008): usar ferramentas genéticas para conservar a biodiversidade; analisar os efeitos da redução do tamanho da população, fragmentação e mudança no ambiente na adaptação; e garantir que as unidades evolutivas sejam preservadas.

A análise de informações genéticas pode contribuir para os esforços de conservação de várias maneiras. Avaliações filogenéticas moleculares podem identificar as linhagens mais antigas entre os organismos, que contêm uma fração desproporcionalmente alta da diversidade genética global devido à sua idade e singularidade. Linhagens antigas nem sempre são óbvias com base em exames morfológicos, como demonstrado no caso do peixe do gênero *Albula* (WHITEHEAD, 1986; SHAKLEE & TAMARU, 1981; PFEILER *et al.*, 2006; HIDAKA *et al.*, 2008). O tratamento de várias espécies como uma única espécie é uma premissa fundamentalmente falha para o manejo da ictiofauna, e podem colocar as espécies menos abundantes em risco. Para atender o objetivo de conservar a biodiversidade, é necessário discriminar as linhagens evolutivas fundamentais em todos os níveis taxonômicos (HELFMAN *et al.*, 2009).

A segunda maneira que a genética pode suportar os objetivos de conservação está na definição das populações, que são as unidades fundamentais da gestão da fauna nativa. Se duas populações têm frequências alélicas significativamente diferentes, elas deverão ser demograficamente independentes, o que significa que eles têm diferenças nos parâmetros demográficos, tais como a estrutura etária, a fecundidade, sobrevivência, taxa de crescimento e razão sexual. No entanto, para os gestores de fauna a preocupação mais pragmática é se uma população isolada está esgotada e não haverá reposição do pool gênico natural pela dispersão de outras populações. Populações isoladas devem se recuperar de alterações naturais e de origem humana sem entrada significativa de indivíduos de outros lugares. Se a população se extingui, o habitat pode, eventualmente, ser recolonizado por migrantes raros, mas estes indivíduos colonizadores muitas vezes não serão suficientes para repor as populações ao longo do tempo, configurando uma situação preocupante para os gestores de fauna.

Se um grupo de peixes de uma parte do rio é significativamente diferente de outros lugares em termos de frequências alélicas e estatísticas F, esta população geneticamente

definida pode ser considerada como um estoque independente. No entanto, o inverso não é sempre verdadeiro. Se os peixes em duas regiões de um rio não são significativamente diferentes em frequências alélicas, então eles ainda podem necessitar de ações isoladas. Leva apenas algumas gerações de migrantes para homogeneizar geneticamente populações reprodutoras (ver MILLS & ALLENDORF, 1996).

1.6. A aplicabilidade da citogenética

A citogenética de peixes neotropicais oferece informações cruciais sobre os arranjos cromossômicos para auxiliar na identificação de espécies através da análise citotaxonômica, nas diferenças populacionais por meio de marcadores cromossômicos identificados por todas as técnicas citogenéticas disponíveis atualmente, na descrição de sistemas sexuais simples e múltiplos com indicação dos mecanismos de formação desses eventos evolutivos, entre outros (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991a; CENTOFANTE *et al.*, 2003).

A seguir a descrição de pelo menos um exemplo de cada aplicação prática dos dados citogenéticos obtidos nos laboratórios de ictiogenética.

Bellafronte *et al.* (2005) utilizou estudos morfológicos e citogenéticos em *Parodon nasus* e *Parodon tortuosus*, peixes de água doce com suposta sinonímia entre eles. O número diplóide observado foi $2n = 54$ (48M/SM e 6ST) em ambas as espécies, sem diferença sexual. A confirmação da sinonímia se deu a partir da localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e de cístrons de RNAr 5S, que foram semelhantes em ambas, corroborando os estudos taxonômicos que indicavam que *P. tortuosus* era sinônimo de *P. nasus*.

Os estudos citogenéticos de diferentes autores permitiram determinar que a espécie *Astyanax altiparanae* apresenta $2n=50$ cromossomos (Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2006; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2005), porém foi

descrito diferenciações populacionais a partir do número e localização das RONS (Pacheco *et al.*, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2006). Outra diferença cariotípica foi encontrada por Hashimoto *et al.* (2008) que descreveu a primeira ocorrência de cromossomos B (cromossomo supranumerário que não se combina com os cromossomos do complemento A e possuem seu próprio caminho evolutivo) numa determinada população natural de *A. altiparanae* coletada na região da Bacia do Rio Tietê, onde 2 espécimes apresentaram $2n=51$, sendo que o cromossomo extra foi caracterizado como um cromossomo pequeno. Os autores sugeriram a hipótese de que a presença do cromossomo extra é devido a pequenos rearranjos cromossômicos, principalmente pericêntricos caracterizando populações distintas.

Porto-Foresti *et al.* (2004) examinou as características e os padrões de herança das regiões organizadoras de nucléolo (RONS), sob condições controladas de acasalamento da Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo que a análise citogenética desses indivíduos mostrou que as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) estavam localizadas na posição subterminal no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, ocorrendo como um único segmento cromossômico (fenótipo N1) ou como dois segmentos cromossômicos separados por um segmento curto eucromático (fenótipo N2). Primeiramente foram analisados 88 indivíduos ao acaso, estes marcados e mantidos em tanques, Nos indivíduos ao acaso foram encontrados fenótipos N1N1 e N1N2, mas não N2N2, sendo que a maior frequência de indivíduos era com fenótipos N1N2 sugerindo uma maior adaptabilidade ao meio ambiente em relação a indivíduos N1N1. Subsequentemente oito cruzamentos foram realizados combinando as RONS fenotipicamente diferentes, destes cruzamentos 172 espécimes foram analisados. Esses cruzamentos experimentais realizados foram com quatro machos (dois N1N1 e dois N1N2) e quatro fêmeas (uma N1N1 e três N1N2) produzindo oito ninhadas, nos quais não houve diferenças significativas no cruzamento N1N1 x N1N2, porém no cruzamento N1N2 x N1N2, a falta de descendentes N2N2 indicava a possível mortalidade

dos indivíduos portadores deste genótipo de homozigose recessiva. Como conclusão do estudo, os autores recomendaram que uma excelente solução para evitar perda de até 25% na salmonicultura seria o cruzamento de N1N1 com N1N2 que renderia taxas de sobrevivência normais por não ocorrer descendentes com fenótipo N2N2 e apresentar nesse cruzamento (F1) um elevado número de indivíduos N1N2. Kirpichnikov (1981) também descreveu um exemplo clássico de genótipo letal, porém em *Cyprinus carpio*, a homozigose letal foi semelhante ao observado por Porto-Foresti et. al. (2004), com a presença de um fenótipo N2N2 inviável.

A estruturação genética também é observada em populações de piapara (*Leporinus elongatus*, Anostomidae) provenientes dos rios Mogi-Guaçu e Paranapanema por meio da análise da heterocromatina. Analisando-se o cariótipo dos indivíduos presentes nesses rios verifica-se a existência de um heteromorfismo cromossômico, independente do sexo, relacionado à ausência (C1) e presença (C2) de um segmento heterocromático na porção intersticial do braço longo do par nucleolar da espécie (5º par), constituindo três citótipos (C1C1, C1C2 e C2C2) que ocorrem em diferentes frequências, tanto no rio Mogi-Guaçu como no rio Paranapanema. As frequências dos três citótipos entre estas populações divergem significativamente, indicando que as populações de *L. elongatus* estão estruturadas entre esses rios. Neste caso, entretanto, a divergência observada entre as populações parece ser consequência da construção de inúmeras barragens ao longo desses rios nos últimos 50 anos. As barragens funcionam como obstáculos à migração, o que proporciona a diminuição ou interrupção do fluxo gênico e redução no tamanho de suas populações, tornando-as assim mais susceptíveis aos efeitos da deriva genética (Galetti Jr, et al. 2008).

Pazian et al. (2012) a partir de dados citogenéticos e moleculares sugerem que a espécie *P. argentea* coletada nas bacias dos rios Paranapanema e Tietê podem representar mais de uma espécie. As amostras analisadas diferem pela distribuição da heterocromatina e

nas sequências parciais dos genes COI e CytB, revelando três grupos distintos de *P. argentea* com distâncias genéticas suficientes para sustentar a conclusão de que as três amostras analisadas são unidades taxonômicas distintas. De acordo com Mantovani *et al.* (2000) a diferença na distribuição de segmentos de banda-C pode ser utilizada para auxiliar na caracterização de gêneros, espécies e populações de peixes.

A citogenética completa a genética molecular visto que a mesma pode identificar cromossomos sexuais como descrito por Rosa *et al.* (2009) a presença de uma diferenciação em machos e fêmeas com número diploide $2n = 40$ e $2n = 39$ e genótipo $X_1X_1X_2X_2$ e X_1X_2Y respectivamente, no gênero *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). A citogenética pode também identificar cromossomos B, referido por Camacho *et al.* (2000) como cromossomos acessórios dispensáveis encontrados em alguns indivíduos da mesma espécie ou população de animais e plantas. Seus efeitos podem ser benéficos, prejudiciais e neutros, alguns autores consideram como parasitas ou egoístas (SOUZA & ITOYAMA, 2011).

Aguilar & Galetti (2008) observaram diferenças entre populações de *Leporellus vittatus* de três grandes bacias hidrográficas brasileiras (Paraná, São Francisco e Araguaia-Tocantins). Os autores destacaram que embora as três populações estudadas de *Leporellus vittatus* compartilhassem a mesma estrutura cariotípica já descrita por Galetti *et al.* (1991) para a população da Bacia do Paraná e que não foram detectadas diferenças no padrão de distribuição de heterocromatina e no número e localização dos sítios DNA ribossômico 45S, diferenças interpopulacionais foram evidenciadas pelo número e localização dos sítios de DNA ribossômico 5S. Eles ressaltam que variações quanto ao número e localização dos sítios DNAr 5S já foram descritos para muitas outras espécies de peixes. Múltiplos sítios foram descritos para algumas espécies de salmonídeos que mostraram até oito sítios localizados em diferentes pares de cromossomos autossômicos (FUJIWARA *et al.*, 1998), e por *Astyanax*

scabripinnis, um caracídeo, que apresenta oito sítios de DNAr 5S localizados em quatro pares de cromossomos distintos (FERRO *et al.*, 2001). Frequentemente, diferenças no número e posição dos sítios de 5S rDNA têm sido relatados como bons marcadores cromossômicos para discriminar espécies de peixe muito relacionadas, tais como em algumas famílias das ordens dos Mugiliformes e Perciformes (GORNUNG *et al.*, 2001;. MOLINA & GALETTI, 2002; ROSSI *et al.*, 2005). Em conclusão, os autores sugerem que as diferenças interpopulacionais observadas sobre o número e localização dos sítios de DNAr 5S entre populações do Paraná / São Francisco e Tocantins-Araguaia indicam que os indivíduos que compõem essas populações de *L. vittatus* podem formar um complexo de espécies crípticas. Espécies crípticas são aquelas que, apesar de serem morfologicamente idênticas ou muito parecidas, constituem unidades evolutivas independentes, com isolamento reprodutivo total ou parcial. A ocorrência de espécies crípticas na natureza é uma constante e a resolução dessas questões é um passo fundamental para a adequada proteção desses organismos (GALETTI JR. *et al.*, 2008). Outra aplicação seria a possibilidade de diminuir o impacto antrópico nas transposições de peixes, pois conhecendo a citogenética populacional empenha-se na sobrevivência da genética das populações (KUSMA & FERREIRA, 2009).

A relevância da citogenética nos últimos anos foi agregar elementos para comprovação de estudos evolutivos. As tendências genéticas entre diferentes famílias de ordens respectivas. Podendo apresentar grandes variedades numéricas e estruturais cariotípicas, heterogêneos ou conservados na estrutura, identificando assim taxonomicamente o grupo pesquisado. Já em piscicultura a citogenética contribui com o uso de marcadores genéticos para identificação de híbridos ou populações como acontece com *Piaractus mesopotamicus* (ARTONI *et al.* 2000). A aplicação de seleção, hibridação, análises dos níveis e endocruzamento, da manipulação cromossômica, reversão sexual, utilização de marcadores

e transgenia são exemplos das possíveis contribuições da genética na Piscicultura (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996).

Foi a partir de 1960 que pioneiros como De Roberts e Labat *et. al.* utilizaram a técnica de uso dos tecidos ou cultura celular (KLINGERMAN & BLOOM, 1977). Novos métodos têm sido descritos e adaptados a fim de substituir as técnicas de preparação direta, evitando-se assim o sacrifício do animal (FENOCCHIO & BERTOLLO, 1988).

O método de cultura celular foi descrito de forma simples e fácil aplicação, baseado nas técnicas descritas sobre cultura de linfócitos de peixes (BLAXHALL, 1983; HARTLEY & HORNE, 1983, 1985) associado a métodos rotineiros utilizados no Laboratório Humano de Citogenética na Faculdade de Medicina em Ribeirão Preto (SP) (FENOCCHIO & BERTOLLO, 1988).

Muitos fatores tem um efeito negativo do uso generalizado da técnica de cultura de linfócitos, como por exemplo, o tempo de espera da preparação de 72hs, dificuldade de padronização da técnica, a variação qualitativa dos nutrientes (soro fetal bovino (FCS) em particular).

