

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM POPULAÇÕES DE ASTYANAX E HYPHESOBRYCON (PISCES,  
CHARACIDAE) PROVENIENTES DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAIM E DO ARROIO BOLAXA,  
REGIÃO SUL DA PLANÍCIE COSTEIRA DO RS, BRASIL.**

PATRICIA COELHO MACHADO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS  
CONTINENTAIS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES  
AQUÁTICOS CONTINENTAIS.

RIO GRANDE, AGOSTO DE 2009



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM POPULAÇÕES DE ASTYANAX E HYPHESOBRYCON (PISCES,  
CHARACIDAE) PROVENIENTES DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAIM E DO ARROIO BOLAXA,  
REGIÃO SUL DA PLANÍCIE COSTEIRA DO RS, BRASIL.**

ALUNO: PATRICIA COELHO MACHADO

ORIENTADOR: GUASSENIR GONÇALVES BORN

RIO GRANDE, AGOSTO DE 2009

*Dedico este trabalho aos meus pais, Flci e*

*Graça, pelo apoio e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos são para o Programa de Pós Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande, ao Laboratório de Genética da mesma instituição, ao apoio da Universidade Federal do Paraná, em especial à Giselle Perazzo, pela colaboração com as hibridações, e a Capes, por conceder a bolsa de auxílio referente ao programa REUNI.

Ao Prof. Dr. Guassenir Gonçalves Born, pela orientação durante o mestrado, por todos ensinamentos durante a graduação e pela amizade construída ao longo destes seis anos de convivência.

A Prof<sup>a</sup>. Dr. Adriana Gava que, embora ausente, participou durante o primeiro ano do curso e concedeu a mim seus ensinamentos para revisão deste trabalho.

Agradeço a compreensão e disponibilidade do Prof. Dr. Bernardo Vaz em colaborar com a revisão deste trabalho.

Aos professores Cléber Palma- Silva, Edélti Albertoni e Danilo Giroldo pelo carinho e convívio no Laboratório de Limnologia durante esse período.

Agradeço ao apoio concedido pelo Prof. Dr. Luiz Malabarba e Fernando Carvalho na identificação dos espécimes, de profunda relevância neste trabalho.

Meu amigo Éverton Ferreira, que sempre esteve disposto, desde a graduação, a coletar (pescar), em qualquer lugar, a qualquer dia, obrigada pela disponibilidade e amizade, e por pegar os peixes na mão até que eu “pudesse” fazer.

Não posso deixar de agradecer aos técnicos da Furg, que sempre davam dicas de locais melhores para coleta dentro da região escolhida e, claro, nos conduzia numa bela Kombi, sem ela não conseguiria trazer os peixes vivos “rapidamente” ao Laboratório.

Meu amigo e colega de Laboratório, Maurício, obrigada pela cumplicidade, auxílio e amizade durante esses anos. Com certeza me deu forças para que eu concluísse mais esta etapa.

Uma pessoa muito importante na minha vida, acadêmica e pessoal, Leonardo Furlanetto, amigo desde a graduação, e colega de mestrado, agradeço as conversas, risadas, parceria e companheirismo.

Todas as vezes que precisei das contribuições do Fernando Quintela, ele se mostrou disponível e acessível, fornecendo-me artigos importantes para realização deste trabalho, obrigada Fer.

Há amigos indispensáveis no meu dia a dia e por isso são responsáveis por fazer de mim quem sou, compreendendo-me, apoiando-me, discordando das minhas idéias, ou apenas, por estarem ali, me confortando, mesmo que de longe. São vocês: Cátia, Aline, Juliana, Natália, Cláudio, Valmor Vinícius, Mauro, Bruna B., Roberta K. e Carjone.

A minha família, pelo apoio em momentos bons e ruins, sempre foram motivo, talvez o único motivo, para eu levantar e seguir, devolvendo a vocês cada palavra de conforto na forma de realizações. Ressalto aqui, agradecimento especial ao meu pai, mãe, avó Marina e mana Priscila e, aos que ingressaram em minha vida durante esse tempo: meu amado Marcelo e meu cunhado Eduardo.

Por fim, a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

O grande número de espécies incluídas em Characidae, associado à imensa variedade de formas que ela apresenta, tem dificultado proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro da mesma, gerando dúvidas sobre o monofiletismo deste grupo. Dados citogenéticos disponíveis têm revelado para *Astyanax* um cariótipo variando de  $2n = 36$  a 50 cromossomos e para *Hyphessobrycon*,  $2n = 46$  a 52, com maior frequência observada para  $2n = 48$  e 50 cromossomos. No presente trabalho foram analisadas as estruturas cariotípicas de 14 espécimes de *A. eigenmanniorum* (5 machos e 9 fêmeas) e 35 de *A. jacuhiensis* (20 machos e 15 fêmeas) provenientes das Lagoas Flores e Nicola do banhado do Taim e 14 espécimes de *H. luetkenii* (8 machos e 6 fêmeas) e 12 de *A. eigenmanniorum* (7 machos e 5 fêmeas), pertencentes ao Arroio Bolaxa. A metodologia utilizada para obtenção de metáfases a partir de rim anterior seguiu a técnica descrita por Bertollo *et al.*, (1978). O número cromossômico encontrado para *A. eigenmanniorum* do arroio Bolaxa e do banhado do Taim foi  $2n = 48$ , sendo o cariótipo constituído por  $8M + 18SM + 12ST + 10A$ , com um número fundamental (NF) = 86. A análise das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) indicou marcações em dois pares cromossômicos submetacêntricos. Para população de *A. jacuhiensis* do banhado do Taim verificou-se  $2n = 50$  ( $8M + 26SM + 8ST + 8A$ ), (NF) = 92 e RONS presentes em um par cromossômico. Os exemplares de *H. luetkenii* provenientes do Arroio Bolaxa mostraram  $2n = 50$  ( $4M + 10SM + 36A$ ), (NF) = 64 e RONS presentes em um par acrocêntrico, heterocromatina constitutiva localizada preferencialmente nas regiões teloméricas e centroméricas nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) mostrou o mesmo padrão de distribuição dos sítios de DNAr 18S demonstrado pelas RONS. Observou-se ocorrência de um par de cromossomos metacêntricos grandes, o primeiro do complemento, em todos espécimes analisados, que é uma característica comum em Characidae. Desse modo, *A. eigenmanniorum* do Bolaxa e do Taim mostraram variações estruturais quando comparados com outra população pertencente a região Sul, assim como numéricas ( $2n = 48$  e 50) quando comparados com populações de Minas Gerais e Argentina, sugerindo ser outro “complexo de espécies”. Já *A. jacuhiensis* do Taim, mostrou-se conservada ao ser comparada com populações ocorrentes na região, variando a fórmula cariotípica e localização das RONS, indicando um certo grau de diferenciação, possivelmente devido ao isolamento

geográfico. Os exemplares de *H. luetkenii*, puderam ser comparados apenas com uma população ocorrente na mesma região devido a carência de dados, apresentando variação no padrão de distribuição de RONS, o que sugere uma possível ocorrência de rearranjos cromossômicos reforçados por um possível isolamento geográfico entre as mesmas.

**Palavras chave:** Citogenética, *Astyanax eigenmanniorum*, *A. jacuhiensis*, *Hyphessobrycon luetkenii* e Região Sul.

## ABSTRACT

The large number of species included in Characidae, coupled with the immense variety of forms that it presents, has hampered classification of propositions that reflect natural groupings within the same, creating doubts about the monophyly of this group. Cytogenetic data available for *Astyanax* have revealed a karyotype ranging from  $2n = 36$  to 50 chromosomes and *Hyphessobrycon*,  $2n = 46$  to 52, with higher frequency observed for  $2n = 48$  and 50 chromosomes. Cytogenetic studies were carried out in 14 specimens of *A. eigenmanniorum* (5 males and 9 females) and 35 *A. jacuhiensis* (20 males and 15 females) from the lakes of Taim wetland and 14 specimens of *H. luetkenii* (8 males and 6 females) and 12 *A. eigenmanniorum* (7 males and 5 females), belonging to Arroio Bolaxa. Mitotic chromosomes from kidney cells were obtained following methodology by Bertollo *et al.* (1978). The diploid number observed for *A. eigenmanniorum* of Taim wetland and Arroio Bolaxa was  $2n = 48$ . The karyotype structure was  $8M + 18SM + 12ST + 10A$ , and the fundamental number (FN) = 86. The analysis of nucleolus organizer regions (NORs) showed markings on two submetacentric chromosome pairs. To population of *A. jacuhiensis* of the Taim wetland was found  $2n = 50$  ( $8M + 26SM + 8ST + 8A$ ) (NF) = 92 and NORs present in a chromosome pair. Specimens of *H. luetkenii* coming from the Arroio Bolaxa showed  $2n = 50$  ( $4M + 10SM + 36A$ ), (NF) = 64 and NORs present in one acrocentric pair, constitutive heterochromatin preferably located in centromeric and telomeric regions in chromosomes metacentric and submetacentric. The fluorescent in situ hybridization (FISH) showed the same pattern of distribution of sites of 18S rDNA demonstrated by NORs. The first chromosomal pair of the complement is a big metacentric which is frequently observed in Characidae, occurred in all analyzed specimens. Therefore, *A. eigenmanniorum* of Bolaxa and Taim showed structural changes compared with other population belonging to the South, as well as numbers ( $2n = 48$  and 50) when compared with populations from Minas Gerais and Argentina, suggesting that other "species complex". *A. jacuhiensis* from Taim wetland, proved conserved when compared with populations occurring in the region, varying the karyotype formula and location of NORs, indicating some degree of differentiation, possibly due to geographical isolation. Specimens of *H. luetkenii*, could be compared only with a population occurring in the same region due to lack of data, showing variation in the

distribution pattern of NORs, which suggests a possible occurrence of chromosomal rearrangements reinforced by geographical isolation between them.

**Key words:** Cytogenetics, *Astyanax eigenmanniorum*, *A. jacuhiensis*, *Hyphessobrycon luetkenii* e South region.

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** VINTE E QUATRO FAMÍLIAS QUE OCORREM NO BANHADO DO TAIM, COM ÊNFASE NAS DEZENOVE ESPÉCIES DE CHARACIDAE (GARCIA *et al.*, 2006)..... 55
- TABELA 2.** COMPOSIÇÃO ESPECÍFICA DAS COMUNIDADES NOS TRÊS RIACHOS COM OS ÍNDICES DE CONSTÂNCIA DE OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES. ÊNFASE PARA OS DOIS GÊNEROS MAIS REPRESENTATIVOS. (TAGLIANI, 1994)..... 58
- TABELA 3.** ESPÉCIES DE *Astyanax*, INDICANDO A OCORRÊNCIA, NÚMERO DIPLÓIDE, NÚMERO FUNDAMENTAL, FÓRMULA CAROTÍPICA E RONS, DESTACANDO A OCORRÊNCIA DE DIFERENÇAS INTER E INTRAPOPULACIONAIS, COMO EM *A. eigenmanniorum*..... 59