Já os fatores positivos da técnica resumem-se na sobrevivência dos espécimes, tornando-se possível repetir pesquisas no mesmo indivíduo e especialmente melhorando a qualidade das preparações cromossômicas, diminuindo a necessidade de coletar mais espécimes do seu habitat natural. O tecido sanguíneo é menos denso do que o tecido renal, deixando menos resíduo na lâmina e conseqüentemente uma melhor imagem por não necessitar de maceração tecidual. O ganho principal é a possibilidade de contribuir para o aumento de espécimes em bancos genéticos populacionais vivos para um futuro trabalho de conservação com a utilização de espécimes com dados genéticos. (BLAXHALL, 1983; HARTLEV & HORNE, 1983, 1985).

Assim, atualmente, as informações citogenéticas estão disponíveis para 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e outras 199 espécies de água doce que não pertencem a superordem Ostariophysi (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Arefjev (1990) enfatiza a variabilidade cariotípica da família Characidae, citando como exemplo, em *Hemigramus sp.* (SCHELL, 1973) com $2n=24$ e em *Serrasalmus hollandi* (MURAMOTO *et al.*, 1968) com $2n=64$.

1.7. Objetivo

O presente relatório é parte integrante do plano de trabalho “Caracterização Citogenética das espécies ameaçadas de extinção da família Characidae contempladas no PAN Mogi-Pardo-Grande”, o qual está inserido no projeto “Implementação do Plano de Ação Nacional para as Espécies de Peixes Ameaçadas dos rios Mogi-Guaçu, Pardo e parte do Grande”. O projeto vem sendo desenvolvido pelo grupo de Citogenética de Peixes do Laboratório de Genética e Reprodução do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA apoiado financeiramente pelo ICMBio/CNPq, cujo objetivo geral é disponibilizar dados citogenéticos que discriminem espécies e populações de peixes, visto que de acordo com Helfman *et al.* (2009) é necessário discriminar as linhagens evolutivas fundamentais em todos os níveis taxonômicos para cumprir o objetivo de conservar a biodiversidade.

De acordo com um dos objetivos do Programa PIBIC/CNPq que visa proporcionar aos bolsistas estímulos para o desenvolvimento do pensar cientificamente e da criatividade decorrentes das condições criadas pelo confronto direto com os problemas de pesquisa, que no nosso caso foi a falta de espécies de caracídeos ameaçados de extinção que ainda não tinham sido cariotipados e a falta de recursos financeiros para promover o esforço necessário

para obtê-las e readequamos a análise dos dados que obtivemos com duas espécies cariotipadas a partir de duas técnicas de obtenção de metáfases.

Desta forma, o objetivo final desse trabalho foi:

a) caracterizar citogeneticamente espécies da família Characidae a partir das técnicas de obtenção dos cromossomos *air drying* e cultura de linfócitos,

b) testar hipóteses da presença de marcadores cromossômicos a partir de estudos já descritos em literatura, considerando sua possibilidade de ocorrência nas populações estudadas.

c) evidenciar a viabilidade da técnica de cultura de linfócitos para obtenção de metáfases em peixes ameaçados de extinção da área de abrangência do PAN Mogi-Pardo-Grande.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O trabalho foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA, localizado no município de Pirassununga-SP. Ocupando uma área de 273 ha, o CEPTA, figura 3, localiza-se em Pirassununga/SP, distrito de Cachoeira de Emas às margens do rio Mogi-Guaçu. A aplicação da Técnica de Hibridação *in situ* foi realizada no Laboratório de Genética de Peixes, na UNESP/Botucatu.

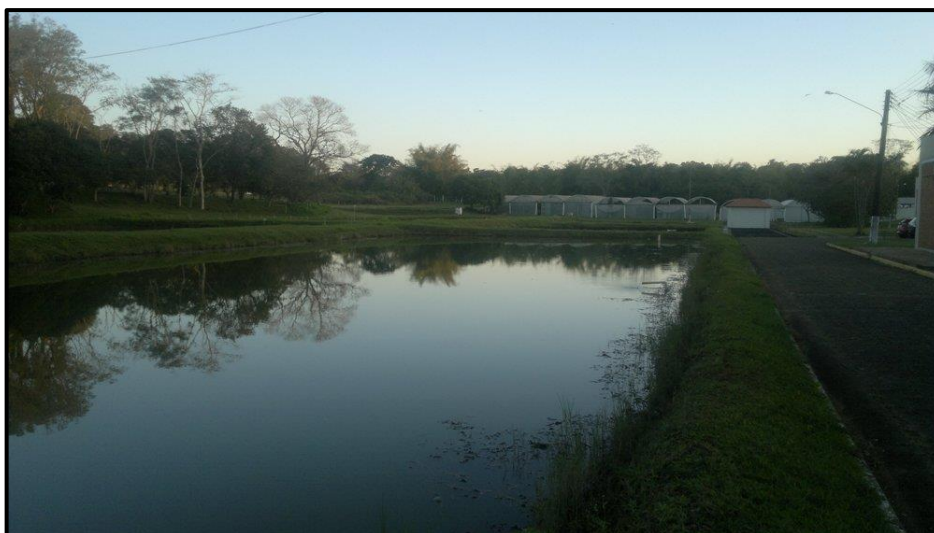


Figura 3: CEPTA - ICMBio - Pirassununga/SP fonte: Arquivo pessoal

As 28 amostras analisadas foram provenientes de indivíduos juvenis de *B. orbygnianus* e de *P. mesopotamicus* oriundos do banco genético do CEPTA, cujos reprodutores foram capturados nos rios inclusos na área de abrangência do PAN, para aplicação de diferentes técnicas citogenéticas e análise qualitativa das mesmas através da elaboração do cariótipo (identificação do número diploide e do número fundamental) e da presença de RONS e da heterocromatina constitutiva.

Após as técnicas de *air drying* e de cultura de linfócitos descritas por Bertollo *et. al.* (1978) e Fenocchio & Bertollo (1988), respectivamente, cada exemplar coletado foi conservado em álcool 70%, para comprovação da identificação taxonômica, bem como foram extraídas amostras de tecido (barbatana) visando estudos moleculares futuros. Os animais utilizados para a cultura de linfócitos foram devolvidos ao banco genético do CEPTA para futuras pesquisas.

2.2. ÁREA DE ESTUDO

A área de atuação do PAN abrange os rios Mogi-Guaçu, Pardo e parte do Grande ocupando aproximadamente uma área de 37.379,09 Km² localizada nos estados de São Paulo e Minas Gerais. (figura 4). Os dados de esforço de coleta dos caracídeos foram obtidos de seis diferentes pontos, aumentando a diversidade de ambiente para ampliar a possibilidades de capturas, como mostrado na figura 5 e 6.

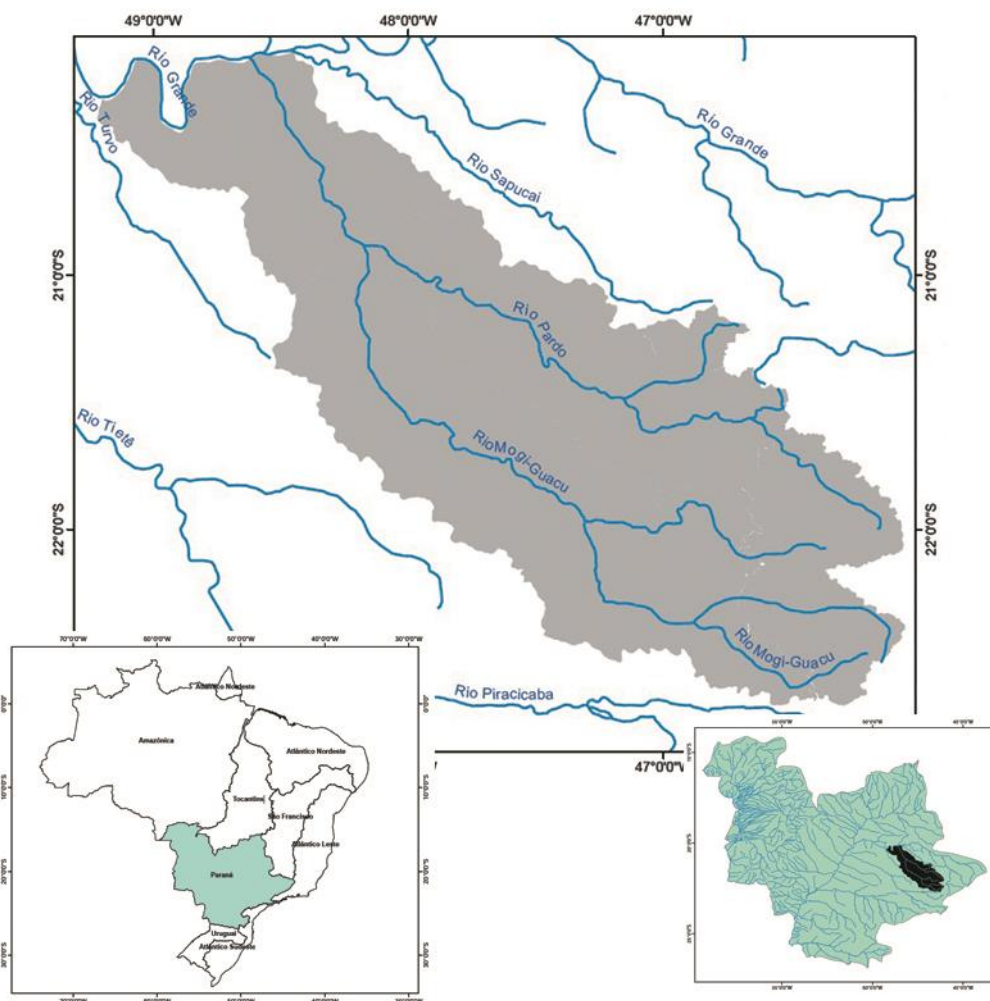


Figura 4: Área de atuação do PAN Mogi/Pardo/ Grande.

Tabela 1: Dados de esforço de coleta dos caracídeos

<i>Local da coleta</i>	<i>Coordenadas geográficas</i>	<i>Petrechos de Pesca</i>
CEPTA	21° 55' 47,7" S e 47° 22' 26,4" W	Tarrafa e rede de arrasto
Rio das Pedras	21° 51' 41.2" S e 47° 21' 45.9" W	Tarrafa, rede de espera e

Lagoa Marginal do Mogi-Guaçu	21° 52' 26,7" S e 47° 24' 40, 8" W	peneira Peneira
Rio Grande	20° 07' 58,8" S e 48° 35' 47,5" W	Tarrafa, arrastão e rede de espera
Rio Pardo – trecho	20° 11' 15,2" S e 48° 35' 17,3" W	Tarrafa, arrastão e rede de espera
Rio Ivinhema	20° 10' 25,9" S e 48° 37' 52,7" W	Tarrafa, arrastão, rede de espera, espinhel, anzol de galho e João bobo

Os locais escolhidos para coleta seguiu o propósito de amostrar diferentes tipos de ambientes como riachos, lagoas e calhas de rios, a fim de aumentar a possibilidade de captura das espécies de caracídeos estudados.

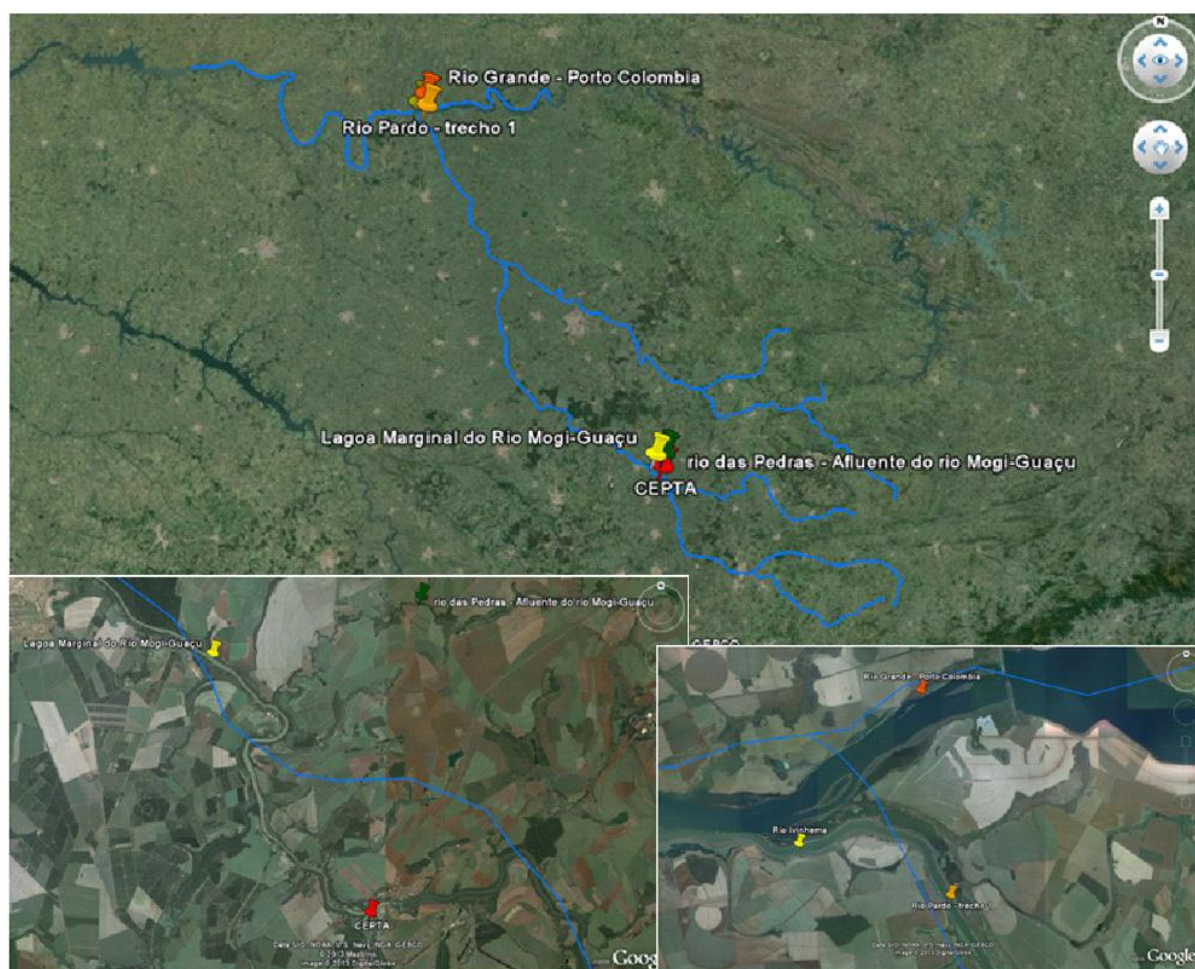


Figura 5: Pontos de coleta na área de abrangência do PAN Mogi-Guaçu/Pardo/Grande.