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** MAPA HIDROGRÁFICO PARCIAL DA REGIÃO SUL, EVIDENCIANDO A ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAIM E OS LOCAIS DE COLETA: LAGOA FLORES (32° 32' 45" S; 52° 31' 4" W) e Nicola (32° 32' 32" S; 52° 32' 26" W)..... 16
- FIGURA 2.** LAGOA FLORES (32° 32' 45" S; 52° 31' 4" W - **a**) E NICOLA (32° 32' 32" S; 52° 32' 26" W - **b**)..... 17
- FIGURA 3.** EXEMPLARES DE *Astyanax*. *A. eigenmanniorum* (**a**); *A. jacuhiensis* (**b**). BARRA = 1 cm ..... 18
- FIGURA 4.** MAPA DO RIO GRANDE DO SUL EVIDENCIANDO O ARROIO BOLAXA, PERTENCENTE AO MUNICÍPIO DE RIO GRANDE (32°09.740"S; 52°11.270"W) ..... 19
- FIGURA 5.** EXEMPLAR DE *H. luetkenii*. BARRA = 1 cm ..... 20
- FIGURA 6.** MATERIAIS UTILIZADOS PARA COLETA DOS PEIXES; TARRAFA MALHA 12 MM (**a**); ARMADILHA DO TIPO COVO (**b**) ..... 20
- FIGURA 7.** TRANSPORTE E ACONDICIONAMENTO DOS ESPÉCIMES: BALDE COM TAMPA (**a**); TANQUES 250 E 500L (**b**)..... 21
- FIGURA 8.** CARIÓTIPO DE *A. eigenmanniorum* PROVENIENTE DO BANHADO DO TAIM COM COLORAÇÃO CONVENCIONAL GIEMSA. BARRA = 5 µm..... 30
- FIGURA 9.** CARIÓTIPO DE *A. eigenmanniorum* PROVENIENTE DO ARROIO BOLAXA COM COLORAÇÃO CONVENCIONAL GIEMSA. BARRA = 5 µm..... 30

|                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 10.</b> METÁFASE DE <i>A. eigenmanniorum</i> DO BANHADO DO TAIM: COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA EVIDENCIANDO AS Ag-RONS NOS PARES 6 e 11. ....                                                                                                 | 31 |
| <b>FIGURA 11.</b> METÁFASE DE <i>A. eigenmanniorum</i> DO ARROIO BOLAXA: COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA EVIDENCIANDO AS Ag-RONS NOS PARES 6 e 11.....                                                                                                    | 31 |
| <b>FIGURA 12.</b> CARIÓTIPO DE <i>A. jacuhiensis</i> OCORRENTE NO BANHADO DO TAIM COM COLORAÇÃO CONVENCIONAL GIEMSA. BARRA = 5 µm.....                                                                                                                   | 33 |
| <b>FIGURA 13.</b> METÁFASES DE <i>A. jacuhiensis</i> DO BANHADO DO TAIM: COLORAÇÃO GIEMSA (a) E SEQUENCIAL COM NITRATO DE PRATA EVIDENCIANDO AS Ag-RONS NO PAR 6 (b) .....                                                                               | 33 |
| <b>FIGURA 14.</b> CARIÓTIPO DE <i>H.luetkenii</i> PERTENCENTE AO ARROIO BOLAXA COM COLORAÇÃO CONVENCIONAL GIEMSA. BARRA = 5 µm .....                                                                                                                     | 35 |
| <b>FIGURA 15.</b> METÁFASES DE <i>H.luetkenii</i> DO ARROIO BOLAXA: COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA EVIDENCIANDO AS Ag-RONS (a); HIBRIDAÇÃO in situ (FISH) COM A SONDA DE DNAr 18S (b) E REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS POR BANDAMENTO – C (c).... | 36 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO .....                                                                                                                          | vi   |
| ABSTRACT .....                                                                                                                        | viii |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                | x    |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                | xi   |
| <br>                                                                                                                                  |      |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                                             | 01   |
| <br>                                                                                                                                  |      |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                         | 04   |
| 2.1. Ictiofauna Neotropical: Aspectos Gerais .....                                                                                    | 04   |
| 2.1.1. Ordem Characiforme.....                                                                                                        | 05   |
| 2.1.2. Família Characidae.....                                                                                                        | 05   |
| 2.2. A Ictiofauna do Banhado do Taim .....                                                                                            | 06   |
| 2.3. A Ictiofauna do Arroio Bolaxa .....                                                                                              | 07   |
| 2.4. Considerações sobre a Citogenética .....                                                                                         | 08   |
| 2.4.1. Colorações e Marcadores Moleculares .....                                                                                      | 09   |
| 2.4.2. Citogenética de peixes.....                                                                                                    | 11   |
| 2.4.2.1. Estado atual da citogenética de <i>Astyanax</i> : ênfase em <i>A.</i><br><i>eigenmanniorum</i> e <i>A. jacuhiensis</i> ..... | 12   |
| 2.4.2.2. Estado atual da citogenética de <i>Hypheossobrycon</i> : ênfase<br>em <i>H. luetkenii</i> .....                              | 14   |
| <br>                                                                                                                                  |      |
| 3. OBJETIVO GERAL .....                                                                                                               | 15   |
| 3.1. Objetivos específicos .....                                                                                                      | 15   |
| <br>                                                                                                                                  |      |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                            | 16   |
| 4.1. Locais de coleta e Espécies estudadas.....                                                                                       | 16   |
| 4.2. Métodos.....                                                                                                                     | 22   |
| 4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento “ <i>in vivo</i> ”.....                                                         | 22   |
| 4.2.2. Coloração convencional – Giemsa.....                                                                                           | 23   |
| 4.2.3. Detecção da heterocromatina constitutiva: Banda C.....                                                                         | 23   |
| 4.2.4. Coloração com nitrato de prata – Ag-Rons.....                                                                                  | 24   |
| 4.2.5. Estudos cariotípicos.....                                                                                                      | 25   |

|                                                                                                                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.6. Identificação cromossômica.....                                                                                                                                                                                                | 25        |
| 4.2.7. Revelação e Cópias Fotográficas.....                                                                                                                                                                                           | 26        |
| 4.2.8. Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda DNAr 18S .....                                                                                                                                                         | 26        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>29</b> |
| 5.1. Populações de <i>A. eigenmanniorum</i> pertencentes ao Arroio Bolaxa e<br>banhado do Taim .....                                                                                                                                  | 29        |
| 5.2. População de <i>A. jacuhiensis</i> ocorrente no banhado do Taim .....                                                                                                                                                            | 32        |
| 5.3. População de <i>H. luetkenii</i> proveniente do Arroio Bolaxa .....                                                                                                                                                              | 34        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>37</b> |
| 6.1. Estudos cariotípicos comparativos em populações de <i>A. eigenmanniorum</i><br>(Cope, 1894) e <i>A. jacuhiensis</i> (Cope, 1894) ocorrentes em diferentes<br>lagos na região Sul do Brasil (Characidae; Tetragonopterinae) ..... | 37        |
| 6.2. Caracterização cariotípica comparativa em populações de <i>H. luetkenii</i><br>(Boulenger, 1887) provenientes do município de Rio Grande/RS .....                                                                                | 40        |
| <b>7. CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>42</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                                                                            | <b>43</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                 | <b>63</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes representam o grupo mais diversificado entre os vertebrados. Ocupam uma posição basal na filogenia deste grupo, constituindo um conjunto de organismos dos mais interessantes para estudo da variabilidade genética e evolução (Nelson, 1994). Assim, a citogenética de peixes tornou-se uma importante ferramenta na abordagem de questões evolutivas, de sistemática, de hibridação inter e intraespecífica, de polimorfismo e de poliploidia cromossômica (Araújo & Morelli, 2000).

Dados disponíveis para cerca de 700 espécies Neotropicais já permitem visualizar algumas tendências de evolução cariotípica deste grupo, considerando número e fórmula cromossômica, sistemas de cromossomos sexuais, ocorrência de cromossomos B, localização de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva e bandamentos diversos, incluindo análises recentes com hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (Almeida-Toledo, 1998; Artoni *et al.*, 2000; Centofante, 2003; Kantek, 2005; Kantek, 2007b; Peres, 2005).

As duas ordens mais representativas em número de espécies na região Neotropical são Characiformes e Siluriformes. Espécies pertencentes a estas ordens mostram uma ampla variabilidade cariotípica, onde se observam grupos bem heterogêneos (Characidae), ao lado de outros mais conservados (Anostomidae) (Artoni *et al.*, 2000).

O grande número de espécies incluídas em Characidae, associado à imensa variedade de forma que ela apresenta, tem dificultado proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro da mesma, gerando dúvidas sobre o monofiletismo deste grupo, o que também prejudica o entendimento das relações de parentesco com as demais famílias de Characiformes (Lucena, 1993). Nestes casos, a associação entre a Citogenética e a Sistemática, tem se mostrado extremamente profícua, complementando os estudos de identificação, distribuição e relacionamento entre grupos, que normalmente baseiam-se apenas em caracteres morfométricos e merísticos (Ozouf-Costaz & Foresti, 1992).

*Astyanax*, atualmente alocado entre vários gêneros *Incertae Sedis* de Characidae (Géry, 1977; Peres, 2005), inclui cerca de 74 espécies, são abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras e distribuem-se desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina (Garutti & Britski, 2000; Lima *et al.*, 2003). Como se trata de um grupo com grande número de espécies e formas semelhantes, muito da sua

taxonomia ainda permanece obscura e identificações incorretas aparecem com frequência na literatura (Kavalco *et al.*, 2007), como ocorre com *A. eigenmanniorum* e *A. jacuhiensis*. Estas espécies são encontradas no Estado do Rio Grande do Sul, com distribuição nas Bacias da laguna dos Patos e Uruguai e na localidade-tipo, respectivamente (Bemvenuti & Moresco, 2005; Buckup *et al.*, 2007).

Descrições citogenéticas são escassas para *A. jacuhiensis*. Os dados cariotípicos encontrados por Pacheco *et al.* (2006) e Machado & Born (2006b), são os únicos registros, apresentando, em ambos casos,  $2n = 50$  cromossomos, mas com divergência na fórmula cariotípica. Em contrapartida, populações de *A. eigenmanniorum* foram caracterizadas por Fauz *et al.*, (1994) em Volta Grande/MG (mostrando populações com  $2n = 50$  cromossomos), Bottegoni (2003) na Argentina ( $2n =$  O primeiro e único dado cariotípico encontrado para *H. luetkenii*, espécie amplamente representativa nas drenagens costeiras do Estado do Rio Grande do Sul (Bemvenuti & Moresco, 2005; Buckup *et al.*, 2007), foi obtido por Machado & Born (2007), em uma população de Rio Grande/RS, onde foi verificado  $2n = 50$  cromossomos. A carência de estudos ressalta uma necessidade de obtenção de mais informações cariotípicas a respeito desta espécie ao longo de sua distribuição.

50), por Mariano & Morelli (2002) em Uberlândia/MG ( $2n=48/50$ ), e por Machado & Born (2006a) em Rio Grande/RS ( $2n = 48$ ), diferindo quanto à fórmula cromossômica, localização de Ag-RONs e distribuição de heterocromatina constitutiva.

*Hyphessobrycon* também é um gênero incerto pertencente à Characidae incluindo mais de 100 espécies (Bertaco & Carvalho, 2005). Foi proposto por Durbin como um subgênero de *Hemigrammus* Gill, sendo diferenciado, mais tarde, pela falta de escamas na nadadeira caudal. Foi extensivamente revisado por Eigenmann em 1921, e esta constitui ainda a única revisão abrangente para o gênero (Bertaco *et al.*, 2007).

Algumas das contribuições que sugerem o reconhecimento deste grupo são baseadas, principalmente, nas semelhanças de padrões de cores e forma da nadadeira (Géry, 1977; Weitzman & Palmer, 1997). Estes dados, por vezes, contêm poucas informações úteis para uma razoável análise filogenética do grupo (Carvalho & Bertaco, 2006). Possivelmente, a falta de dados filogenéticos concisos para o gênero seja a causa do grande número e diversidade de espécies incluídas em *Hyphessobrycon* (Bertaco *et al.*, 2007).

A constatação de variações envolvendo tanto o número quanto à estrutura dos cromossomos de peixes vem aumentando à medida que se ampliam os estudos citogenéticos nesses animais (Fernandes, 2006). Dessa forma, muitos estudos sobre diversidade e polimorfismos cromossômicos em populações naturais ainda se fazem necessários, para a melhor compreensão destes na evolução cariotípica bem como na evolução orgânica de uma espécie (Pazza, 2005).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Ictiofauna Neotropical: Aspectos Gerais**

Dentre os vertebrados, os peixes são aqueles que apresentam o maior número de espécies, 24.600 de acordo com Nelson (1994), o que representa mais da metade de todas as espécies de vertebrados vivos no mundo, estimada em aproximadamente 48.170. Esta provavelmente é a razão para o pouco conhecimento que se tem sobre sistemática, evolução, ecologia, fisiologia e genética deste grupo (Nelson, 1994; Vari & Malabarba, 1998).

As Américas do Sul e Central isolaram-se de outras áreas continentais há cerca de 70 milhões de anos, e comportam uma imensa diversidade de ambientes ecológicos. Essas regiões possuem uma fauna de peixes muito rica (Centofante, 2003), estimada em aproximadamente 8000 espécies (Schaefer, 1998) distribuídas em apenas 0,003% de toda água do planeta (Vari & Malabarba, 1998).

Das 4.000 espécies válidas ocorrentes na ictiofauna Neotropical de água doce (Reis *et al.*, 2003), 2.587 ocorrem no Brasil (Buckup *et al.*, 2007). Os autores ressaltam que este registro não abrange espécies nominais incluídas em sinonímia. Salientam também que houve um incremento de 1.253 espécies descritas num período de um pouco mais de 50 anos transcorridos desde os primeiros registros publicados no catálogo de Fowler, no Brasil, nos anos de 1948, 1950, 1951 e 1954.