Figura 6: Fotos dos Pontos de Coleta: (A) CEPTA/ICMBio; (B) rio das Pedras-remanso; (C) rio Grande; (D) rio das Pedras-corredeira; (E) Lagoa Marginal; (F) rio Pardo.

Atualmente de acordo com SENHORINI (comunicação pessoal, 2013) há uma grande dificuldade em se obter exemplares das espécies ameaçadas por não serem mais vistas comumente na região do Rio Mogi-Guaçu, Rio Pardo e Rio Grande, como por exemplo, a Piracanjuba (*B. orbignyanus*) que há sete anos não é relatada no Rio Mogi-Guaçu. Por esse motivo seria positivo aumentar o número de campanhas de coleta em cada ponto, que foi dificultado pela falta de recursos financeiros durante o período do estágio.

2.3. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

2.3.1. Estimulação de metáfases

Foram utilizadas duas formas diferentes para a preparação dos cromossomos mitóticos.

A primeira foi à técnica de estimulação celular por inoculação intramuscular com fermento biológico, descrita por Oliveira *et al.* (1988) para peixes. A estimulação por fermento aumenta a resposta celular a partir do início de um processo inflamatório, fazendo com que eleve a divisão mitótica, permitindo o uso de um número reduzido de animais por espécie. O processo consistiu em preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann), açúcar e água destilada; aguardar a 37 °C por 10 minutos; injetar a solução dorso-lateralmente no peixe e aguardar 48 horas.

A segunda não houve estimulação por fermento biológico, porém a estimulação celular foi devida ao stress e perda de escamas no momento da coleta do tanque para o aquário do laboratório.

A obtenção dos cromossomos mitóticos foi realizada a partir de células renais com a morte dos peixes e da cultura de leucócitos sem a morte dos espécimes estudados.

2.3.2. Técnica de air drying: estudos *in vivo*.

Essa metodologia, descrita por Bertollo *et al.* (1978) envolveu resumidamente os seguintes passos: inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, hipotonização das células em suspensão, fixação pela mistura de metanol/ácido acético glacial e visualização dos cromossomos metafásicos pela coloração com giemsa em microscópio óptico.

A técnica foi iniciada, após a ação do indutor mitótico, quando foi injetado intraperitonealmente uma solução de colchicina (0,025%) na proporção de 1 ml para cada 100g de peso corporal, a fim de se obter células mitóticas metafásicas.

Após 40 minutos de aplicação da colchicina, os animais foram anestesiados com Eugenol, popularmente conhecido como óleo de cravo, e sacrificados removendo-se o rim, que nos peixes é um órgão hematopoiético e naturalmente apresenta células em divisão (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991b). Fragmentos do rim cefálico foram transferidos para uma cubeta de vidro contendo cerca de 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e com o auxílio de duas pinças, foi divulsionado, completando-se esse processo por aspirações e eliminações sucessivas do material em uma seringa de vidro desprovida de agulha, até que se



obteve uma suspensão celular homogênea.

Figura 7: Suspensão celular de *Brycon orbignyanus*. Fonte: Arquivo Pessoal.

A suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga e realizada a hipotonização celular a partir da incubação do material em estufa a 37 °C, por 21 minutos. Após esse tempo foi realizada a pré-fixação com dez gotas de fixador (metanol e ácido acético 3:1 recém-preparado) e aguardado 5 minutos em temperatura ambiente. Foi iniciada a fixação

acrescentando fixador até a solução apresentar um volume total de 13 ml, homogeneizando a suspensão e centrifugando por dez minutos a 1000rpm, descartando o sobrenadante.

A continuação da fixação foi realizada acrescentando-se cerca de 7 ml de fixador no tubo de centrifuga, ressuspendendo o material com uma pipeta Pasteur, seguiu-se nova centrifugação por dez minutos a 1000rpm. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, com a troca do fixador. Após a última centrifugação e descarte do fixador, adicionou-se 1,0 ml de fixador novo e o material ficou pronto para ser analisado. Algumas gotas de suspensão celular foram gotejadas em uma lâmina bem limpa, aquecida ao redor de 65°C. A sobra do material foi guardada em tubos tipo Eppendorf, em geladeira, para posterior utilização.

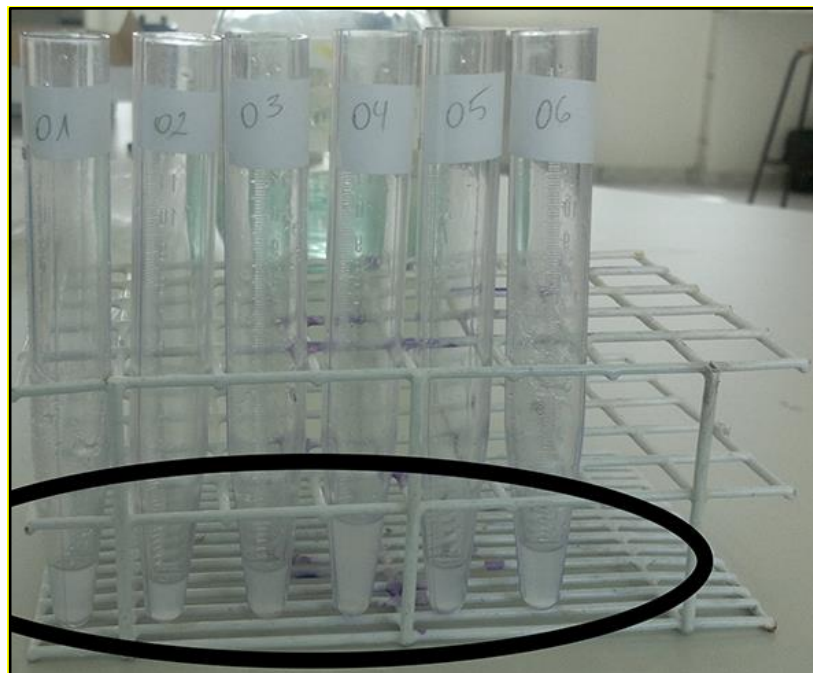


Figura 8: Solução final a partir de células renais da espécie *Brycon orbignyanus*. Fonte: Arquivo Pessoal.

Com auxílio da pipeta pingou-se uma gota da solução numa lâmina vaporizada no banho-maria, pois o aumento de temperatura leva a uma melhor distribuição celular na lâmina. Após secar a lâmina em temperatura ambiente, foi corado com Giemsa diluído a 5% em solução tampão fosfato 0,06M, pH 6,8, por 8 minutos e lavado em seguida com água destilada, secando a lâmina ao ar. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico de campo claro, em aumento de cem vezes.

2.3.3. Técnica de cultura de linfócitos

A utilização de amostras de sangue para a cultura de leucócitos foi realizada conforme descrita por Fenocchio e Bertollo (1988). Essa metodologia envolve resumidamente as seguintes etapas: Crescimento de células sangüíneas em meio de cultura, inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, hipotonização das células em suspensão, fixação pela mistura de metanol/ácido acético glacial e visualização dos cromossomos metafásicos pela coloração com Giemsa em microscópio óptico.

O procedimento iniciou-se por umedecer as paredes internas de uma seringa esterilizada de 1 ml, com anticoagulante (Liquemine, Roche); utilizando agulha esterilizada de 27x5 foi retirado cerca de 1 ml de sangue periférico da veia dorsal, através de punção vertical na linha da barbatana anal e adicionado 6 ml de meio RPMI, 2ml de soro fetal bovino e 0,2 ml de Fitohemaglutinina recém-diluída em frasco esterilizado; foi aguardada a decantação e a separação do soro para que posteriormente fossem pingadas oito gotas da parte leucocitária (0,3-0,4 ml) no frasco contendo meio de cultura, agitando-o levemente, colocando-os em estufa a 28°C, por 72 horas. Sendo que, 30 minutos antes do término da

cultura foram adicionados 0,2 ml de colchicina 0,01% no frasco (duas gotas), agitando-o levemente e retornando-o para a estufa até completar o tempo de cultivo. Após aguardar às 72 horas o material foi ressuspensionado e transferido para o tubo de centrífuga, com auxílio de pipeta Pasteur, centrifugado a 1.000 rpm por 10 min. e descartado o sobrenadante para então ser adicionado 7 ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M, ressuspensionando o material com o auxílio de pipeta Pasteur e foi conduzido para uma estufa a 28°C por 30 min., posteriormente foi iniciada a pré-fixação, a fixação e a visualização dos cromossomos metafásicos da mesma forma que nas outra técnica já citada acima.



Figura 9: Seringa contendo o material já decantado para retirada da camada de linfócitos. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 10: Resumo da técnica de cultura de linfócitos. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.3.4. RONS (Regiões organizadoras de nucléolos)

A localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONS) segue originalmente o padrão estabelecido por Howel & Black (1980), com modificações seguidas como padrão no laboratório de citogenética da UNESP – Botucatu. A técnica segue as seguintes etapas: hidrolização com HCl 1N, corar com gelatina e nitrato de prata e posteriormente corar com GIEMSA.

Detalhadamente a obtenção das RONS seguiu os seguintes passos: retirar qualquer óleo remanescente com Xilol; retirar a coloração de GIEMSA com fixador; hidrolisar a lâmina por 3 min. em solução de HCl 1N a 60°C; lavar em água destilada e deixar secar; misturar 3 gotas de gelatina e 6 de nitrato de prata, pingar sobre a lâmina, adicionar uma lamínula sobre a lâmina e rotacionar; colocar a lâmina com o auxílio de um suporte em banho-maria a 60°C; aproximadamente 2 minutos depois e quando a lâmina estiver na cor marrom-dourado, deve-se retirá-la e lavar com água destilada; Corar com Giemsa na proporção 1:30 por 10 segundos.



Figura 11: Banho-maria e o uso de Nitrato de Prata para identificação das RONS.

2.3.5. Bandamento C

Para a obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita por Summer (1972) que consiste basicamente em: hidrólise em HCl , banho com solução de Ba(OH)₂, incubar em solução salina (2xSSC) e corar com Giemsa ou corante de fluorescência (DAPI).

As etapas foram: utilizar lâminas previamente envelhecidas em estufa 37°C por dois dias; hidrolisar por 30 min. em HCl 0,2N à temperatura ambiente, lavar em água destilada e deixar secar; mergulhar a lâmina em solução 5% Ba(OH)₂ por 15 segundos a 60°C; lavar em água destilada e passar rapidamente em solução de HCl 1N à 60°C, lavar novamente em água

destilada; incubar a lâmina em solução salina (2xSSC) à 60°C por 30 min.; Lavar com água destilada e esperar secar; corar com Giemsa ou DAPI.

A técnica de coloração com DAPI se resume no uso de corantes fluorescentes (fluorocromos) para bandamento, o que proporciona uma análise mais detalhada dos cromossomos. Os fluorocromos mais utilizados atualmente são o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um fluorocromo que se liga às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT) (SCHWEIZER, 1976).

2.3.6. Marcação da sonda (reação de nick translation)

- a) colocar em um tubo *eppendorf* de 250 ml, 5 ml de enzima Mix; 5 ml de 10X dNTP Mix; 6 ml de DNA genômico (1 pg DNA/5 ml de enzima e dNTP Mix); e H₂O milli-Q q.s.p. para 45 ml de volume final;
- b) digerir por duas horas a 16°C;
- c) colocar 5 ml de *Stop Buffer* e 10 ml de *Yeast RNA* para 50 ml de solução de *nick translation*;
- d) adicionar 1/10 (6 ml) de acetato de sódio 3M e dois volumes de etanol 100% (120 ml). Pipetar bem para misturar;
- e) colocar no freezer a -70°C por 30 minutos ou a -20°C *overnight*;
- f) centrifugar por 10 minutos a 15.000 rpm;
- g) colocar 500 ml de etanol 70% gelado. Deixar hidratar por cinco minutos;
- h) retirar o sobrenadante e deixar secar por 10 minutos;
- i) colocar 40 ml da solução de hibridação.

Inicialmente foram utilizadas sondas pré-marcadas 5S e 18S de *Astyanax sp.*

2.3.7. FISH com sondas 5S e 18S

Essa metodologia envolve resumidamente os seguintes passos: marcação da sonda com biotina, tratamento dos cromossomos mitóticos com RNase, digestão por protease, pré-hibridação, hibridação (ligação do DNA cromossômico + DNA da sonda) e detecção por fluorescência. Essa técnica baseia-se na metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986) e consiste em:

Pré-hibridação (Tratamento com RNase)

As lâminas foram lavadas em solução tampão PBS 1X por 5 minutos no SHAKER em temperatura ambiente; seguido de uma desidratação das lâminas em série alcoólica gelada (70, 85 e 100%) por três minutos em cada etapa, logo após a secagem das lâminas elas foram incubadas em 70µl de solução RNase (0,4% RNase/ 2x SSC) a 37° por 1h em câmara úmida com água mili-Q, retirando a lamínula no final;Foi lavado 3x por 5 min. cada etapa em 2x SSC, logo após lavar por 5 minutos em PBS 1x, ambos na SHAKER.

Tratamento com Pepsina e Fixação

As lâminas foram incubadas por dez minutos na solução de pepsina 0,005% e posteriormente lavadas em solução de PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente na SHAKER; Logo em seguida foram fixadas em Formaldeído 1% em PBS 1x / 50mM MgCl₂ durante 10 minutos estacionado em temperatura ambiente (10ml PBS 10x + 5ml MgCl₂ 1M + 1ml de Formaldeído + 84ml de água destilada). Após esta etapa foram lavadas PBS 1x por 5 minutos na Shaker em temperatura ambiente; desidratada em série alcoólica a -20°C (70, 85 e 100%), durante 3 minutos em cada etapa e aguardar secar bem; E então desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2x SSC (70ml de formamida + 30ml 2x SSC) a 70°C por 5 minutos; Mergulhamos as num béquer com álcool gelado e desidratamos as lâminas em

série alcoólica a -20°C (70, 85 e 100%), novamente 3 minutos em cada etapa e aguardar secar;

Hibridação

Preparar a câmara úmida a 37°C

E então colocar em cada lâmina 30 μl de solução de hibridação (15 μl de Formamida a 50%, 6 μl de Sulfato de Dextrano 50%, 3 μl de 20x SSC, 2 μl sonda 5S, 2 μl sonda 18S, 2 μl de água destilada), cobrir com uma lamínula e deixamos overnight (12horas) na câmara úmida a 37°C ;

Lavagens do Segundo dia

Passado o tempo de hibridação, lavar 2x as lâminas em formamida 15%, pH7.0 (30ml de formamida + 20ml de 2X SSC +150ml de H₂O destilada) por dez minutos cada lavagem no Shaker a 42°C ; e então lavar a lâminas 3 vezes em 0,1SSC a 60°C , por 5 minutos cada Shaker; lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5% / 4xSSC (200ml de 20xSSC + 2ml de Triton + 798ml de H₂O destilada), em temperatura ambiente no Shaker;

Bloqueio interações inespecíficas da sonda

Incubar as lâminas em solução tampão 5% NFDM (*non fat dry milk*) / 4xSSC (20 ml 20X SSC; 80 ml H₂O milli-Q; 5 g de leite em pó desnatado) sobre lamínula por 15 minutos em temperatura ambiente; lavar as lâminas duas vezes por cinco minutos com Tween 0,5% / 4xSSC a temperatura ambiente no Shaker;

Detecção das duas sondas (DOUBLE FISH)

Então montar o mix de anticorpos contendo 994 μl NFDM + 1 μl de avidina FITC conjugada + 5 μl de anti digoxigenina rodamina conjugada; incubar as lâminas com 100 μl cada do mix de anticorpos durante 1h em câmara úmida, escura a 37°C ; lavamos 3x por 5 minutos cada com Solução Tween 0,5% / 4xSSC, em temperatura ambiente no Shaker; Desidratar a lâmina em

série alcoólica a -20°C (70, 85 e 100%), novamente 3 minutos em cada etapa e aguardar secar bem;

Montagem das lâminas com DAPI

Misturar 400µl de antifading + 1µl DAPI (0,2 mg/ml); colocar 50µl da mistura, cobrir com uma lamínula e aguardar pelo menos 15 minutos no escuro. Analisar em microscopia de fluorescência sob filtros WB (zona de excitação do azul) com 450-490 nm de comprimento de onda. Alternativamente, podem-se observar as metáfases sob o comprimento de onda do filtro WU, utilizado para o fluorocromo DAPI.

2.4. Processamento das imagens citogenéticas

As melhores metáfases submetidas as técnicas de coloração com Giemsa, RON e banda C foram digitalizadas e os cariótipos foram montados através do pareamento dos prováveis homólogos de acordo com Levan *et al.* (1964).

3. RESULTADOS

A partir da análise de 21 exemplares de *Brycon orbignyanus* foi possível colher dados tanto das preparações *in vivo* quanto *in vitro* para determinar seu número diploide de $2n=50$ e seu cariótipo com 12 pares de cromossomos metacêntricos, 11 pares submetacêntricos e 2 subtelocêntricos, resultando em número fundamental (NF) igual a 100 (figura 12). As regiões

organizadoras nucleolares (RONs), após a coloração com nitrato de prata, foram identificadas como duas marcações simples na porção terminal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntrico grande. No bandamento C, uma região de heterocromatina constitutiva, evidenciada pela coloração com o fluorocromo DAPI, foi localizada na porção terminal do braço longo em sintenia com a RON. (figura x).

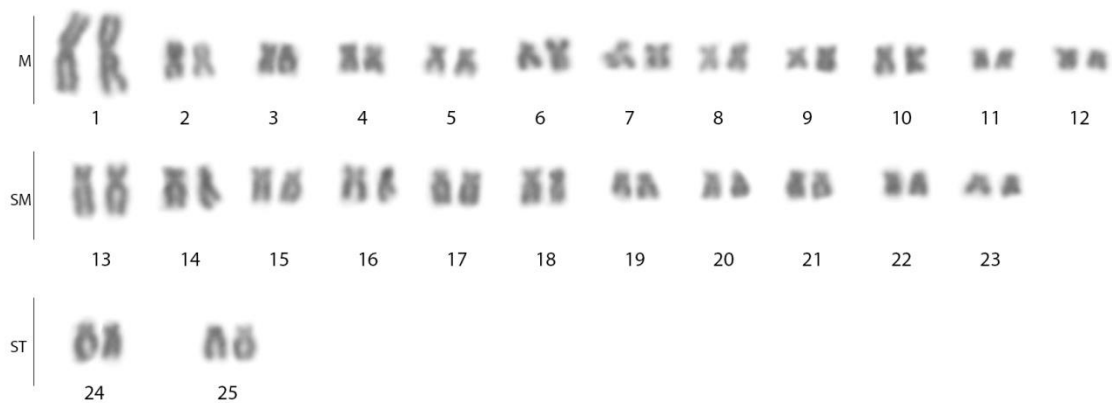


Figura 12: Cariótipo da *Brycon orbignyanus* , n°01 - CEPTA.

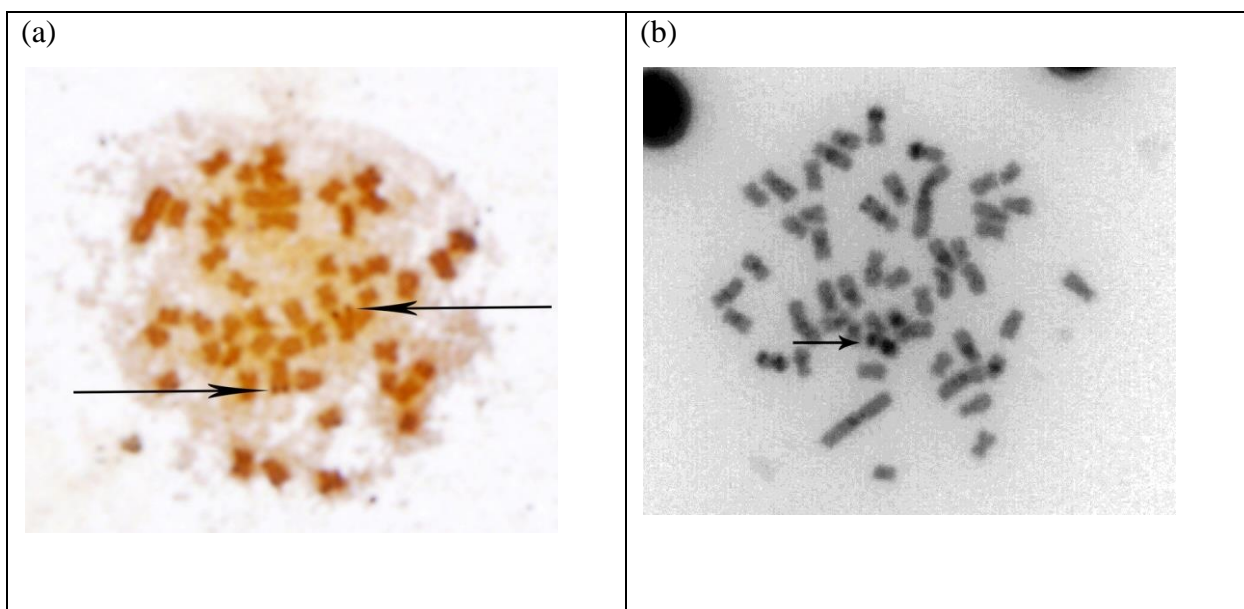


Figura 13: (a) RONs com coloração GIEMSA de *Brycon orbignyanus*; (b) Distribuição do padrão de heterocromatina constitutiva em Piracanjuba (*B. orbignyanus*) após coloração com DAPI.

A partir do mapeamento de genes ribossomais 18S e 5S em peixes do gênero *Brycon orbignyana* (Characidae) por hibridação in situ fluorescente, mais conhecido como técnica FISH, foi observado com relação à sonda 5S apenas um par de marcações localizado na região pericentromérica do braço longo de um pequeno par metacêntricos e em relação a sonda 18S apresentou um par de marcadores na região telomérica do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, como visto na figura 14.

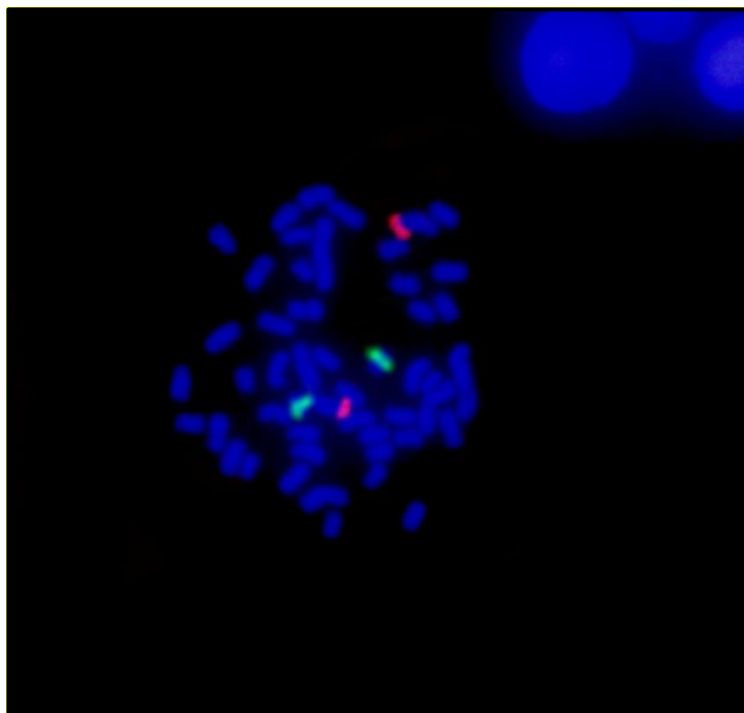


Figura 14: Técnica FISH – Sonda 18S e 5S de *Brycon orbignyana* , nº01 - CEPTA.

Os resultados obtidos com a técnica air drying e a de Cultura de linfócitos aplicados nas amostras de *B. orbignyana* foram comparados qualitativamente com o objetivo de averiguar a efetividade das técnicas em produzir resultados adequados a análises citogenéticas de espécies ameaçadas de extinção. O número de metáfases positivas para avaliação das técnicas foi calculado. As metáfases positivas consistem naquelas que apresentam um bom condensamento cromossômico, uma morfologia aceitável possibilitando a contagem do

número diplóide e fundamental para elaboração do cariótipo. Os resultados demonstraram que 44,44% dos peixes da técnica *air drying* apresentaram metáfases positivas com uma média de 44,5 metáfases por lâmina, em contrapartida a técnica de cultura de linfócitos revelou que 50% dos peixes obtiveram metáfases positivas, com uma média por lâmina maior em relação à primeira, de 47,5 metáfases positivas por lâmina. Essa análise não foi realizada com a espécie *Piaractus mesopotamicus* devido a não utilização da técnica *Air drying*, pois esta exige a morte dos espécimes estudados.