O território brasileiro compreende um grande número de bacias hidrográficas tropicais e subtropicais (Buckup *et al.*, 2007). Populações isoladas, principalmente de água doce que habitam rios ou lagos com barreiras físicas e/ou geográficas, tendem a se subdividir, o que resulta em uma fauna de peixes de água doce muito mais diversificada do que as com representação marinha, que incluem 1.297 espécies (Carvalho, 1993; Centofante, 2003; Buckup *et al.*, 2007).

A maior parte dessa diversidade, mais especificamente a sul-americana, pertence a cinco grupos dominantes: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Ciclídeos (Buckup *et al.*, 2007).

### **2.1.1. Ordem Characiforme**

Constituída por 14 famílias (Buckup *et al.*, 2007) e, pelo menos, 1.343 espécies. Destas, cerca de 208 são africanas e o restante provém do Sudoeste dos Estados Unidos, México e das Américas do Sul e Central (Lucena, 1993; Nelson, 1994; Froese & Pauly, 2007), sendo que no Brasil encontram-se 948 (Buckup *et al.*, 2007).

As variações nas estratégias de vida dos Characiformes estão presentes de forma muito evidente, tanto que este grupo exhibe uma divergência fenotípica adaptativa tão grande que não se iguala a nenhuma outra ordem animal (Fink & Fink, 1981).

### **2.1.2. Família Characidae**

Dentro dos Characiforme encontra-se a família Characidae, a maior e mais complexa, compreendendo cerca de 30 subfamílias, 250 gêneros (Britski *et al.*, 1998) e 597 espécies (Buckup *et al.*, 2007). Seus representantes estão alocados no Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Osteichthyes, Subclasse Actinopterygii e Ordem Characiformes (Nelson, 1994).

Popularmente são conhecidos como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros (Britski, 1972) e são coletados com relativa facilidade nos cursos de água, tanto pela riqueza de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados (Daniel-Silva, 1996).

Geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores, possuem escamas, e seu tamanho pode variar desde dois centímetros, como os pequiras, até mais de um metro, como os dourados (Britski, 1972). Nesta família as espécies apresentam hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros e carnívoros) e exploram uma grande variedade de habitats (Britski *et al.*, 1998).

Grande parte das subfamílias de Characidae foi proposta originalmente por Eigenmann, no início do século passado. Posteriormente, foram descritos novos gêneros que não se encaixavam em nenhuma destas subfamílias, logo, até o momento, este grupo não pode ser considerado monofilético (Weitzman & Malabarba, 1998). Desse modo, evidencia-se a necessidade de revisões que possam esclarecer as verdadeiras relações entre os grupos que compõem esta família, como por exemplo,

*Astyanax* e *Hyphessobrycon*, considerados gêneros *Incertae Sedis* entre os Characidae (Peres, 2005).

## 2.2. A Ictiofauna do Banhado do Taim

Segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), existem atualmente no mundo 9.766 unidades de conservação, abrangendo aproximadamente 870 milhões de hectares, distribuídas em 149 países. Entendem-se como unidades de conservação todas as áreas protegidas que possuem regras próprias de uso e de manejo, com a finalidade própria de preservação e proteção de espécies vegetais ou animais, de tradições culturais, de belezas paisagísticas, ou de fontes científicas, dependendo da categoria em que se enquadram (Schenini *et al.*, 2004).

A Estação Ecológica do Taim (ESEC/TAIM) possui uma área de 33.995 hectares e estende-se entre municípios do Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, no Estado do Rio Grande do Sul (Kurts *et al.*, 2003). Considerado um dos mais importantes sítios ecológicos do país é constituída pelas Lagoas dos Patos, Mirim, Mangueira e um sistema de lagoas menores, como Nicola e Flores (Braga & Abdallah, 2004) sendo seu sistema hidrológico o único que cerca uma variedade de habitats, como praias, dunas, florestas, gramados e, especialmente, banhados (Motta-Marques *et al.*, 2002).

A Lagoa Mangueira é a principal fonte de alimentação de água do banhado do Taim, sendo o sentido geral do escoamento da região para o norte, atravessando o banhado e seguindo em direção a Lagoa Mirim (Braga & Abdallah, 2004).

Porto de paisagens tanto heterogêneas como produtivas e com uma diversidade biológica excepcional, como orquídeas, figueiras nativas, cisne-de-pescoço-preto, ratão-do-banhado, jacaré-de-papo-amarelo e peixes como penharol e traíra, acabou motivando autoridades federais brasileiras a considerar parte deste sistema hidrológico como Estação Ecológica do Taim através do Decreto nº 92.963 em 21 de Julho de 1986 (Braga & Abdallah, 2004; Garcia *et al.*, 2006a), a fim de amenizar os impactos antropogênicos expressivos na região, como captação de água para irrigação de arroz e atividades pesqueiras (Motta-Marques *et al.*, 2002).

Segundo Garcia *et al.* (2006a), os peixes geralmente representam um importante componente biológico em banhados de água doce, exercendo um papel

crucial no fluxo de energia entre baixos e altos níveis tróficos, no controle “top-down” da via de predação. São um grupo importante por sustentar alta diversidade que, contudo, têm sido pobremente estudado nesse ecossistema. As investigações relacionadas aos peixes desta região referem-se a listas taxonômicas (Buckup & Malabarba, 1983; Grosser *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 2006a), descrição de novas espécies (Reis, 2003), alimentação (Moresco & Bemvenuti, 2005), estrutura e dinâmica alimentar (Garcia *et al.*, 2006b; Quintela *et al.*, 2008).

Em recente revisão da ictiofauna nos banhados do Taim, Garcia *et al.* (2006a) indicaram a presença de 62 espécies, distribuídas em 24 famílias, com Characidae (19 espécies) e Cichlidae (sete espécies) mostrando as maiores riquezas de espécies, conforme Tabela 1 em anexo.

### **2.3. A Ictiofauna do Arroio Bolaxa**

Criada em 2005 pela Lei Municipal 6.084, a Área de Proteção Ambiental da Lagoa Verde (APA da Lagoa Verde) apresenta uma área superficial de aproximadamente 510 hectares e está localizada no município de Rio Grande, região sul da planície costeira do Rio Grande do Sul. É delimitada por uma faixa de 200m a partir do nível médio da própria Lagoa Verde e uma faixa de 100m de cada margem dos arroios Bolaxa e Senandes e do canal São Simão, que liga a lagoa ao Saco da Mangueira, no estuário da Lagoa dos Patos (Cabral & Souza, 2005; Behling, 2007).

Os ecossistemas existentes nesta APA, que formam a chamada Restinga Litorânea, representam a última área de marismas, banhados, arroios, matas e dunas interiores preservados dentro da zona urbana do município (Nema, 1994; Batista *et al.*, 2007).

O Arroio Bolaxa é de extrema importância na região, em razão do seu volume d'água, número e abundância de espécies (Tagliani, 1994; Batista *et al.*, 2007; Behling, 2007) mas sofre considerável impactação antropológica, como acúmulo de lixo, exploração de espécies nativas vegetais, pesca predatória, grande especulação imobiliária em função da expansão do eixo Rio Grande/Cassino, além de ser seccionado pela RS 734, que liga o centro da cidade ao balneário (Nema, 1994; Batista *et al.*, 2007).

Com fluxo suave, suas águas abrigam e alimentam 27 espécies de peixes e nas matas de sua margem encontram-se diversos tipos de pássaros (NEMA, 2008),

destacando-se também espécies ameaçadas de extinção, como as encontradas na Lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul - *Butia capitata*, *Tillandsia aeranthos* e *Tillandsia usneoides* (Batista *et al.*, 2007), e animais ameaçados - *Lontra longicaudis* (segundo a portaria do IBAMA no 1522, de 19/12/89), e *Austrolebias minuano* Costa & Cheffe 2001, classificado como “em perigo”, conforme Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul (Reis *et al.*, 2003; Porciuncula *et al.*, 2006).

O único registro a respeito da ictiofauna desta região foi feito por Tagliani em 1994, em três riachos da planície costeira do RS – Arroio Martins, Arroio Senandes e Arroio Bolaxa - apresentando Characiformes como grupo dominante, seguido pelos Atheriniformes e Perciformes. Pertencente a família Characidae, *Hyphessobrycon luetkenii* foi a espécie mais abundante e representativa (presente em 77% das capturas), inclusive nos meses de inverno, onde a ocorrência total de peixes mostra-se bastante reduzida. O segundo gênero mais representativo nos arroios foi *Astyanax*, com *A. eigenmanniorum* como principal representante (Tagliani, 1994) (Tabela 2 em anexo).

Dados desatualizados a respeito da ictiofauna do Arroio Bolaxa representam uma lacuna no conhecimento das espécies ocorrentes, uma vez que é comum a pesca com redes região e na Laguna dos Patos, praticada sem a devida fiscalização dos órgãos competentes, o que pode afetar diretamente a diversidade e densidade de peixes deste local.

## **2.4. Considerações sobre a citogenética**

Como uma ferramenta para estudos filogenéticos, a citogenética pode colaborar ou corroborar com dados específicos de espécies desconhecidas ou morfologicamente muito semelhantes. Além disso, as análises citotaxonômicas contribuem para o estudo da evolução, pelo fato do material genético estar contido nos cromossomos (Guerra, 1988), e ainda, segundo Oliveira *et al.*, (2008) e Araújo & Morelli (2000), fornecem informações para o entendimento de questões de sistemática, de hibridação inter e intraespecífica; de polimorfismo e de poliploidia cromossômica.

Os autores salientam também a relevante contribuição que a citogenética provê acerca dos mecanismos de determinação sexual e evolução de cromossomos sexuais, assim como a descrição de cromossomos B.

Como muitas espécies apresentam número e morfologia cromossômica semelhantes, além desses dados, marcadores cromossômicos mais aprimorados têm sido buscados como uma ferramenta para comparação intra e interespecífica. Por meio de técnicas convencionais, como coloração com Giemsa, bandamentos C, e localização das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs) e, mais recentemente, através de métodos mais apurados, como clivagem com enzimas de restrição, e localização de sequências específicas através da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) se pode fornecer contribuições importantes para o entendimento da evolução e estrutura dos cromossomos (Kantek, 2005; Pazza, 2005).

#### **2.4.1. Colorações e marcadores moleculares**

A análise cromossômica convencional, feita com solução Giemsa tamponada (pH 6,8) a 5% (Artoni *et al.*, 2000), cora uniformemente os cromossomos permitindo, dessa forma, estabelecer o número diplóide da espécie, bem como sua fórmula cariotípica.

A coloração com nitrato de prata, em condições adequadamente controladas, é um método altamente seletivo para coloração de nucléolos interfásicos e regiões organizadoras de nucléolos (constrições secundárias ou outras regiões com sítios responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal, também denominados RON) em cromossomos. A impregnação de nitrato de prata foi descrita por Goodpasture e Bloom em 1975 para evidenciar RONS em cromossomos humanos, e, por meio de modificações desta técnica, feitas por Howell & Black (1980), foi possível visualizar a variabilidade destas regiões nos cromossomos de peixes (Kantek, 2005; Pazza, 2005).

Nas regiões de DNA ribossomal (DNAr), ocorrem variações que possibilitam a diferenciação não só de espécies, como também de populações. Através da coloração com nitrato de prata, observa-se a distribuição de RONS quanto ao número, localização, atividade e quantidade de DNAr. As RONS podem ser simples, presentes em um par cromossômico ou múltiplas, presentes em mais de um par de cromossomos (Araújo & Morelli, 2000).

A grande limitação desta técnica é o fato do nitrato de prata marcar apenas as RONS que foram ativamente transcritas durante as intérfases precedentes às metáfases analisadas, não possibilitando, muitas vezes, a demonstração do número

real de RONS (Fernandes, 2006). Dessa forma, as RONS têm sido melhor caracterizadas pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), uma vez que determina a posição do DNAr independentemente de sua atividade. O DNAr é organizado em eucariotos superiores dentro de duas distintas classes gênicas: a classe maior (DNAr 45S) que transcreve os RNA ribossomais (RNAr) 18S, 5.8S, e 28S e a classe menor (DNAr 5S) que transcreve o RNAr 5S. Sítios ativos de DNAr 45S correspondem as RONS nos cromossomos, enquanto DNAr 5S não estão presentes na RON (Artoni *et al.*, 2000; Fernandes, 2006).