Tabela 2: Comparação de resultados entre as técnicas *Air drying* e Cultura de linfócitos em *Brycon orbignyana*.

<i>Brycon orbignyana</i>	Técnica <i>Air drying</i>	Técnica de cultura de linfócitos
Total de metáfases	222	316
% peixes positivos	44,44%	50,00%
Média de metáfases por lâmina positiva	44,5	47,5

O *Piaractus mesopotamicus* apresentou um número diploide $2n=54$ cromossomos, divididos em 10 pares de cromossomos metacêntricos, 17 pares submetacêntricos com um número fundamental (NF) igual a 108 (figura 15). Foi constatado nesses exemplares, conforme a figura 16, a presença de três RONS localizadas em cromossomos distintos, porém com as imagens adquiridas não foi factível a localização das marcações. No bandamento C foi possível identificar a presença blocos heterocromáticos em 2 pares de cromossomos distintos.

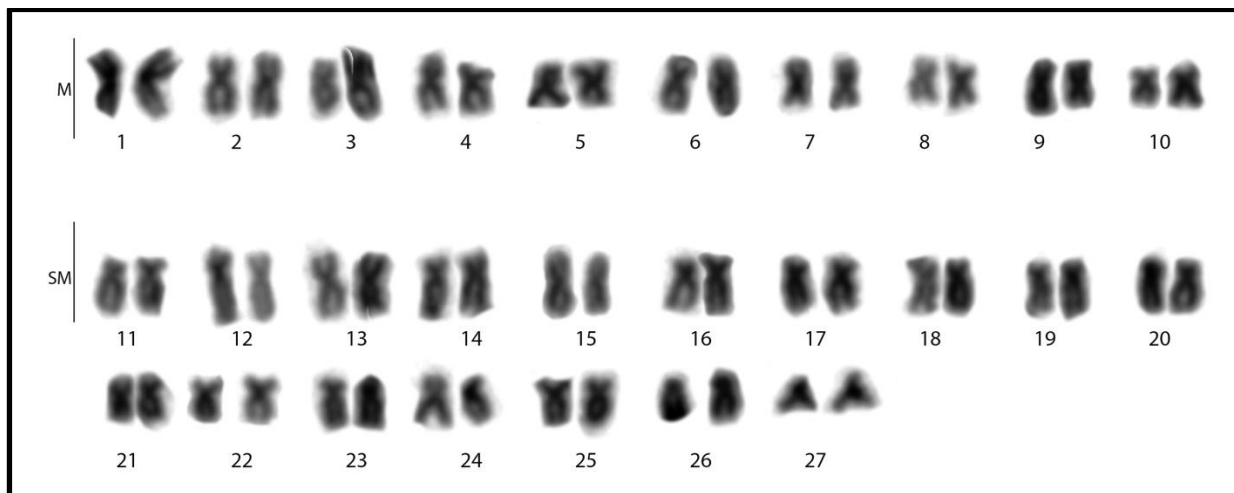


Figura 15: Cariótipo de *Piaractus mesopotamicus* , n°17 - CEPTA.

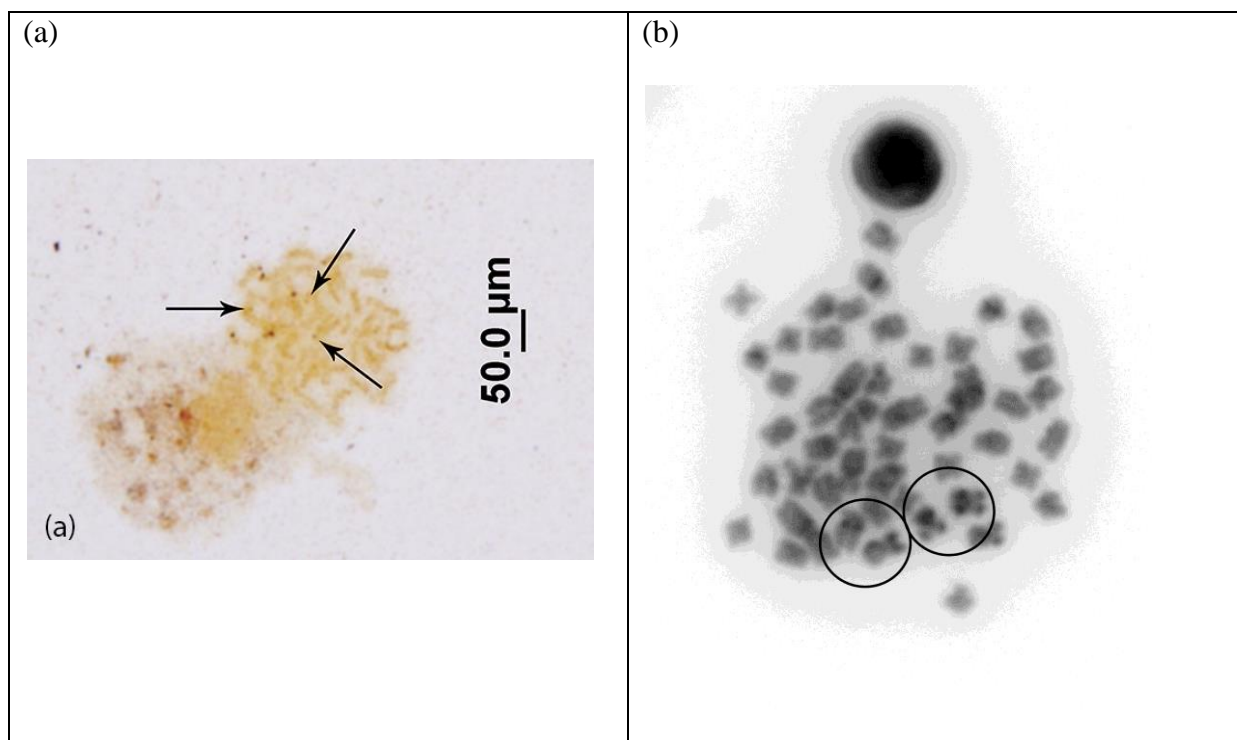


Figura 16: (a) RONS com coloração GIEMSA; (b) Distribuição do padrão de heterocromatina constitutiva em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após coloração com DAPI.

Foi observado na técnica FISH a partir de sondas ribossomais 18S e 5S em peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) evidenciando com relação à sonda 5S uma marcação na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos e num segundo par metacêntrico na região telomérica, já em relação à sonda 18S a espécie P.

mesopotamicus apresentou marcações na região terminal de dois pares de cromossomos submetacêntricos (figura 17).

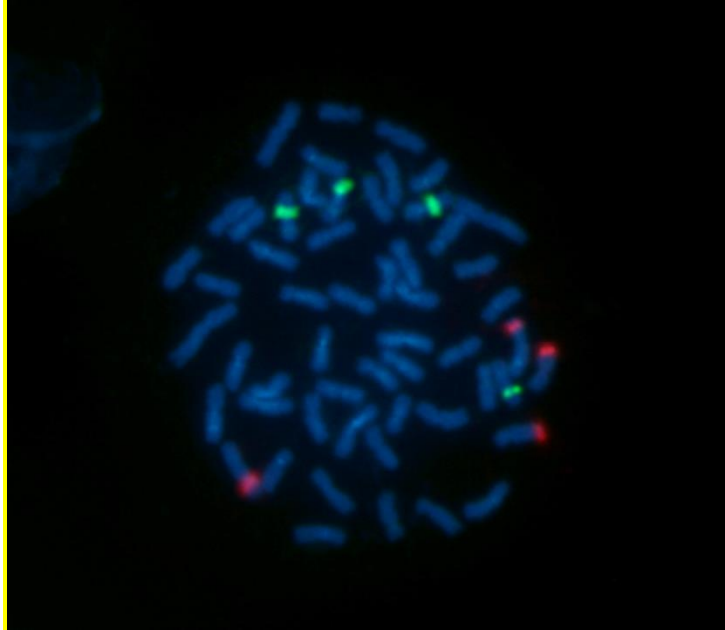


Figura 17: Técnica FISH – Sonda 18S e 5S de *Piaractus mesopotamicus*.

O treinamento e a padronização da técnica de citogenética para o nosso laboratório foi com a espécie *H. littorale*, com a qual foi possível realizar testes para a melhoria dos resultados, como por exemplo, a temperatura, o tempo e a concentração das substâncias, determinando quais parâmetros foram mais adequados a esta espécie e em seguida utilizados com os exemplares de caracídeos ameaçados de extinção. *H. littorale*, foi escolhida porque apresenta características boas para a manipulação por estudantes que estão iniciando o aprendizado nas técnicas citogenéticas, como por exemplo, abundância, rusticidade, tamanho do indivíduo adulto maduro, facilidade de visualização das estruturas abdominais internas, entre outras.

O número diploide observado para *H. littorale* foi $2n=60$ cromossomos e o cariótipo é composto por 8 cromossomos metacêntricos, 4 submetacêntricos e 48 acrocêntricos,

resultando em um número fundamental (NF) igual a 72 (CEPTA - peixe 024). Os nossos resultados concordaram com o cariótipo descrito por Pazza *et al.* (2005).

4. DISCUSSÃO

A citogenética compreende o estudo dos cromossomos e seus mecanismos de evolução e herança (Lacadena, 2006). Com os avanços metodológicos, os dados citogenéticos podem ser usados efetivamente para avaliar a biodiversidade e auxiliar no direcionamento das estratégias de conservação. Suas aplicações variam desde o diagnóstico de anomalias cromossômicas e sexagem à identificação de estruturação populacional e espécies crípticas. As análises cariotípicas são igualmente importantes para inferir o isolamento reprodutivo e a história evolutiva das populações e avaliar os riscos de depressão exogâmica na translocação entre populações ameaçadas ou de cativeiro.

O número diploide de 50 cromossomos encontrado nos juvenis de *B. orbignyana* filhos de reprodutores coletados no rio Ivinhema foram coincidentes com os dados cariotípicos da população de Porto Rico/PR descritos por Margarido & Galetti (1996) (Tabela 3). As metáfases dos juvenis de *B. orbignyana* do CEPTA e dos indivíduos da população de Porto Rico/PR também apresentaram marcações idênticas quando aplicadas as técnicas de bandamento C e de detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos, não sendo úteis na diferenciação cromossômica das populações estudadas.

O número diploide observado para *Piaractus mesopotamicus* foi $2n=54$ cromossomos e $NF=108$, além das três RONS confirmam os dados de Baroni (2005) e se opõem aos de Daniel-Silva (2001). Baroni (2005) sugere que esta variabilidade pode ser decorrente de uma variação populacional existente naturalmente para a espécie, a qual pode ter sido eventualmente

perdida nos estoques em função dos parentais selecionados para a reprodução. A diminuição da atividade gênica pode representar tanto a inativação dos genes quanto a perda das seqüências ribossômicas e, tratando-se de animais em cultivo, essa característica pode ter prevalecido no estoque, reduzindo a variabilidade genética. Nossos dados coincidentes com os de Baroni sustentam a teoria de que houve perda da variabilidade genética em decorrência da origem dos peixes estudados. A presença de um sistema simples ou múltiplo de RONS pode caracterizar diferentes grupos de peixes. As espécies pertencentes às famílias Anostomidae, Chilodontidae, Prochilodontidae e Curimatidae têm todas um único par cromossômico contendo a RON. A família Characidae apresenta uma diversidade entre suas subfamílias, tendo Bryconinae e Salmininae portando um único par de RONS enquanto Serrasalminae e Tetragopterinae, juntamente com espécies da família Erytrinae, apresentam um sistema múltiplo de RONS, sendo que o número máximo já detectado foi de 22 RONS em *Mylossoma paraguayensis* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1998). As marcações duplas dos cistrons ribossômicos encontradas nos dois estudos suportam essa teoria.

Os dados moleculares da população de juvenis de *B. orbygnyanus* do CEPTA, analisados por Ashikaga (2013) demonstraram baixa variabilidade genética apresentando somente um haplótipo exclusivo para esse grupo quando comparados com as populações selvagens. O autor conclui que os baixos índices de variabilidade genética encontrados neste estoque decorrem de um efeito fundador, ligado à sua origem. O processo de cruzamento endogâmico, comum neste tipo de produção pesqueira, acelera o processo de erosão genética e agrava a qualidade dos juvenis produzidos sendo que, a cada geração produzida, menores serão seus índices de variabilidade genética, com a presença de menos indivíduos heterozigotos e mais homozigotos (Ashikaga, 2013). Em situação semelhante, algumas pisciculturas de trutas arco-íris e de carpas também apresentam altos índices de endogamia. Desta forma, direcionamos nossa análise para possível identificação de genótipos

homozigotos recessivos iguais aqueles encontrados por Porto-Foresti (2004) em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e Kirpichnikov (1981) em *Cyprinus carpio* (carpa-comum), elaborando a hipótese de que a população de piracanjuba ou do pacu do CEPTA poderiam apresentar situação semelhante. Entretanto, todas as metáfases observadas mostraram o mesmo padrão de marcação simples em *B. orbignyanus* e marcações duplas em *P. mesopotamicus*.