Trata-se de uma técnica de DNA recombinante que não necessita de isótopos radioativos, o que a torna realizável em qualquer laboratório padrão de citogenética. Este procedimento tornou possível detectar seqüências específicas de ácidos nucléicos em cromossomos, células e tecidos morfológicamente preservados, baseando-se na formação *duplex*, sob condições bem definidas, de um fragmento de ácido nucléico de fita simples modificado (sonda ou *probe*) e sua seqüência complementar (seqüência alvo) em um espécime biológico fixado (Naoum, 2001).

A técnica FISH envolve a preparação de sondas específicas de DNA, marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados que são diretamente fluorescentes (método direto) ou podem ser detectados pela ligação a uma molécula fluorescente (método indireto), visualizados sob luz ultravioleta. Tais sondas de cadeias simples de DNA são hibridizadas com os cromossomos metafásicos como nas técnicas habituais de citogenética, mas também diretamente com os cromossomos de células interfásicas. Após a hibridização *in situ*, as lâminas formadas podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência, e as alterações cromossômicas, se presentes, identificadas (Pinkel *et al.*, 1986; Naoum, 2001).

Assim, é possível identificar alterações além da resolução visual, como as microdeleções, ou quando um rearranjo cromossômico envolve uma região camuflada na leitura pela banda (rearranjo crítico) ou de difícil interpretação (como rearranjos dentro do cromossomo). Realizando FISH também é possível detectar anormalidades numéricas e estruturais em células metafásicas e interfásicas, como aneuploidias (alterações no número de cromossomos) e translocações (Pinkel *et al.*, 1986; Naoum, 2001).

Outra metodologia muito utilizada como auxílio no pareamento de cromossomos homólogos, é a detecção da heterocromatina constitutiva (também conhecida como bandamento C proposta por Sumner (1972). Esta técnica permite ao

pesquisador detectar rearranjos cromossômicos, diferenças nos padrões de localização da heterocromatina e outros eventos que venham contribuir nos estudos de evolução cariotípica de uma espécie em questão (Araújo & Morelli, 2000).

#### **2.4.2. Citogenética de peixes**

Os primeiros estudos citogenéticos em peixes foram publicados por Retzius & Kastschenko em 1890 (apud Denton, 1973). Contudo, até a descoberta da aplicação dos tratamentos hipotonizantes para estudo das células em divisão, pouco foi feito nesta área. Somente após o início da década de 60, os trabalhos em citogenética de peixes puderam apresentar dados precisos a respeito do número e da forma dos cromossomos (Kantek, 2005).

No Brasil, a citogenética de peixes teve seu início na década de 1970, com pesquisas em espécies de *Astyanax* realizadas por Jim & Toledo (1975), em Pimelodidae (Toledo & Ferrari, 1976) e em Cichlidae e Loricariidae (Michele *et al.*, 1977a e 1977b). A partir de então alguns grupos de pesquisas se formaram, estando hoje presentes em vários estados brasileiros, alguns já bem consolidados, enquanto outros são mais recentes e/ou em estado de consolidação (Artoni *et al.*, 2000).

O desenvolvimento geral da citogenética de peixes tem sido bastante grande nas últimas décadas, entretanto, estima-se em torno de 10% de espécies com cariótipos conhecidos dentre as 24.600 espécies de peixes existentes (Gold *et al.*, 1990; Ozouf-Costaz & Foresti, 1992; Nelson, 1994). A associação entre a Citogenética e a Sistemática, tem se mostrado, em muitos casos, extremamente profícua, complementando os estudos de identificação, distribuição e de relacionamento entre grupos naturais, normalmente baseados apenas em caracteres morfométricos e merísticos (Ozouf-Costaz & Foresti, 1992).

O gênero mais estudado citogeneticamente entre os Characidae é o *Astyanax*, pertencente à subfamília Tetragonopterinae (Araújo & Morelli, 2000). Têm recebido atenção especial por parte de alguns pesquisadores devido às suas características biológicas e citogenéticas, existindo casos onde diferentes populações de uma mesma espécie têm mostrado diferenças morfológicas e cariotípicas (Kantek, 2005).

Este grupo tem como principais características nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não

protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de três vezes menor que o comprimento padrão e escamas de tamanho normal cobrindo apenas os raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1998).

Em contrapartida, apesar da grande diversidade de espécies que compõe *Hyphessobrycon*, sabe-se muito pouco a respeito dos dados citogenéticos, já que geralmente são descritos apenas os números cromossômicos haplóides (Centofante *et al.*, 2003).

Os representantes de *Hyphessobrycon* não ultrapassam de 60 mm de comprimento (Lima & Gerhard, 2001). São caracterizados por uma linha lateral interrompida e os lobos da nadadeira caudal desprovidos de escamas (Britski, 1972). Muitas de suas espécies apresentam um colorido particular, despertando um grande interesse para aquarofilia (Centofante *et al.*, 2003).

A evolução destes grupos de peixes está provavelmente relacionada a alterações cromossômicas, como rearranjos e inversões (Peres, 2005). Logo, estudos sobre diversidade e variações cromossômicas em populações naturais ainda se fazem necessários, a fim de melhor compreender a evolução cariotípica, bem como a evolução orgânica de uma espécie (Pazza, 2005).

#### 2.4.2.1. Estado atual da citogenética de *Astyanax*: ênfase em *A. eigenmanniorum* e *A. jacuhiensis*

Os dados citogenéticos disponíveis têm revelado uma diversidade cariotípica acentuada para a subfamília Tetraodoninae, cujos representantes apresentam uma variabilidade compreendida entre  $2n = 36$  a  $2n = 52$  cromossomos (Souza, 2003). Entre as espécies de *Astyanax*, o número diplóide varia de  $2n = 36$  em *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001) a  $2n = 50$  em outras espécies do gênero (Kantek *et al.*, 2007a), como *A. jacuhiensis* (Machado & Born, 2006b).

Além da variação do número diplóide, há casos de populações de uma mesma espécie que apresentam também fórmulas cariotípicas diferentes, como *A. scabripinnis* e *A. eigenmanniorum*.

Diversas populações do “complexo *scabripinnis*” de espécies têm sido profusamente estudadas, registrando-se diferenças cromossômicas interpopulacionais tanto no nível numérico quanto macro e micro estruturais (Fernandes & Martins-

Santos, 2002b). Muitos estudos têm demonstrado a presença de várias formas de cromossomos supranumerários, casos de triploidia natural, além de variações no número cromossômico e/ou variações nas fórmulas cromossômicas neste grupo (Pazza, 2005). Oliveira-Pinto *et al.* (2002) descreveram para populações de *A. scabripinnis* do rio Puimhi (MG)  $2n = 46$ . Fernandes & Martins-Santos (2002b), analisando populações da bacia do rio Ivaí (PR), encontraram  $2n = 48$ , enquanto que a maior parte dos trabalhos descrevem um  $2n = 50$ , como ilustra a Tabela 3 extraída de Machado (2006) que segue em anexo. A hipótese de que existam ao menos três espécies no “complexo scabripinnis” é baseada na ausência de híbridos naturais em populações com  $2n = 46$ , 48 ou 50 cromossomos, encontradas em simpatria e/ou sintopia (Pazza, 2005).

Populações de *A. eigenmanniorum* foram caracterizadas por Fauz *et al.* (1994) em Volta Grande/MG ( $2n = 50$ ), Bottegoni (2003) na Argentina ( $2n = 50$ ), por Mariano & Morelli (2002) em Uberlândia/MG ( $2n = 48/50$ ), e por Machado & Born (2006a) em Rio Grande/RS ( $2n = 48$ ), diferindo também quanto à fórmula cromossômica, localização de Ag-RONs e distribuição de heterocromatina constitutiva. Dados citogenéticos disponíveis para este grupo sugerem que este seja outro “complexo de espécies” uma vez que, devido à distribuição do grupo compreender desde o Rio Grande do Sul até Argentina, incluindo a bacia do Rio Paraná, conforme Bemvenuti & Moresco (2005) e Buckup *et al.* (2007), sua ocorrência em córregos de Minas Gerais, com variação do número cromossômico, sugere uma revisão taxonômica mais detalhada.

Há ainda grupos que mantêm seu número diplóide, porém, apresentam diferenças inter e intrapopulacionais nas fórmulas cariotípicas, indicando que rearranjos estruturais são os principais responsáveis pela diversificação ocorrida durante a evolução destas espécies (Porto & Martins-Santos, 2002). É o caso de *A. jacuhiensis*, como relatam os trabalhos de Pacheco *et al.* (2006) e Machado & Born (2006b). Analisando populações provenientes de duas regiões distintas do Sul do Brasil (Rio Guaíba, Porto Alegre/RS e canal de Santa Isabel, Rio Grande/RS, respectivamente), os autores descreveram  $2n = 50$ , com fórmulas cariotípicas interpopulacionais distintas, sendo estes os únicos dados disponíveis para esta espécie que ainda encontra-se pouco explorada citogeneticamente.

Devido à grande diversidade de espécies que este gênero apresenta, muitas ainda estão sendo descritas e caracterizadas citogeneticamente (Ramos *et al.*, 2006), como também ilustra a Tabela 3 em anexo.

#### 2.4.2.2. Estado atual da citogenética de *Hyphessobrycon*: ênfase em *H. luetkenii*

Apesar da grande diversidade de espécies que compõe este gênero, os dados citogenéticos são ainda escassos, uma vez que, geralmente são descritos apenas os números cromossômicos haplóides (Centofante *et al.*, 2003), ou os estudos se concentram em descrição de novas espécies (Bertaco *et al.*, 2007; Benine & Lopes, 2008; Carvalho *et al.*, 2008). Contudo, observa-se uma variabilidade cromossômica que compreende  $2n = 46$  a  $2n = 52$ , com maior frequência observada para  $2n = 48$  e  $2n = 50$  (Centofante *et al.*, 2003).

Os registros citogenéticos são raros para o grupo, mostrando populações de *H. anisitsi* provenientes da Bacia do Alto Paraná (Centofante *et al.*, 2003) com  $2n = 50$  cromossomos e *H. griemi* e *H. reticulatus* ocorrentes no rio Itimirim/SP, com  $2n = 48$  e 50, respectivamente (Carvalho *et al.*, 2002).

Espécie abundante nos córregos do Sul do Brasil, *H. luetkenii* foi descrita cariotipicamente por Machado & Born (2007). Os autores relataram  $2n = 50$  cromossomos para uma população ocorrente em um lago de natureza antrópica, em Rio Grande/RS, sendo este o primeiro trabalho a descrever seu número e fórmula cromossômica, bem como localização de Ag-RONs e distribuição de heterocromatina constitutiva. Fica evidente a importância da ampliação das análises cromossômicas deste grupo em um corpo d'água representativo na região, podendo, dessa forma, avaliar a distribuição e evolução de *H. luetkenii*.

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar citogeneticamente as espécies de *A. eigenmanniorum*, *A. jacuhiensis* e *H. luetkenii* do banhado do Taim e Arroio Bolaxa.

#### 3.1. Objetivos específicos

1. Caracterizar citogeneticamente *A. eigenmanniorum* e *A. jacuhiensis* ocorrentes nas Lagoas Flores e Nicola do banhado do Taim, quanto ao número diplóide, fórmula cariotípica e regiões organizadoras de nucléolo (RONS);
2. Caracterizar citogeneticamente *A. eigenmanniorum* do Arroio Bolaxa quanto ao número diplóide, fórmula cariotípica e regiões organizadoras de nucléolo (RONS);
3. Caracterizar citogeneticamente *Hyphessobrycon luetkenii* ocorrente no Arroio Bolaxa, através do número diplóide, fórmula cariotípica, distribuição de heterocromatina constitutiva (bandamento C), localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) através de nitrato de prata e hibridação fluorescente *in situ* (FISH), através da sonda DNAr 18S;
4. Avaliar a hipótese da existência de polimorfismos cromossômicos e/ou variações inter/ intrapopulacionais das espécies pertencentes aos diferentes lagos;
5. Contribuir com dados citogenéticos que possam servir de auxílio para um melhor entendimento da taxonomia destes grupos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Locais de coleta e espécies estudadas

Durante o período de setembro/2007 a maio/2008, foram coletados no banhado do Taim, nas Lagoas Flores ( $32^{\circ} 32' 45''$  S;  $52^{\circ} 31' 4''$  W) e Nicola ( $32^{\circ} 32' 32''$  S;  $52^{\circ} 32' 26''$  W - Figuras 1 e 2), 14 exemplares, cinco machos e nove fêmeas, de *A. eigenmanniorum* (Figura 3a) e 35 exemplares, 20 machos e 15 fêmeas, de *A. jacuhiensis* (Figura 3b).

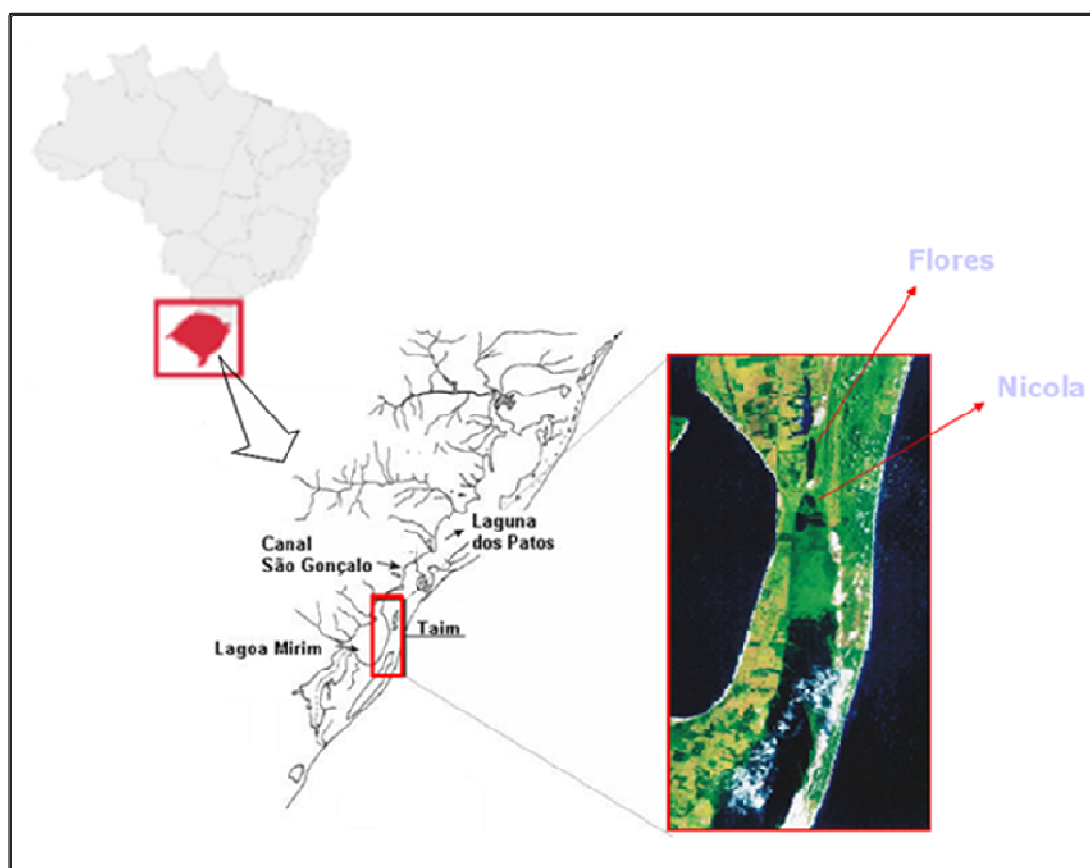


**Figura 1.** Mapa hidrográfico parcial da região Sul, evidenciando a Estação Ecológica do Taim e os locais de coleta: Lagoa Flores ( $32^{\circ} 32' 45''$  S;  $52^{\circ} 31' 4''$  W) e Nicola ( $32^{\circ} 32' 32''$  S;  $52^{\circ} 32' 26''$  W).



**Figura 2.** Lagoa Flores ( $32^{\circ} 32' 45''$  S;  $52^{\circ} 31' 4''$  W - **a**) e Nicola ( $32^{\circ} 32' 32''$  S;  $52^{\circ} 32' 26''$  W - **b**).



**Figura 3.** Exemplos de *Astyanax*. *A. eigenmanniorum* (a); *A. jacuhiensis* (b). Barra = 1 cm.

As coletas no Arroio Bolaxa ( $32^{\circ}09.740''S$ ;  $52^{\circ}11.270''W$  - Figura 4) ocorreram entre novembro/2007 e novembro/2008, e totalizaram em 14 exemplares de *H.luetkenii* (oito machos e seis fêmeas - Figura 5) e 12 de *A. eigenmanniorum* (sete machos e cinco fêmeas).

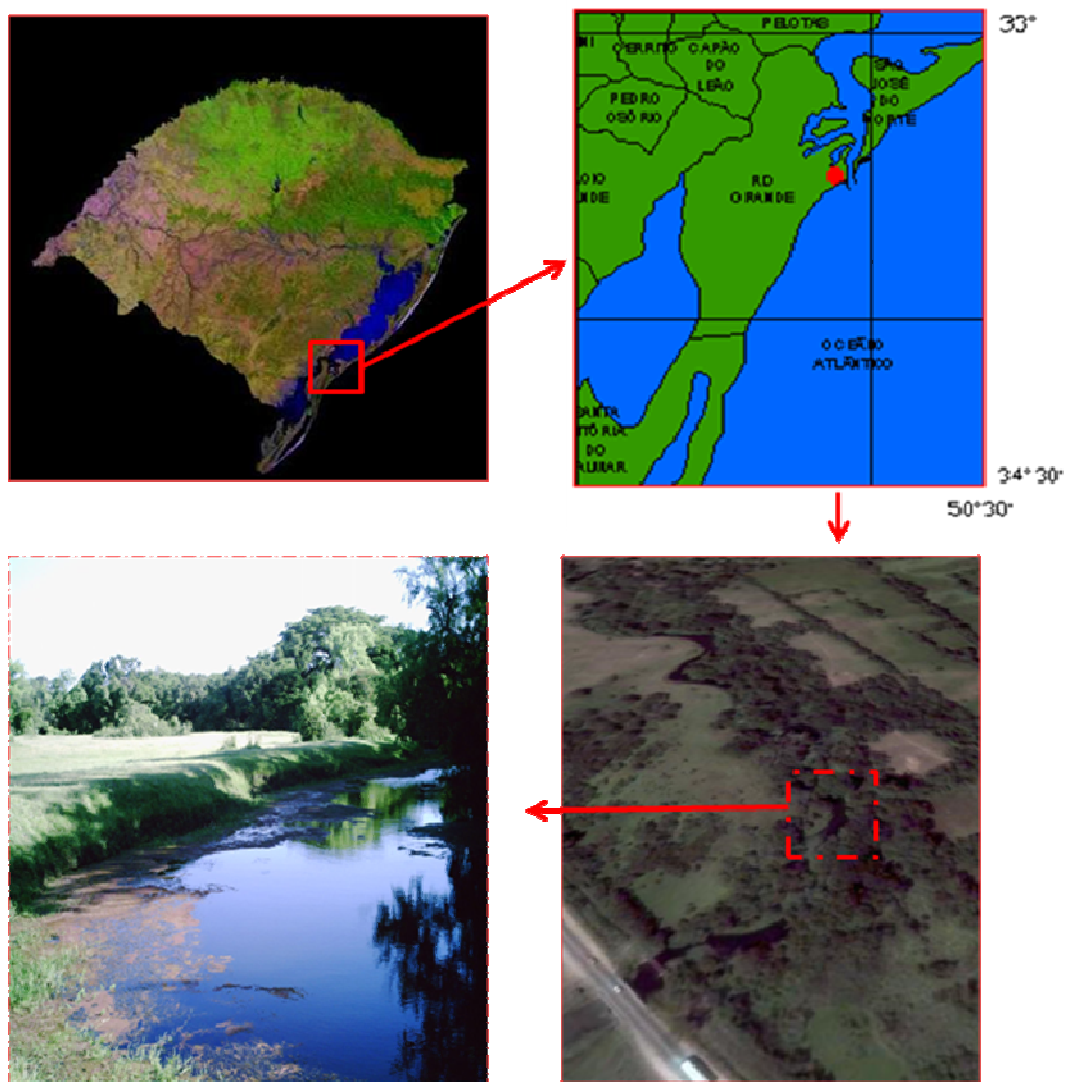


**Figura 4.** Mapa do rio grande do sul evidenciando o Arroio Bolaxa, pertencente ao município de rio grande ( $32^{\circ}09.740''S$  ;  $52^{\circ}11.270''W$ ).



**Figura 5.** Exemplar de *H. luetkenii*. Barra = 1 cm.

A captura dos exemplares foi realizada com tarrafa malha 12 mm (Figura 6a) e armadilhas do tipo covó (Figura 6b).

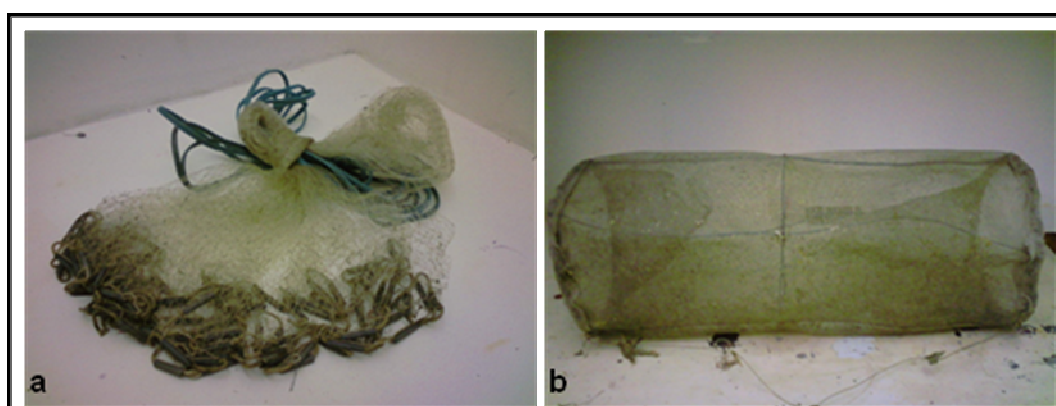


**Figura 6.** Materiais utilizados para coleta dos peixes; tarrafa malha 12 mm (a); armadilha do tipo covó (b).

Estes eram transportados vivos em baldes com tampa (Figura 7a) até o Laboratório de Genética da Furg e mantidos em tanques de 250 e 500 litros (Figura 7b), com aeração constante e temperatura regulada de 25 °C até o processamento, o que variava de um a dois dias.



**Figura 7.** Transporte e acondicionamento dos espécimes: balde com tampa (a); tanques 250 e 500l (b).

Após o procedimento para obtenção das metáfases, os espécimes foram preservados em formol 10% durante três dias e posteriormente transferidos para álcool 70%. Cada exemplar foi identificado e depositado no Museu de Ictiologia da UFRGS, RS, seguindo os registros UFRGS 9830, UFRGS 9831, UFRGS 9834, UFRGS 10645 e UFRGS 10646.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Obtenção dos cromossomos mitóticos - tratamento “*in vivo*”**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir da suspensão de células do rim anterior, usando a técnica convencional de “air drying” descrita por Bertollo *et al.*, (1978), com algumas modificações:

- 1º.** Injetar intra-peritonealmente, entre as nadadeiras peitoral e ventral, solução aquosa de colchicina (0,025%) correspondendo a 1ml/100g do peso do animal;
- 2º.** Colocar o peixe em aquário aerado por cerca de 60 minutos;
- 3º.** Transcorrido o tempo, anestesiá-lo, imergindo-o em solução de éter a 10%;
- 4º.** Sacrificá-lo e retirar seu rim anterior;
- 5º.** Lavar o material retirado em solução hipotônica de KCl (0,075M), transpondo para pequenas cubas de vidro contendo aproximadamente 10 ml da mesma solução;
- 6º.** Fragmentar o material usando seringa hipodérmica sem agulha, por meio de leves aspirações e expirações do material, até que se obtenha uma solução homogênea, a fim de facilitar a separação das células;
- 7º.** Incubar a solução à 37°C por 35 minutos;
- 8º.** Ressuspender o material, vagarosamente, usando uma pipeta Pasteur e transferir a solução para um tubo de centrífuga;
- 9º.** Pingar algumas gotas de fixador (metanol: ácido acético – 3:1) recém preparado e ressuspender o material. Centrifugá-lo por 10 minutos a 1200 rpm e descartar o sobrenadante com a pipeta Pasteur;
- 10º.** Adicionar ao tubo 5-7 ml do fixador preparado, deixando escorrer pelas paredes deste e ressuspender novamente o material usando a pipeta Pasteur;

**11º.** Repetir por duas vezes os itens sete e oito, sendo que, após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, adicionar 1 ml do fixador no tubo, ressuspender bem o material e transferi-lo para frascos do tipo “ependorff” ;

**12º.** Armazenar os frascos à 20°C negativos.

#### **4.2.2. Coloração Convencional – Giemsa**

Para a análise cromossômica, as lâminas preparadas com a suspensão celular foram coradas com solução Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), conforme Bertollo *et al.*, (1978):

**1º.** Pingar três gotas da suspensão obtida em lâmina recém lavada e esquada com água à 70°C, deixando escorrer o excesso de material inclinando a lâmina sobre um papel absorvente;

**2º.** Secar ao ar livre e corar com Giemsa 5% em tampão fosfato, pH 6,8, durante 10 minutos;

**3º.** Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar para posterior análise no microscópio.

#### **4.2.3. Detecção da heterocromatina constitutiva: Banda C**

A heterocromatina constitutiva foi visualizada pelo método de bandamento C, segundo Sumner (1972), com pequenas modificações:

**1º.** Colocar a lâmina preparada em solução de HCl 0,2N, em temperatura ambiente, por 5 minutos;

**2º.** Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;

**3º.** Colocar a lâmina em solução de 2 x SSC por 15 minutos à 60°C;

**4º.** Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;

- 5º. Colocar a lâmina em solução de hidróxido de bário a 5% ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) à 60°C em banho-maria por 30 segundos;
- 6º. Imergir a lâmina rapidamente em HCl 1N e lavar com água destilada;
- 7º. Colocar a lâmina em solução de 2 x SSC por 30 minutos à 60°C;
- 8º. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;
- 9º. Corar o material com Giemsa 5% durante 12 minutos.
- 10º. Análise microscópica, sendo as metáfases que apresentarem cromossomos com melhor morfologia, condensação, dispersão e marcação, fotografadas e copiadas para montagem dos cariótipos.