Tendo em vista que de acordo com Helfman *et al.* (2009) o tratamento de várias espécies como uma única espécie é uma premissa fundamentalmente falha para o manejo da ictiofauna, e podem colocar as espécies menos abundantes em risco e que para atender o objetivo de conservar a biodiversidade, é necessário discriminar as linhagens evolutivas fundamentais em todos os níveis taxonômicos, utilizamos, passo a passo, todas as técnicas de citogenética clássica e molecular para identificar possíveis marcadores cromossômicos para as espécies estudadas.

Desta forma, nossos resultados confirmam o conservadorismo cromossômico de *Brycon orbignyanus* e *Piaractus mesopotamicus*, principalmente quando comparado com outros gêneros da família Characidae. Essa tendência evolutiva diverge em outras espécies também, como por exemplo, a homogeneidade do cariótipo de *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (BLANCO *et al.*, 2010) contrasta com a ocorrência de vários cariomórfos em *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (BERTOLLO *et al.*, 2000). No segundo caso a variação cromossômica sugere a existência de várias espécies dentro da mesma entidade taxonômica, constituindo-se um complexo de espécies. Analogamente, o padrão cariotípico conservador de populações, como observado em *Brycon orbignyanus* e *Piaractus mesopotamicus*, apontaria para a existência real de espécies distintas com um padrão conhecido para cada uma delas.

De acordo Oliveira *et al.* (2009) não há dúvida de que a aplicação da citogenética e da genética de populações na análise de peixes neotropicais tem contribuído para uma melhor

compreensão da fauna, ressaltando que estudos proporcionaram informações valiosas para a compreensão da divergência genética entre espécies co-específicas, das relações filogenéticas entre grupos, das ocorrências de complexos de espécies, dos mecanismos de determinação de sexo e da evolução dos cromossomos sexuais, da distribuição de regiões organizadoras de nucléolo, da existência de cromossomos supranumerários e das relações de poliploidia e evolução.

No entanto, a citogenética tem sido historicamente negligenciada na genética da conservação no cenário internacional, como atestado em revisão bibliográfica realizada por Affonso (2013, *in prep*). As análises moleculares não podem substituir os marcadores cromossômicos (ALLEN DORF & LUIKART, 2007) como descrito na família Achiridae (solhas e linguados) através do sequenciamento mitocondrial 16S gerando único grupamento com valores *bootstrap* de 100% para todas as amostras de *Achirus lineatus* do norte e nordeste do Brasil. Porém nas análises citogenéticas o número diploide para a população da Paraíba foi $2n=38$, mas na Bahia outra população da mesma espécie evidenciou um $2n=40$, indicando populações distintas, mostrando não haver diferença do conteúdo gênico, mas sim nas análises citogenéticas (BITENCOURT *et al.*, *in prep.*).

Pazza & Kavalco (2007) concluem em seu trabalho com espécies do Gênero *Astyanax* que talvez a maior aplicabilidade da citogenética seja o potencial de identificação das populações e seu risco de extinção (PAZZA & KAVALCO, 2007). Por exemplo, no gênero *Astyanax* há mais de 100 espécies válidas (BERTACO & LUCENA, 2010), onde populações específicas apresentam sítios ricos distintos de GC, AT, RONS e a presença de cromossomos B e supranumerários, tais como *Astyanax scabripinnis*, *A. bimaculatus*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. eigenmanniorum* e *A. hastatus* (PAZZA & KAVALCO, 2007; KAVALCO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011; KAVALCO *et al.*, 2011). Outro táxon igualmente controverso é

do *Hoplias malabaricus* (família Erythrinidae) com pelo menos sete cariomorfos e 13 casos de simpatria sem híbridos (BERTOLLO *et al.*, 2000).

Das 14 espécies de peixes contempladas no PAN Mogi-Guaçu/Pardo/Grande, seis espécies ainda não tem informação citogenética de acordo com os dados da Tabela 3, incluindo *Myleus tiete* e *Astyanax trierythropterus* da família Characidae. Cabe ressaltar, que espécies sob condições de ameaçadas são mais difíceis de serem capturadas por sua baixíssima ocorrência na natureza (Com. pessoal de SENHORINI, 2013). Entretanto, durante um desastre ambiental registrado no rio Grande, em setembro de 2008, apareceram vários exemplares de *Myleus tiete* mortos, o que, em tese, embasou a possibilidade de captura dessa espécie durante a campanha de coleta nesta região.

Tabela 3: Dados cariotípicos de espécies de peixes ameaçadas de extinção relacionadas ao PAN Mogi-Guaçu/Pardo/Grande.

<i>Nome atual da espécie</i>	<i>Nome espécie referida</i>	<i>2n</i>	<i>Fórmula Cariotípica</i>	<i>NF</i>	<i>Genes 18S e 5S</i>
<i>B. orbignyanus</i> ¹	---	50	24m+22sm+4st	100	2 marcações
<i>B. orbignyanus</i> ²	---	50	24m+22sm+4st	---	---
<i>B. orbignyanus</i> ^{3,8}	---	---	---	---	2 marcações simples
<i>B. nattereri</i> ¹	<i>B. reinhardri</i>	50	22m+28sm/st	---	---
<i>B. nattereri</i> ²	---	50	22m+28sm	100	---
<i>P. mesopotamicus</i> ⁵	<i>Colossoma mitrei</i>	54	20m+34sm	108	---
<i>P. mesopotamicus</i> ⁶	---	54	20m+34sm	108	---
<i>P. mesopotamicus</i> ⁷	---	54	---	---	---
<i>P. mesopotamicus</i> ⁸	---	54	20m+34sm	---	---
<i>P. mesopotamicus</i> ¹	---	54	20m+34sm	108	4 marcações
<i>N. paranensis</i> ⁹	---	54	20m+20sm+14st	90	---

<i>P. vimboides</i> ¹⁰	---	54	32m+22sm	108	---
<i>P. vimboides</i> ¹¹	---	54	40m+14sm	108	---
<i>P. vimboides</i> ¹²	---	54	54m/sm	108	---
<i>P. mangurus</i> ¹³	---	54	6m/26sm+12st/10a	---	---
<i>S. scriptum</i> ¹⁴	<i>S. scripta</i>	56	24 m/20 sm+4st/8a	104	---
<i>Z. jahu</i> ¹⁵	<i>Zungaro zungaro</i>	56	36m/2sm+8st/10a	102	2 marcações simples

¹ Presente trabalho; ² Margarido & Galetti Jr (1996); ³ Wasko & Galetti Jr. (2000); ⁴ Almeida-Toledo *et al.* (1987); ⁵ Santos (1994); ⁶ Oliveira & Giuliano-Caetano (2003); ⁷ Daniel-Silva *et al.* (2003); ⁸ Wasko *et al.* (2001); ⁹ Alves, A L (2000); ¹⁰ Pauls, E. & Bertollo, L.A.C. (1990), ¹¹ Pauls, E. *et al.* (1998); ¹² Reis *et al.*, 2012; ¹³ Martinez, E (2004); ¹⁴ Swarça *et al.* (2005); ¹⁵ Swarça *et al.* (2001).

Para ampliar a possibilidade de captura das espécies foco deste projeto foram realizadas coletas direcionadas em diferentes tipos de ambiente como riachos, lagoas e calhas de rios e com diferentes petrechos de pesca. Não foi encontrada nenhuma das espécies pretendidas, apesar dos esforços empreendidos, sendo necessária mais de uma campanha de coleta por local, pois o aparecimento dessas espécies é cada vez mais raro, conforme documentado por Senhorini (Com. pess, 2013). Tendo em vista a diversidade de marcadores cromossômicos encontrada nos peixes ósseos, faz-se necessário ampliar amostragens numéricas e geográficas para indicar qualquer alteração que implique em práticas conservacionistas distintas, auxiliando na gestão idônea de proteção à ictiofauna ameaçada de extinção.

O teste e a padronização da técnica citogenética são necessários, pois a obtenção de metáfases em grande quantidade e de boa qualidade depende de um protocolo adequado às condições do laboratório e da experiência prática do aluno. As técnicas citogenéticas já foram delineadas por notáveis cientistas, porém cada laboratório possui características próprias. Assim, a técnica poderá apresentar variações como: temperatura, umidade, exposição luminosa, tipo e idade dos equipamentos utilizados, entre outros. Sendo assim, uma espécie

não ameaçada foi escolhida para o aprimoramento da aplicação da técnica. O próximo passo foi utilizar a técnica nos peixes que são o objeto desse estudo e que fazem parte do banco genético de espécies ameaçadas de extinção do CEPTA.

A citogenética de peixes propicia informações relevantes no estudo da evolução cariotípica e na citotaxonomia. Entretanto, a maior parte dos estudos dessa área tem por base a preparação cromossômica “*air drying*”, na qual são utilizadas células renais para obtenção de metafases somáticas de espécies de peixes ameaçadas ou não de extinção.

Em literatura vimos que a utilização de métodos menos invasivos para a obtenção de cromossomos metafásicos de espécies ameaçadas de extinção foi negligenciada pelos laboratórios nos últimos dez anos. Na tabela 4 estão citados alguns exemplos de estudos desde a divulgação da lista de espécies ameaçadas de extinção divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente em 2003, em que somente um único trabalho utilizou a técnica de linfócitos, cuja intenção dos autores era de preservar a vida dos indivíduos estudados, pois eram de piscicultura.

Tabela 4: Exemplos de estudos citogenéticos envolvendo espécies de peixes ameaçados de extinção desenvolvidos a partir de técnicas citogenéticas no período de 2003 a 2013.

Espécie	Título do trabalho	Técnica	Ref.
<i>P. mangurus</i>	Cytogenetic analyses of <i>Pseudopimelodus mangurus</i> (Teleostei, Siluriformes, Pseudopimelodidae). 2004	Air drying	1
<i>S. scriptum</i>	First chromosome data on <i>Steindachneridion scripta</i> (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian Rivers: Giemsa, CBG, G- and RE banding. 2005	Cultura de linfócitos	2
<i>Brycon hilarii</i>	Caracterização citogenética das espécies matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>), piraputanga (<i>Brycon hilarii</i>) e sua geração filial, utilizados na piscicultura Brasileira. 2011	Air drying	3
<i>S. parahybae</i>	Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes),. 2011	Air drying	4
<i>B. amazonicus e B. orbignyianus</i>	Isolamento e caracterização de elementos transponíveis em espécies do gênero <i>Brycon</i> (Characidae, Bryconinae). 2012	Air drying	5
<i>H. wheatlandii</i>	The unique Karyotype of <i>Hemichilus wheatlandii</i> , a critically endangered fish living in a fast-developing region in fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. 2012	Air Dryng	6

1-Martinez, E *et al.* Cytologia 69:419-424, 2004; 2- Swarça, A C *et al.* Genetic and Molecular Research 4(4): 734-741, 2005; 3- Ana Danyelle Noitel Valim de Arruda Paes. 2011. Dissertação (mestrado) – UNESP-Botucatu/SP, 2011; 4- Neto, A M *et al.*, Neotropical Ichthyology, 9(1):97-105, 2011; 5- Jesica Ruiz-Silva, :2012., Dissertação (mestrado) – UNESP-Botucatu/SP; 6- Priscilla Caroline Silva, 2012. Dissertação (Mestrado) – UFV-Vicosa, MG.

Neste sentido, foi feita a análise dos resultados apresentados pelas duas técnicas utilizadas, onde a cultura de linfócitos ofereceu mais vantagens em situações específicas como no estudo citogenético de espécies de peixes ameaçadas de extinção. Mesmo sem a morte dos indivíduos foi possível o estabelecimento do cariótipo e a identificação de sequências de heterocromatina, das Regiões Organizadoras de Nucléolos e dos sítios de DNAr 18S e 5S, salientando assim a facilidade da técnica para realizar análises citogenéticas sem o sacrifício dos espécimes estudados.

Adicionalmente, os animais utilizados nos estudos a partir da técnica de cultura de linfócitos podem ser doados para bancos genéticos e assim contribuir para pesquisas futuras sem a necessidade da morte de mais indivíduos. Podem também serem encaminhados para instituições públicas de ensino e pesquisa evitando novas coletas na natureza.

Desta forma, pode-se concluir que a partir da obtenção dos cromossomos por cultura de linfócitos foi possível obter dados citogenéticos (cariótipo, número diplóide, número fundamental, heterocromatinas em bandamento C e RONS, sondagem 5S e 18S) informativos que confirmam dados anteriores obtidos a partir da técnica air drying, pela qual se utiliza células renais para obtenção das metáfases, levando a inevitável morte dos espécimes pesquisados. Peixes ameaçados de extinção requerem uma maior consciência da população, em especial dos pesquisadores, pois já sofrem um grande impacto no seu próprio ambiente e com o uso da técnica de cultura de linfócitos somente o sangue do peixe é utilizado, possibilitando ao espécime ser colocado redirecionado a num banco genético e estar disponível para estudos futuros, cuja preocupação com a preservação da espécie deve ser mantida como objetivo principal, e não utilizando a pesquisa para impactar mais as espécies em questão.

5. ANEXOS

Tabela 5: Número de metáfases encontrados nas lâminas dos peixes estudados.

<i>Nº peixe</i>	<i>ESPÉCIE</i>	<i>Nº de METÁFASES</i>	<i>TÉCNICA de coleta</i>
L01	<i>Brycon orbignyanus</i>	63	Cultura de linfócitos
L02	<i>Brycon orbignyanus</i>	05	Cultura de linfócitos
L03	<i>Brycon orbignyanus</i>	54	Cultura de linfócitos
L04	<i>Brycon orbignyanus</i>	17	Cultura de linfócitos
L05	<i>Brycon orbignyanus</i>	59	Cultura de linfócitos
L06	<i>Brycon orbignyanus</i>	41	Cultura de linfócitos
L07	<i>Brycon orbignyanus</i>	12	Cultura de linfócitos
L08	<i>Brycon orbignyanus</i>	35	Cultura de linfócitos
L09	<i>Brycon orbignyanus</i>	08	Cultura de linfócitos
L10	<i>Brycon orbignyanus</i>	22	Cultura de linfócitos
L11	<i>Brycon orbignyanus</i>	0	Cultura de linfócitos
L12	<i>Brycon orbignyanus</i>	0	Cultura de linfócitos
L13	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	24	Cultura de linfócitos
L14	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	14	Cultura de linfócitos
L15	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	11	Cultura de linfócitos
L16	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	16	Cultura de linfócitos
L17	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	56	Cultura de linfócitos
L18	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	22	Cultura de linfócitos
L19	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	61	Cultura de linfócitos
031	<i>Brycon orbignyanus</i>	68	<i>air drying</i>
032	<i>Brycon orbignyanus</i>	54	<i>air drying</i>
033	<i>Brycon orbignyanus</i>	13	<i>air drying</i>
034	<i>Brycon orbignyanus</i>	9	<i>air drying</i>
035	<i>Brycon orbignyanus</i>	17	<i>air drying</i>
036	<i>Brycon orbignyanus</i>	0	<i>air drying</i>
037	<i>Brycon orbignyanus</i>	0	<i>air drying</i>
038	<i>Brycon orbignyanus</i>	35	<i>air drying</i>
039	<i>Brycon orbignyanus</i>	26	<i>air drying</i>

RESUMO PARA O XV SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. <http://www.xvscgp.biouesb.com/>

CULTURA DE LINFÓCITOS: MÉTODO ELETIVO PARA ESTUDOS CITOGENÉTICOS COM ESPÉCIES DE PEIXES AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO

Izadora Ferreira Bittencourt¹ & Maria Rita de Cáscia Barreto Netto¹

¹*Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Laboratório de Genética e Reprodução de Peixes, Pirassununga, São Paulo.*

izabiouesp@hotmail.com, maria.netto@icmbio.gov.br

O conhecimento da diversidade genética de regiões geográficas suscetíveis a alterações ambientais é primordial para ações assertivas para conservação da ictiofauna nativa. Atualmente, não há dúvidas que a aplicação da citogenética e da genética de populações na análise de peixes neotropicais tem contribuído para melhor compreensão da fauna. No final da década de 80, métodos foram descritos e adaptados a fim de substituir as técnicas de preparação direta, evitando-se assim o sacrifício do animal. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi evidenciar a viabilidade da técnica de cultura de linfócitos para obtenção de metáfases em um dos peixes ameaçados de extinção, *Brycon orbignyanus*. Resultados demonstraram que 44,44% dos peixes da técnica *air drying* apresentaram metáfases positivas com média de 44,5 metáfases por lâmina, em contrapartida a técnica de cultura de linfócitos revelou que 50% dos peixes obtiveram metáfases positivas, com média por lâmina maior em relação à primeira, de 47,5 metáfases positivas. A partir dos resultados equivalentes entre as duas técnicas citogenéticas utilizadas pode-se concluir que sem a morte dos indivíduos foi possível o estabelecimento do cariótipo e a identificação de heterocromatina, das Regiões Organizadoras de Nucléolos e dos sítios de DNAr 18S e 5S, salientando assim a facilidade da técnica para realizar análises citogenéticas sem o sacrifício dos espécimes estudados. Adicionalmente, os animais utilizados nos estudos a partir da técnica de cultura de linfócitos podem ser doados para bancos genéticos e contribuir com espécimes vivos para um futuro trabalho de conservação com a utilização de indivíduos com dados genéticos.

Apoio: ICMBio/CNPq

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares, aos Analistas Ambientais do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA/ICMBio), principalmente para o Dr. José Augusto Senhorini, a Rita de Alcântara e a Msc. Tatiana Maria Lopes, em especial para a minha orientadora Dra Maria Rita de Cáscia Barreto pelo apoio e parceria, além das grandes contribuições para a concretização deste trabalho. Obrigada Fernanda Serpa por toda a sua busca bibliográfica no CEPTA/ICMBio.

Agradeço imensamente aos novos amigos e parceiros Renato Devidé, Cristian Araya e Cristiano Neves por me ampararem e auxiliarem na feitura e fotografia das técnicas, e toda a equipe do Laboratório de Citogenética da UNESP – Botucatu, em especial ao Dr, Fausto Foresti e ao Dr. Claudio Oliveira por abrirem as portas e me apoiarem em todos os carecidos momentos.

Agradeço ao meu eterno amigo e parceiro Públio Domingues por ter se lembrado de mim quando a oportunidade surgiu, pois são poucas pessoas que se lembram dos outros no momento da vitória.

Agradeço a Deus e todo o plano espiritual por zelarem por mim e darem muita saúde e luz para que eu conquiste meus sonhos e metas.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBio por me receber de portas abertas e incentivar todo aprendizado.

Agradeço também ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pela honrosa atitude de apoiar projetos de iniciação científica, formando excelentes profissionais e pela parceria Pibic/ICMBio com essa fabulosa oportunidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; JÚLIO, H.F.Jr.; PAVANELLI, C.S.; AGOSTINHO, C.S. 2004. Fish assemblages. **In: The Upper Paraná River floodplain: physical aspects, ecology, and conservations.** S.M. Thomaz, A.A. Agostinho, N.S. Hahn (Eds.) Backhuys Publishers, Leiden, 223 – 246.

- AGOSTINHO, A., ZANIBONI FILHO, E., LIMA, F. C. T. (2008) *Brycon Orbygnianus*, (Valenciennes, 1850). **In: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.** LIMA, F. C. T., ROSA, R. S.. Capítulo: Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. Volume II, Biodiversidade 19, Brasília-DF.
- ALLENDORF, F.R. & LUIKART, G. 2007. **Conservation and the genetics of populations.** Blackwell Publishing: Oxford. 642p.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., BIGONI, A. P., BERNARDINO, G., FORESTI, F., TOLEDO-FILHO, S. A. (1996) Karyotype and NOR conservation with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. **Caryologia** v.49: p.35-43.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., RAMOS, S.M., ORMANEZI, R., CAROLSFELD, V.J.S., TOLEDO, F. (1988) Estudos citogenéticos de híbridos entre fêmeas de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **B. Téc. CEPTA**, Pirassununga – SP, 1(2): 11-17.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., TOLEDO FILHO, S. A., BERNARDINO, G., FERRARI, W., ALCANTARA, R. C. G. (1987) Cytogenetic studies of *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrid. Proc. World Symp. **Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture**, pp.189-195.
- ALVES, C. B. M., VIEIRA, F., MAGALHÃES, A. L. B., BRITO, M. F. G. (2007) Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: BERT, M. T. **Ecological and genetic implications of aquaculture activities**, Dordrecht: Springer, p. 291–314.
- APONE, F., OLIVEIRA, A. K., GARAVELLO, J. C. (2008) Ichthyofaunistic composition of the Quilombo river, tributary of the Mogi-Guaçu river, upper Paraná river basin, southeastern Brazil. **Biota Neotrop.**, vol. 8, no. 1.
- AREFJEV, V. A. (1990) Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia**, v. 43, p.291-304.
- ARTONI, R.F., VICARI, M.R. & BERTOLLO, L.A.C. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biol. Health Sci.* 6(1): 43-60.
- ASHIKAGA, F. Y. (2013) Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus* na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu,
- BEGON, M., TOWSEND, C.R. & HARPER, J.L. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems.* 4^a ed.Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 738p.
- BELLAFRONTE, E., MARGARIDO, V. P. & MOREIRA-FILHO, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology** 28, 710–716.

BERTACO, V.A. & LUCENA, C.A.S. 2010. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 8: 7-20.

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

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., MOREIRA-FILHO, O. (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetic**, v. 1, p. 103-120.

BIGONI, A.P., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., TOLEDO-FILHO, S.A. AND FORESTI, F. (1993) Estudos citogenéticos em três espécies de Bryconinae (Pisces, Characidae). **Rev. Bras. Genet.** 16 (Suppl.): A. 143.

BLANCO, D. R., LUI, R. L., BERTOLLO, L. A. C., DINIZ, D. & MOREIRA-FILHO, O. (2010) Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews of Fish Biology and Fisheries** 20, p. 1–8.

BLAXHALL, P.C. (1983) Factors affecting lymphocyte culture for chromosome studies. **J. Fish Biol.** 22: 61-76

BRESSAN, P. M., KIERULFF, M. C. M., SUGIEDA, A. M. (2009) Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo- vertebrados. ISBN 978-85-63001-00-9. Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente.

BRITSKI, H. A., SATO, Y., ROSA, A. B. S. (1988) Manual de Identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, p. 115.

BRITSKI, H. A. (1972) Peixes de água doce do Estado de São Paulo. In Poluição e piscicultura. (Comissão Interestadual da bacia Paraná-Paraguai, ed). CIBPU, São Paulo, p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. 2007. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Embrapa, Serviço de Produção de Informação, Brasília. 227p.

BUCKUP, P.A., MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. (2007) (eds.). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. **Museu Nacional**, Rio de Janeiro, p. 195.

CALCAGNOTTO, D. (1998) Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Através de Análise do DNA mitocondrial. **Tese Doutorado**. Instituto de Biociências USP – São Paulo.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Et al* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology*. 245-247.

CAMACHO JP, SHARBEL TF and BEUKEBOOM LW (2000) B–chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond* 355:163–178.

CARNEIRO, D.J.; WAGNER, P.M.; DIAS, T.C.R. 1995. Efeito da densidade de estocagem e do nível de proteína bruta na dieta, no desempenho de produção de pacu (*Et al*). In: Encontro Nacional de Aqüicultura, Anais..., 52-61. n 84.

CASTAGNOLLI, N. & ZUIM, S.M.F. 1985. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu (*Colossoma mitrei* Berg 1895). FCAV/UNESP. Jaboticabal, SP. 26p.

CASTRO, R. M. C., CASATTI, L., SANTOS, H. F., MELO, A. L. A., MARTINS, L. S. F., FERREIRA, K. M., GIBRAN, F. Z., BENINE, R. C., CARVALHO, M., RIBEIRO, A. C., ABREU, T. X., BOCKMANN, F. A., PELIÇÃO G. Z., STOPIGLIA, R., LANGEANI, F. (2004) Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica** v4 (n1).

CATELLA, A.C.; PEIXER, J. ; PALMEIRA, S. da S. 1996. Sistema de controle de pesca de Mato Grosso do Sul, SCPESCA/MS–1 maio/1994 à abril/1995. Corumbá, MS: EMBRAPA–CPAP/SEMADES–MS. (EMBRAPA–CPAP, Documentos (16). 49p.

DANIEL-SILVA, M.F.Z. **Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes)**. São Paulo, 2001. 195 p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

DANIEL-SILVA MFZ AND ALMEIDA-TOLEDO LF (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenet Genome Res** 109:497-501.

DANIEL-SILVA MFZ AND ALMEIDA-TOLEDO LF (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia** 54:209-215.

EIGENMANN C.H. (1921) The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, 23: 209-310. Cambridge.

DANIEL-SILVA, M. F. Z., PORTO-FORESTI, F., SENHORINI, J. A., CECARELLI, P. C., ALMEIDA-TOLEDO L.F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. (2003) Pesquisas Genéticas em Pesqueiros da Bacia do Alto Paraguai. II. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piraputanga (*Brycon microlepis*).. **In:** 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética.

FENOCCHIO, A.S & BERTOLLO, L.A.C. (1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. **Rev. Brasil. Genet.** 11, 4, 847-852.

FERNANDES, C A & MARTINS-SANTOS, I C (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae*. Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genet Mol Biol** 29:464-468.

FERRAZ De LIMA, J.A.; BARBIERI, G.; VERANI, J.R. 1984. Período de reprodução e idade a primeira maturação gonadal de pacu (*Colossoma mitrei*) em ambiente natural, (Rio Cuiabá, - Pantanal de Mato Grosso). Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, São Carlos, SP.

FERRO, D. A. M., NÉO, D. M., MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and Functional diversity. *Genetica*, 110: 147-153.

FROESE, R. & D. PAULY (EDS.). (2005). Fish Base. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>.

FUJIWARA A, ABE S, YAMAHA E, YAMAZAKI F and YOSHIDA MC (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chrom Res* 6:463-471.

GALETTI JR, P. M., RODRIGUES, F. P., SOLÉ-CAVA, A., MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D., EIZIRIK, E., VEASEY, E. A., SANTOS, F. R., FARIAS, I. P., VIANNA, J. A., OLIVEIRA, L. R., WEBER, L. I., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FRANCISCO, M. R., REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T., MOLINA, W. F. (2008). Genética da conservação brasileira. pp.244-274. In: **Fundamentos de Genética da Conservação**. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p.