#### **4.2.4. Coloração com nitrato de prata – Ag-RONs**

As regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) foram evidenciadas pela técnica descrita por Howell & Black (1980), porém, com algumas modificações, permitindo assim uma maior exatidão na detecção dos pares cromossômicos marcados com nitrato de prata:

- 1º. Pingar uma gota de material sobre a lâmina recém limpa e secar ao ar;
- 2º. Corar com Giemsa 5% por oito minutos;
- 3º. Observar no microscópio, fotografar e marcar na lâmina ponto as metáfases com melhor morfologia, dispersão e condensação cromossômica;
- 4º. Imergir a lâmina em fixador Carnoy (metanol: ácido acético – 3:1) a fim de descorá-la;
- 5º. Tratar a lâmina durante três minutos em HCl 0,2N a 60°C e secar ao ar;
- 6º. Pingar uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de nitrato de prata 50% (1g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina;
- 7º. Cobrir com lamínula;

- 8°. Levar a lâmina á estufa a 60°C em uma placa de *Petri* forrada com papel filtro umedecido, até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada;
- 9°. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar;
- 10°. Com auxílio da lâmina ponto, procurar as metáfases marcadas no microscópio;
- 11°. Fotografar as metáfases que apresentarem cromossomos com melhor marcação para posterior montagem dos cariótipos.

#### **4.2.5. Estudos cariotípicos**

Para cada exemplar, foi contado um mínimo de 30 metáfases, a fim de caracterizar o número cromossômico da espécie, bem como verificar a presença/ausência de diferenças estruturais interespecíficas.

As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Zeiss JenaMed2 e as metáfases mitóticas que apresentaram melhor morfologia, condensação e dispersão dos cromossomos foram fotografadas e copiadas para posterior montagem do cariótipo. O filme utilizado foi ImageLink da Kodak, ajustado para ASA 25.

#### **4.2.6. Revelação e cópias fotográficas**

Os negativos foram revelados e as imagens copiadas no próprio Laboratório de Genética. Com o filme no tanque de revelação foram seguidas as etapas de revelar - solução pura de Dektol por quatro minutos; interromper – rápida lavagem em solução de ácido acético a 2% e fixar - fixador por 10 minutos. As soluções Dektol e Fixadora foram comercializadas pela Kodak.

Após a obtenção do negativo, as imagens foram copiadas, obedecendo a sequência: passagem de luz para o papel fotográfico por 50 segundos; imersão do papel em Dektol diluído (água destilada: Dektol – 4:1) até surgir a imagem; mergulho imediato no interruptor; lavagem em rápida em água corrente; imergir em solução fixadora por 10 minutos; lavagem em água corrente por uma hora e secar ao ar.

Logo, as fotos foram analisadas, ou seja, os cromossomos foram recortados e pareados a fim de montar os cariótipos.

#### **4.2.7. Identificação cromossômica**

A identificação cromossômica baseou-se no tamanho e morfologia dos cromossomos que são classificados através da relação dos braços (RB) curto/longo de acordo com a posição do centrômero seguindo-se Levan *et al.*, (1964):

RB = 1,00 – 1,70 = metacêntricos (M)

RB = 1,71 – 3,00 = submetacêntricos (SM)

RB = 3,01 – 7,00 = subtelocêntricos (ST)

RB = a partir de 7,1 = acrocêntricos (A)

Os cromossomos foram medidos com auxílio do programa *MicroMeasure*® (Reeves & Tear, 2000). Para cálculo do Número Fundamental de braços (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados de dois braços, enquanto os acrocêntricos constituídos por um único braço.

#### **4.2.8. Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas DNAr 18S**

A metodologia empregada foi segundo Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. A sonda de DNA ribossômico do fragmento 18S (cerca de 1800pb), foi obtida a partir de amplificação por polimerização em cadeia (PCR) dessa sequência do DNA genômico do peixe *Prochilodus lineatus* utilizando os *primers* NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTACCTACGG-3' (HATANAKA, 2000).

Para marcação da sonda utilizou-se o procedimento de “nick translation” com uso do Kit Bionick Labeling System Gibco, conforme as etapas::

- 1º.** Lavar das lâminas, contendo as preparações cromossômicas, em tampão PBS 1x durante 5 minutos, em temperatura ambiente com agitação;
- 2º.** Desidratar em série alcoólica (70, 85 e 100%) por 5 minutos cada;
- 3º.** Incubar as lâminas em solução com 90µL de RNase 10mg/mL (0,4% RNase/2xSSC), sob lamínula a 37°C por 1hora em câmara úmida;
- 4º.** Lavar das lâminas três vezes por 5 minutos cada com 2 x SSC e em PBS 1x durante 5 minutos;
- 5º.** Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x com MgCl<sub>2</sub> 50mM por 10 minutos à temperatura ambiente e lavar em PBS 1x por 5 minutos;
- 6º.** Desidratar as lâminas em série de etanol gelado (70, 85 e 100%) por 5 minutos cada;
- 7º.** Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2 x SSC a 70°C por 5 minutos;
- 8º.** Desidratar o material em série alcoólica 70% (a temperatura de –20°C), 85% e 100% durante 5 minutos cada;
- 9º.** Montar a lâmina com 50µL de solução de hibridação coberta por uma lamínula. A solução deve ainda ser colocada em banho-maria a 70°C para desnaturar a sonda;
- 10º.** Incubar as lâminas em câmara úmida a 37°C por 12 horas (overnight) e passado o tempo, lavar duas vezes as lâminas em formamida 50% em 2 x SSC pH 7,0 por 10 minutos, sob agitação a 42°C;
- 11º.** Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1 x SSC a 60°C, por 5 minutos cada e logo por 5 minutos em solução de Tween 20 (0,05%/ 2 x SSC);
- 12º.** Incubar as lâminas em tampão NFDM (*non fat dry milk*) 5%/4 x SSC por 15 minutos;
- 13º.** Lavar as lâminas duas vezes por 5 minutos cada com Tween 20;
- 14º.** Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,25µg FITC/µL NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

- 15°.** Lavar as lâminas por três vezes com Tween 0,5%/4 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
- 16°.** Incubar as lâminas com 90 µl de anti-avidina (7µL anti-avidina/700µL NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- 17°.** Lavar as lâminas por três vezes com Tween 0,5%/4 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
- 18°.** Repetir itens 14 e 15;
- 19°.** Desidratar as lâminas em série de etanol gelado (70, 85 e 100%) durante 5 minutos sob agitação;
- 20°.** Montar as lâminas com 25µL para cada solução de iodeto de propídeo (proporção de 25µL de antifading com 1µL de iodeto de propídeo concentrado em 50µg/mL);
- 21°.** Analisar em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro azul (450-490nm de comprimento de onda).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Populações de *A. eigenmanniorum* do pertences ao banhado do Taim e Arroio Bolaxa

Os espécimes de *Astyanax eigenmanniorum* analisados do banhado do Taim e do Arroio Bolaxa apresentaram  $2n = 48$  cromossomos com o número fundamental (NF) igual 86. O cariótipo é constituído por quatro pares de cromossomos metacêntricos, nove pares de cromossomos submetacêntricos, seis pares de cromossomos subtelocêntricos e cinco pares de cromossomos acrocêntricos, em ambas populações, sem evidência de heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figuras 8 e 9, respectivamente). O primeiro par de metacêntricos é o maior do complemento.

As regiões organizadoras de nucléolos evidenciadas por marcações com nitrato de prata (Ag-RONs) foram localizadas nas regiões teloméricas do braço longo do par seis e no braço curto do par 11, ambos submetacêntrico, tanto na população do banhado do Taim como na do arroio Bolaxa (Figuras 10 e 11). Não foram observadas variações intra ou interindividuais.

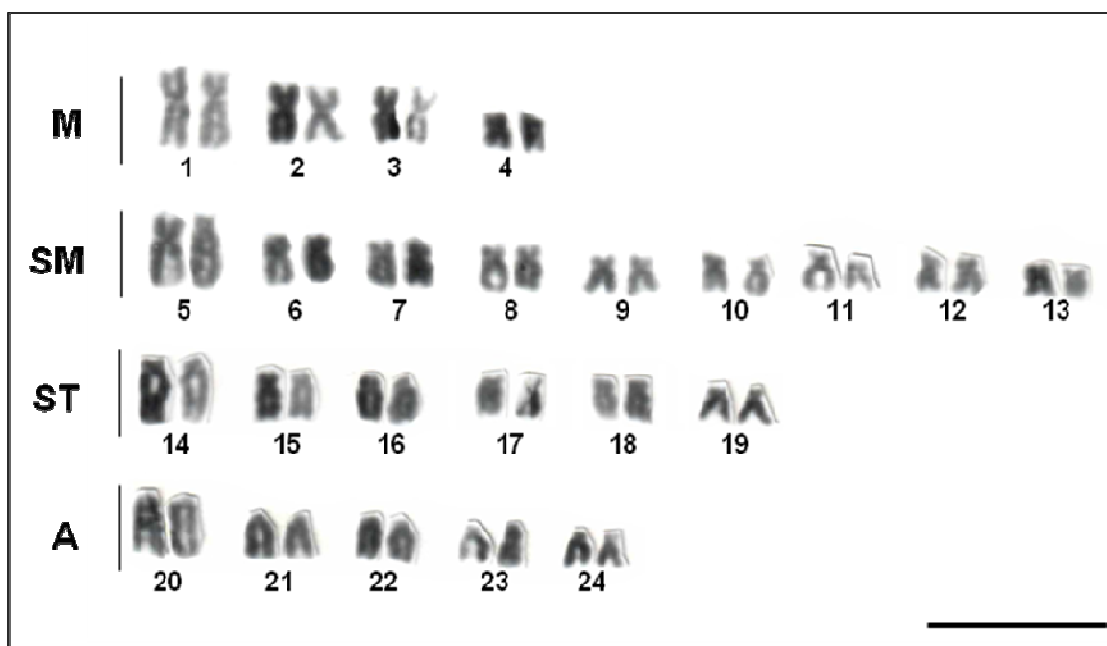


**Figura 8.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum* proveniente do banhado do Taim com coloração convencional Giemsa. Barra = 5 μm.

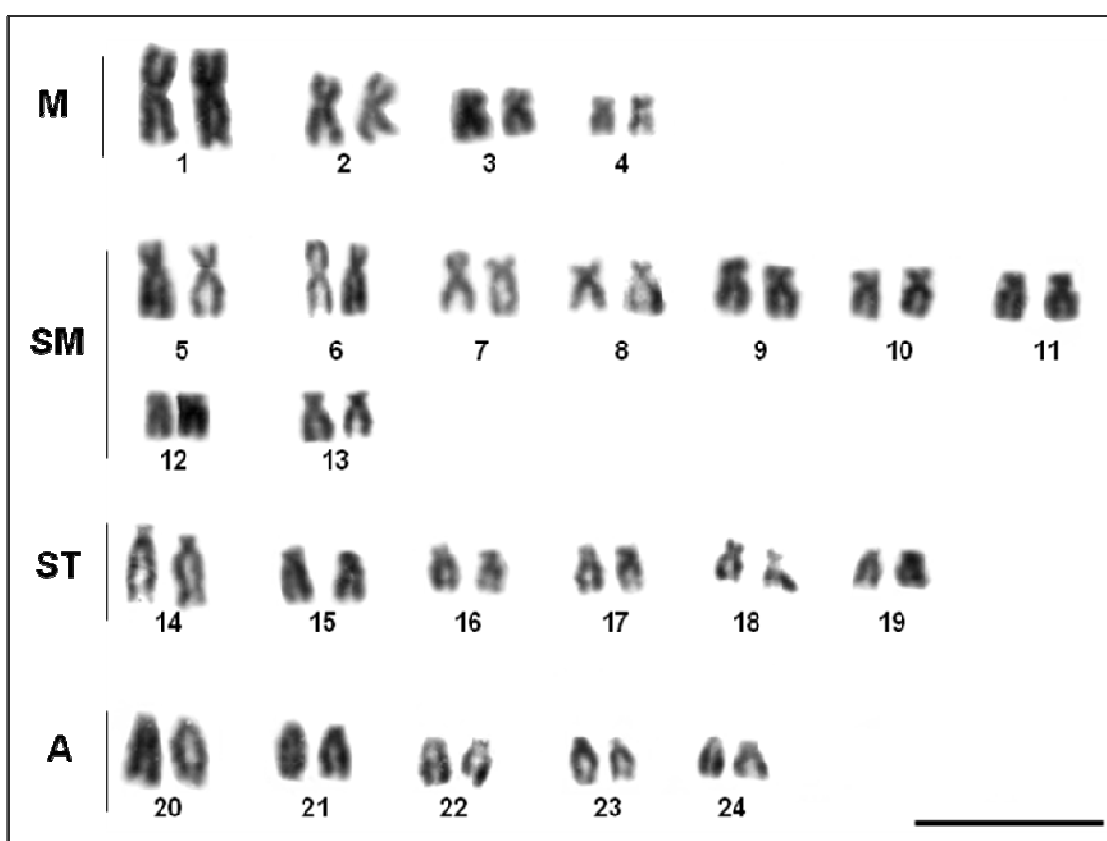


**Figura 9.** Cariótipo de *A. eigenmanniorum* proveniente do Arroio Bolaxa com coloração convencional Giemsa. Barra = 5 μm.

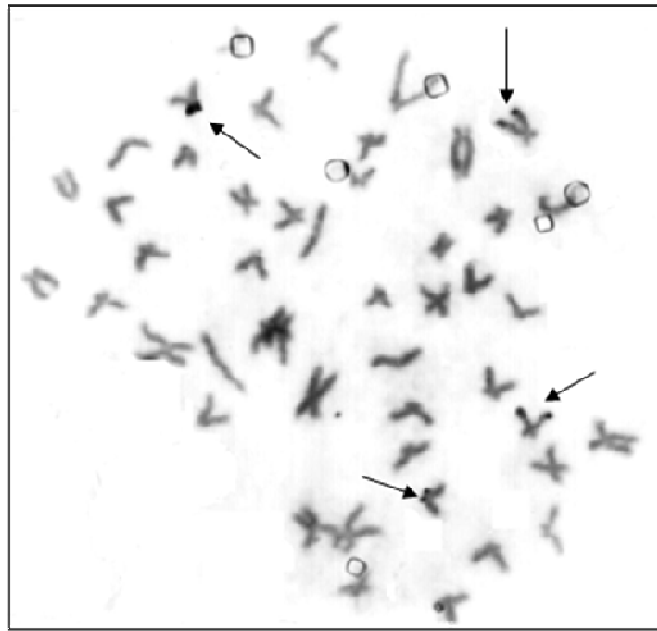


**Figura 10.** Metáfase de *A. eigenmanniorum* do banhado do Taim: coloração com nitrato de prata evidenciando as Ag-RONs nos pares 6 e 11.

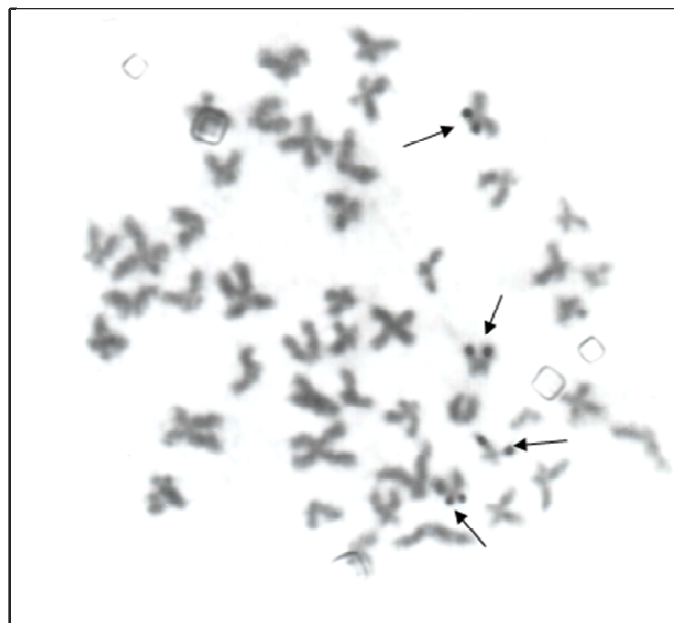


**Figura 11.** Metáfase de *A. eigenmanniorum* do Arroio Bolaxa: coloração com nitrato de prata evidenciando as Ag-RONs nos pares 6 e 11.

## 5.2. População de *A. jacuhiensis* ocorrente no banhado do Taim

Os exemplares de *Astyanax jacuhiensis* analisados do banhado do Taim mostraram um número diplóide de  $2n = 50$  cromossomos, com cariótipo formado por quatro pares de cromossomos metacêntricos, treze pares de cromossomos submetacêntricos, quatro pares de cromossomos subtelocêntricos e quatro pares de cromossomos acrocêntricos, com (NF) igual a 92 para machos e fêmeas (Figura 12) sem a ocorrência de sistema de cromossomos sexuais.

A coloração com nitrato de prata evidenciou marcações de Ag-RONs na região telomérica do braço curto no par seis, o segundo submetacêntrico (Figura 13). O maior par do complemento é o primeiro metacêntrico e para esta população não foi observada variação intra ou interindividual.

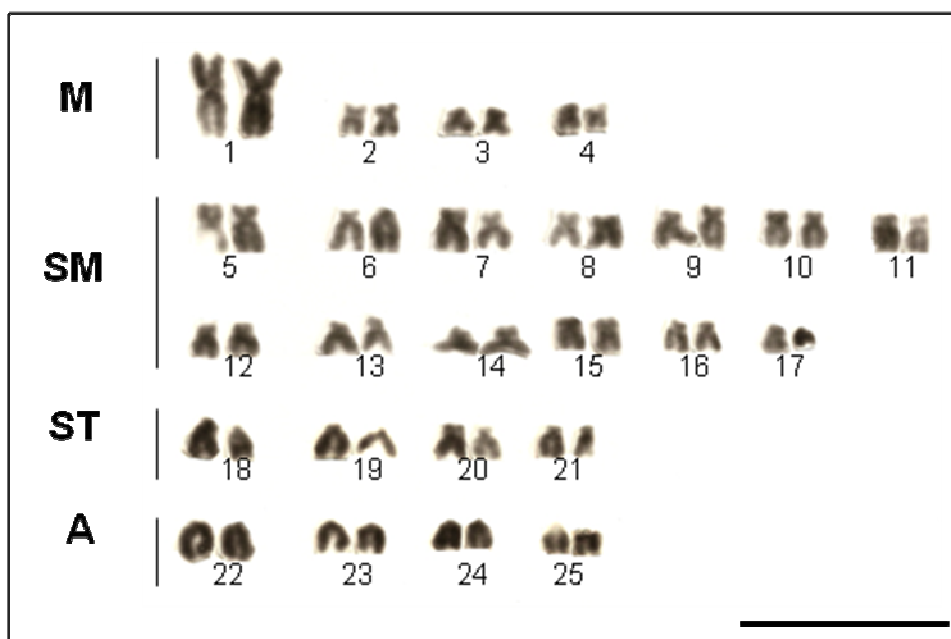


**Figura 12.** Cariótipo de *A. jacuhiensis* ocorrente no banhado do Taim com coloração convencional Giemsa. Barra = 5  $\mu$ m.

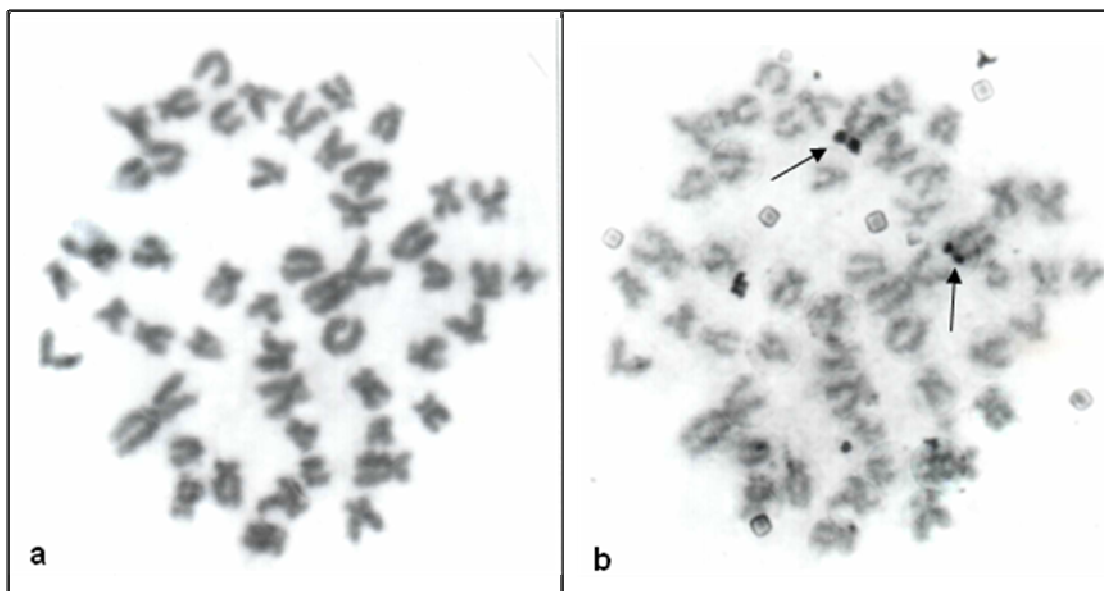


**Figura 13.** Metáfases de *A. jacuhiensis* do banhado do Taim: coloração Giemsa (a) e seqüencial com nitrato de prata evidenciando as Ag-RONs no par 6 (b).

### 5.3. População de *H. luetkenii* proveniente do Arroio Bolaxa

Para população *Hyphessobrycon luetkenii* pertencente ao Arroio Bolaxa, foi descrito o número diplóide de  $2n = 50$  cromossomos (Figura 14), bem como composição cariotípica constituída de 2 pares de cromossomos metacêntricos, 5 pares de cromossomos submetacêntricos e 18 pares de cromossomos acrocêntricos e  $(NF) = 64$ , tanto para machos e fêmeas, sem evidências de heteromorfismo de cromossomos sexuais. O maior par do complemento é o primeiro metacêntrico e para esta população não foi observada variação entre os indivíduos.

As Ag-RONs foram evidenciadas na região telomérica do braço curto do par 13, acrocêntrico (Figura 15a). A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com a sonda de DNAr 18S mostrou os sítios destes genes localizados na região telomérica do braço curto também no par 13 (Figura 15b).

O padrão de distribuição da heterocromatina, verificado preliminarmente pelo bandamento C, apresentou distribuições teloméricas e centroméricas nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Vários cromossomos do complemento subtelocêntricos/acrocêntrico mostraram blocos de heterocromatina também com distribuições teloméricas e centroméricas, assim como apenas centroméricas (Figura 15c).