GODOY M.P. (1975) Peixes do Brasil – subordem Characoidei. Vol. I, **Ed. Franciscana**, Piracicaba - SP, 216pp.

GORNUNG E, CORDISCO CA, ROSSI AR, INNOCENTIIS DS, CROSETTI D and SOLA L (2001) Chromosomal evolution in Mugilidae: Karyotype characterization of *Liza saliens* and comparative localization of major and minor ribosomal genes in the six Mediterranean mullets. *Mar Biol* 139:55-60.

HARTLEY, S.E. & HORNE, M.T. (1983) A method for obtaining mitotic figures from blood leucocyte cultures of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish Biol.** 22: 77-82.

HARTLEY, S.E. & HORNE, M.T. (1985) Cytogenetic techniques in fish genetics. **J. Fish Biol.** 26: 575-582.

HASHIMOTO, D.T., GONÇALVES, V.R., BORTOLOZZI, J., FORESTI, F., PORTO-FORESTI, F.(2008). First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (suppl), 275-278.

HAHN, N.S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I.F. 2004. Trophic ecology of fish assemblages. In: The Upper Paraná River Floodplain: physical aspects, ecology, and conservation. S. M. Thomaz, A. A. Agostinho, N. M. Hahn (Eds), Bachuys Publishers, Leiden, 247-269.

HELFMAN, G. S., COLLETTE, B. B., FACEY, D. E. & BOWEN, B. W. (2009). The Diversity of Fishes: Biology, Ecology, and Evolution. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

HIDAKA K, IWATSUKI Y, RANDALL JE. 2008. Redescriptions of the Indo-Pacific bonefishes *Albula argentea* (Forster) and *A. virgata* Jordan and Jordan, with a description of a related new species, *A. oligolepis*. *Ichthyol Res* 55:53–64.

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

http://ambientes.ambientebrasil.com.br/educacao/glossario_ambiental/glossario_ambiental_-_e.html. Disponível em 04 de dezembro de 2013.

http://www.faunativa.com.br/downloads/pesquisa/glossario_biologico.pdf. Disponível em 04 de janeiro de 2013.

<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/plano-de-acao/1345-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-do-ecossistema-mogi-pardo-e-grande.html>. Disponível em 03 de janeiro de 2013.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. 2003. Growth and survival of pacu (*Et al* Holmberg 1887) juveniles reared in ponds with different initial larvicultura periods indoors. *Aquaculture Nutrition* 8, 169-174.

KAVALCO K. F., BRANDÃO K.O., PAZZA R., ALMEIDA-TOLEDO L. F. (2009) *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, 32, 3, 477-483.

KAVALCO, K.F. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2007). Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebra fish**, v. 4, n.2, DOI: 10.1089/zeb.2007.0504

KAVALCO, K.F., PAZZA, R., BRANDÃO, K.O., GARCIA, C. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2011. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Genome Res.* 134: 108-119.

KLINGERMAN, A.D. & BLOOM S.E. (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. **J. Fish. Res. Board Can.** 34: 266-269.

KUSMA, C. M.; FERREIRA, F. W. *Mecanismo de transposição de peixe de pequena central hidrelétrica*. In: Ciência Rural, Santa Maria, On line. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2009.

LACADENA, L-R. 1996. *Citogenética*. Madrid: Editorial Complutense. 931p.

- LANGHEANI, F., CASTRO, R.M.C., OYAKAWA, O.T., SHIBATTA, O.A., PAVANELLI, C.S. & CASATTI, L. (2007) Ichthyofauna diversity of the upper rio Paraná: present composition and future perspectives. **Biota Neotrop.** vol. 7, no. 3.
- LATINI, A. O., PETRERE JR., M. (2004) Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fisheries Management and Ecology**, v. 11, p. 71-79.
- LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52, p. 201–220.
- LUNDBERG, J.G., M. KOTTELAT, G.R. SMITH, M. STIASSNY, AND T. GILL. (2000) So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discoveries in fresh waters. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 87(1): 26-62.
- MACHADO, A. B. M., MARTINS, C. S., DRUMMOND, G. M. (2005) Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Belo Horizonte: **Fundação Biodiversitas**.
- MANTOVANI, M., ABEL, L.D.S., MESTRINER, C.A. & MOREIRA-FILHO, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nuclear organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109:161-168.
- MARGARIDO, V.P. & GALETTI JR., P. M. (1996) Chromosome studies in fishes of genus Brycon (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios** v.85: p. 219 – 228.
- MENDES, M.M., ROSA, R., GIULIANO-CAETANO, L. & DIAS, A.L. 2011 Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA₃ and 18S rDNA. *Genet. Mol. Res.* 10.
- MESCHIATTI, AJ. & ARCIFA, MS. (2009) A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies. **Acta Limnol. Bras.**, vol. 21, no. 1, p. 135-159.
- MILLS, L S & Allendorf, F W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv Biol* 10:1509–1518.
- MOLINA, W F & Galetti Jr, P M (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol* 25:373-377.
- MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (1991a) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, 14, p. 331-357.
- MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (1991b). Extraction and use of cephalic kidney for chromosome studies in small fish. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, n.4, p. 1085-1090.

- MORELLI, S., BERTOLLO, L.A.C., FORESTI F., MOREIRA-FILHO, O., TOLEDO-FILHO, A.S. (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia* 36: 235-244.
- MURAMOTO, J. I., OHNO, S., ATKIN, N. B. (1968) On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**. v.24: p. 59-66.
- MURGAS, L. D. S., DRUMOND, M. M., PEREIRA, G. J. M. e FELIZARDO, V. O. (2009). **Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce**. Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6, p.70-76, dez.
- OLIVEIRA, C., AVELINO, G. S. A., ABE, K. T., MARIGUELA, T. C., BENINE, R. C., ORTI, G., VARI, R. P. e CORRÊA E CASTRO, R. M. (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family *Characidae* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11:275 doi:10.1186/1471-2148-11-275.
- OLIVEIRA C, FORESTI F, HILSDORF AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry** 35: p. 81–100. doi: 10.1007/s10695-008-9250-1
- OLIVEIRA, C, ALMEIDA-TOLEDO, L F, FORESTI, F e TOLEDO (1988) Filho, S A. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**. v.41: p. 227-236.
- OYAKAWA, O.T. & MENEZES, N.A. (2011) Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrop.** 11(1a): <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0021101a>.
- PACHECO RB, GIULIANO-CAETANO L AND DIAS AL (2001) Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetraodonidae). **Chrom Sci** 5:109-114.
- PAZIAN, M F., PEREIRA, L H, SHIMABUJURO-DIAS, C K, OLIVEIRA, C & FORESTI, F. (2012) Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus *Piabina* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology** 10(2):329-340.
- PAZZA R. & KAVALCO K.F. (2007) Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Nucleus** 50:519-543.
- PAZZA, R., KAVALCO, K. F., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., BERTOLLO, L. A. C. (2005) *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a coastal river basin in Brazil—cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. **Caryologia** 58, 339–344.
- PEIXER, J. & PETRERE Jr., M. (2007) Hook selectivity of the Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, **Brazil**. **Braz. J. Biol.** 67(2), 339-345.
- PERES, W. A. M. (2005) Análise da variedade cariotípica de Characidae da Bacia do São Francisco **Dissertação Mestrado em Genética e Evolução** - São Carlos: UFSCar, 102p.

PFEILER, E, BITLER, B G, ULLOA, R. 2006. Phylogenetic relationships of the shafted bonefish *Albula nemoptera* (Albuliformes: Albulidae) from the eastern Pacific based on cytochrome *b* sequence analysis. **Copeia** 2006:778–784.

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.

PORTO-FORESTI, F. ; OLIVEIRA, C. ; GOMES, E.A. ; TABATA, Y.A. ; RIGOLINO, M.G. ; FORESTI, F. . (2004) A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 27, p. 51-54.

ROSA, R.; VANZELA, A.L.L; RUBERT, M.; MARTINS-SANTOS, I.C. ; GIULIANO-CAETANO, L. (2009) Differentiation of Y Chromosome in the $X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y$ Sex Chromosome System of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Cytogenet Genome Res**;127:54–60.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O. & FERRARIS. C.J. (eds.). (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. **EDIPUCRS**, Porto Alegre, p. 729.

REIS, JVC; WALKER, NJ; DERGAM, J A. (2012) Description of the karyotype and the nucleolar organizer regions of *Prochilodus vimboides* (Kner,1859), LAKE curimbatá, (Prochilodontidae) of the Doce River Basin, Minas Gerais State Brazil. In: **58º Congresso Brasileiro de Genética**, Foz do Iguaçu, PR. Anais do 58º Congresso Brasileiro de Genética, 2012.

RESENDE, E.K.; PEREIRA, R.A.C.; ALMEIDA, V.L.L. 1998. Peixes herbívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, Corumbá: EMBRAPA–CPAP, 24p. (EMBRAPA–CPAP. Boletim de Pesquisa, 10).

RESENDE, E.K. 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states. J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, A. Baers (Eds), World Bank, Victoria. 99-155.

ROSA, R. S. & LIMA, F. C. T. (2008) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. **IUCN**.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T. MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. 1988, 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase', Science, vol. 239, pp. 487-91.

SAINT-PAUL, U. 1985. The neotropical serrasalmid *Colossoma macropomum* a promising species for fish cultures in Amazônia. *Anim. Res. Dev.* 22, 7-35.

SANTOS V.H. DOS, (1994). - *Antilise to complexo sinaptonemico e estudo do emparelhamento cromossômico em *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Pisces, Characidae) e seu híbrido. Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biociencias, UNESP-Botucatu, Brasil.

SCHAEFER, A. S. (1998) Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (siluroidei: Locariidae). In: Malabarba, L. R., *et al.* (Org.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.375-394.

SHELL, J.J. (1973) Fish chromosomes and their evolution. **Internal Report of Denmark's Akvarium**, v. 1-22. Charlottenlund, Dinamarca.

SCHUBART, O. (1962) Lista dos peixes da bacia do rio Mogi Guaçu. **Atas Soc. Biol. Rio J.** 6(3): 26-32.

SCHWEIZER, D. (1976) DAPI fluorescent of plant chromosome prestained with actinomycin D. **Experimental Cell Research**, v.102, n.2, p.408-413.

SHAKLEE, J. B. & Tamaru, C. S. (1981) Biochemical and morphological evolution of the Hawaiian bonefishes (*Albula*). *Syst Zool* 30:125–146.

SHIBATTA, O. A. & CHEIDA, C. C. (2003) Composição em tamanho dos peixes (Actinopterygii, Teleostei) de ribeirões da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 20 (3): 469–473.

SEVERI, W.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. (1999) Structural and morphological feature of *Et al* (Holmberg, 1887) gills. *Rev. Brasil. Biol.* 60, 193-501.

SMITH, W.S.; ESPINDOLA, E.L.G.; PETRERE, M.Jr.; ROCHA, O. (2003) Fishing modification due dam, pollution and introduction fish species in the Tiete River, Monograph Collation, SP, Brazil, 494p

SOUZA, H.V., ITOYAMA, M.M. (2011) Cromossomos B, M-cromossomos e cromossomos univalentes de células meióticas de heteroptera. **Rev. Unorp**, São José do Rio Preto, v. 4, n. 11, p. 115-131.

SUGANUMA, C. H. (2008) Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Et al* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microsatélites / Tese de Doutorado –Unesp/Jaboticabal, SP.

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

TOLEDO-FILHO, S.A., FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1996) Biotecnologia Genética Aplicada à Piscicultura. São Paulo: USP, **Divisão de Artes Gráficas da CCS**, 59p. (Cadernos de ictiogenética, 3).

SWARCA AC, CESTARI MM, GIULIANO-CAETANO L, DIAS AL (2001) Cytogenetic characterization of the large south American Siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). **Chromosome Science** 5: 51–55.

SWARCA AC, FENOCCHIO AS, CESTARI MM, DIAS AL (2005) First chromosome data on *Steindachneridion scripta* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian Rivers: Giemsa, CBG, G- and RE banding. **Genetic and Molecular Research** 4(4): 734–741.

VAZZOLER, A.E.A.M.; SUZUKI, H.I.; MARQUES, E.E.; LIZAMA, M. De. LOS. A. 1997. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho, N. S. Hahn (Eds), EDUEM, Maringá Paraná. p. 249-265.

WASKO, A. P., GALETTI JUNIOR, P.M. (2000) Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n.1, p. 135-138.

WASKO, A. P., MARTINS, C., WRIGHT, J.M., GALETTI JUNIOR, P. M. (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, v. 44, p. 893-902.

Whitehead PJP. 1986. The synonymy of *Albula vulpes* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Albulidae). *Cybium* 10:211–230.

Zamparette, A.S. 1996. Caracterização de marcadores citogenéticos e genético moleculares em quatro populações de peixes da família Characidae – *Et al* (Holmberg, 1887). Jaboticabal. Dissertação (Mestrado) – FCAV/UNESP.

ZANELA, L. (2009) Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR. **Dissertação especialização** – IAC – Instituto Agrônomo de Pós Graduação, Campinas – SP.