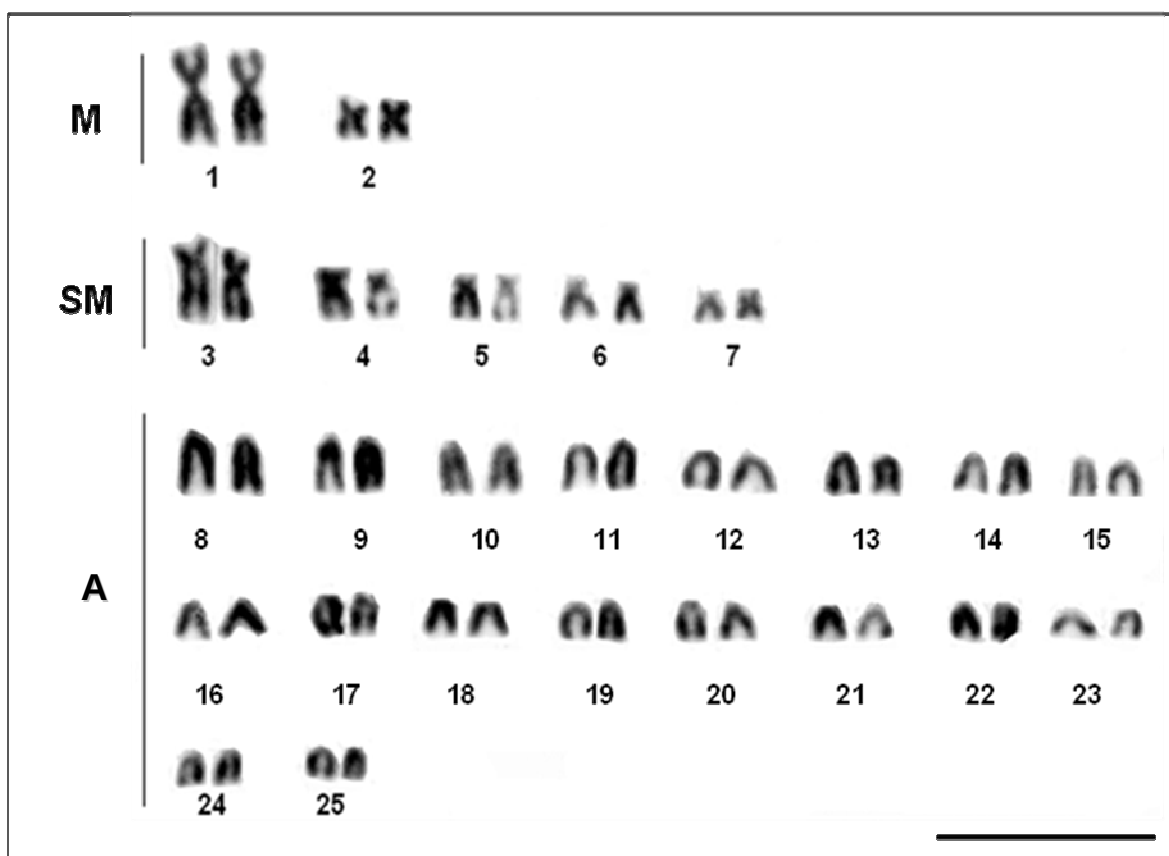


**Figura 14.** Cariótipo de *H.luetkenii* pertencente ao Arroio Bolaxa com coloração convencional Giemsa. Barra = 5  $\mu$ m.

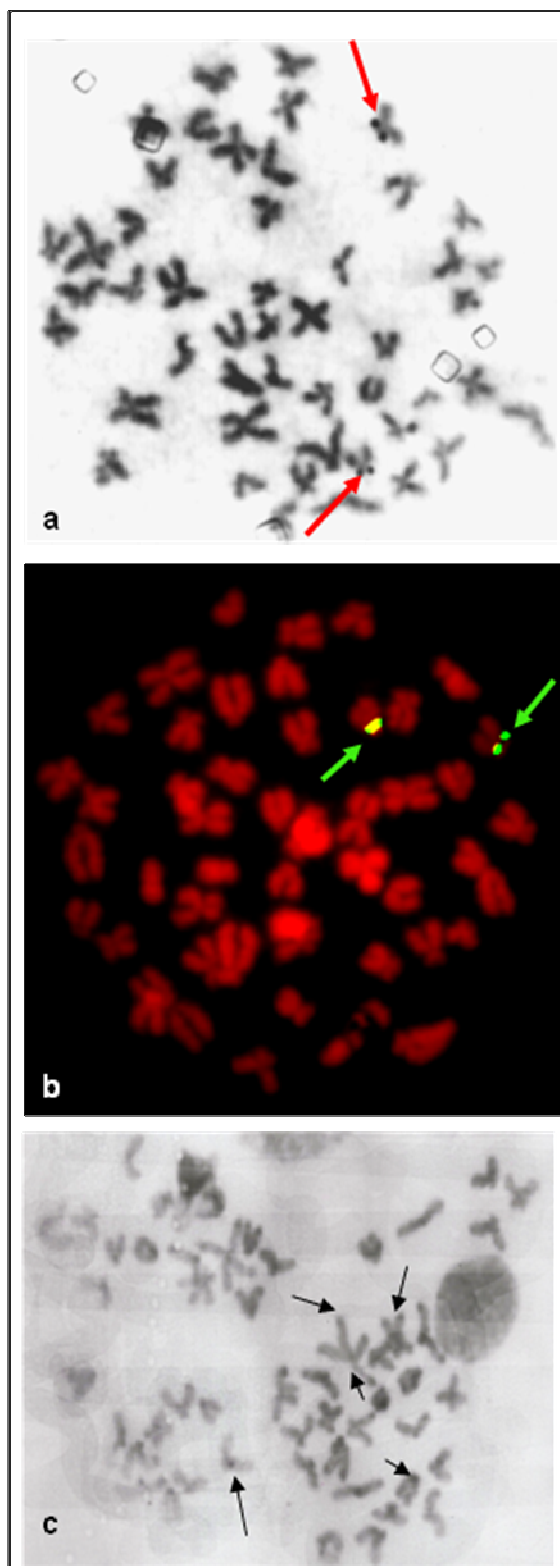


**Figura 15.** Metáfases de *H.luetkenii* do Arroio Bolaxa: coloração com nitrato de prata evidenciando as Ag-RONs (a); hibridação *in situ* (FISH) com a sonda de DNAr 18S (b) e regiões heterocromáticas evidenciadas por bandamento – C (c).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Estudos cariotípicos comparativos em populações de *A. eigenmanniorum* (Cope, 1894) e *A. jacuhiensis* (Cope, 1894) ocorrentes em diferentes lagos na região Sul do Brasil (Characidae; Tetragonopterinae)

Os dados citogenéticos obtidos para as populações de *A. eigenmanniorum* do Arroio Bolaxa e banhado do Taim indicam um cariótipo não conservado ao longo da distribuição da espécie, que descreve para o gênero um número diplóide  $2n = 50$  cromossomos.

O número diplóide, fórmula cariotípica e NF descritos neste estudo corroboram com os encontrados por Machado & Born (2006a) para a população de *A. eigenmanniorum* do Lago Polegar, de natureza antrópica localizado no município de Rio Grande/RS, e também por Mariano & Morelli (2002) no Córrego dos Caetano/MG. Porém, diferem dos encontrados por Fauz *et al.*, (1994), em exemplares de Volta Grande/MG, Bottegoni (2003) no rio Riachuelo/Argentina e Mariano & Morelli (2002), no Córrego dos Caetano/MG, que descreveram populações com  $2n = 50$  cromossomos com uma fórmula cariotípica  $6M + 20SM + 8ST + 16A$ , com NF = 76.

O número diplóide de uma espécie pode variar devido a arranjos do tipo fusões e/ou fissões cêntricas dos cromossomos. Estas alterações foram descritas por Maistro *et al.*, (2000), que ao analisarem uma população de *A. scabripinnis* do córrego Tamanduá – SP, observaram dois números diplóides,  $2n = 48$  e  $2n = 50$  cromossomos, caracterizando citótipos diferentes, mas com números fundamentais iguais para ambos exemplares. Frente a esta diferença observada em indivíduos da mesma população, foi proposto pelos autores que os animais analisados tinham um ancestral comum e que a melhor hipótese para explicar esta diferença seria uma translocação Robertsoniana entre dois pares de cromossomos acrocêntricos de um peixe com  $2n = 50$  cromossomos.

Algumas espécies de *Astyanax* apresentam, do ponto de vista evolutivo, um número diplóide mais conservado, como parece ser o caso do *A. jacuhiensis*. No presente trabalho foi descrito o número diplóide de cinquenta cromossomos com fórmula cariotípica  $8M + 26SM + 8ST + 8A$ , e NF = 92. Pacheco *et al.*, (2006) estudando exemplares desta espécie provenientes do lago Guaíba (Porto Alegre/RS) e Machado & Born (2006b) analisando exemplares do canal de Santa Isabel (Rio

Grande/RS), encontraram o mesmo número cromossômico, mas diferenças nas fórmula cariotípicas e número fundamental:  $8M + 30SM + 4ST + 8A$ ;  $NF = 92$  e  $8M + 28SM + 8ST + 6A$ ;  $NF = 94$ , respectivamente.

Nos casos em que não há mudanças no número diplóide, inversões pericêntricas podem estar predominando na evolução cromossômica, além das inversões paracêntricas, mais difíceis de serem identificadas pelas técnicas citogenéticas convencionais (Peres, 2005).

Segundo Pfister & Moreira- Filho (1997) o sistema de Ag-RONs para este gênero tem se mostrado bastante variado, muitas vezes caracterizado como múltiplo. Para *A. eigenmanniorum* foi descrito por Mariano & Morelli (2002) múltiplas RONS, com até cinco pares de cromossomos marcados. No presente estudo, para as populações do Arroio Bolaxa e do banhado do Taim foram evidenciadas RONS múltiplas, com marcações teloméricas em dois pares cromossômicos, braço longo do par seis e braço curto do par 11, ambos subtelocêntricos, enquanto que Machado & Born (2006a) encontraram marcações teloméricas no braço curto do mesmo par 11, submetacêntrico, e no par 22, acrocêntrico, indicando a ocorrência de rearranjos cromossômicos.

Exemplares de *A. jacuhiensis* do banhado do Taim apresentaram marcações simples de RONS no segundo par de submetacêntricos, semelhante ao encontrado por Machado & Born (2007) em uma população do canal de Santa Isabel (Rio Grande/RS), onde foi identificado o primeiro par de submetacêntricos como organizadores nucleolares. Estas duas localidades são próximas, e evidenciam a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Nos exemplares analisados por Pacheco *et al.* (2006) do Lago Guaíba (Porto Alegre/RS) foi encontrado uma variação de 1 a 3 cromossomos nucleolares. As diferenças observadas entre as populações de *A. jacuhiensis* do banhado do Taim e canal de Santa Isabel com e as Lago Guaíba podem ser atribuídas, a princípio, à atividade diferenciada das RONS nessas populações, uma vez que esta técnica detecta somente aquelas RONS que estiveram ativas na intérfase anterior.

Uma característica citotaxonômica observada na família Characidae é a ocorrência de um par de cromossomos metacêntricos que é sempre o maior do complemento, os quais ocorrem também nas espécies analisadas neste trabalho, além da ausência de cromossomos sexuais para machos e fêmeas.

O número cromossômico descrito para *A. jacuhiensis* do banhado do Taim é o mais comumente encontrado para espécies de *Astyanax* sendo que as diferenças

mais acentuadas estão nas fórmulas cromossômicas e na distribuição das regiões organizadoras de nucléolo.

## 6.2. Caracterização cariotípica comparativa em populações de *H. luetkenii* (Boulenger, 1887) provenientes do município de Rio Grande/RS

Apesar dos registros citogenéticos serem raros para o grupo, observa-se uma variabilidade cromossômica que compreende  $2n = 46$  a  $2n = 52$ , com maior frequência observada para  $2n = 48$  e  $2n = 50$  (Centofante *et al.*, 2003). O número cromossômico de  $2n = 50$  encontrado para esta população de *H. luetkenii* do Arroio Bolaxa (Rio Grande/RS) também foi o mesmo descrito por Machado & Born (2007) para população ocorrente no lago Polegar, lago de natureza antrópica localizado na Universidade do Rio Grande (FURG – Rio Grande/RS).

Dados cariotípicos disponíveis para outras espécies do mesmo gênero como *H. aff. santae*, *H. reticulatus*, do rio Itimirim/SP, e *H. anisitsi*, provenientes da Bacia do Alto Paraná, mostraram a predominância cromossômica com  $2n = 50$  cromossomos enquanto que *H. griemi* ocorrente no rio Itimirim/SP apresentou  $2n = 48$  (Lima & Moreira- Filho, 1990; Miyazawa *et al.*, 1994; Wlasiuk & Garcia, 1996; Carvalho *et al.*, 2002; Centofante & Moreira- Filho, 2002; Centofante, *et al.*, 2003).

A ocorrência de um par de cromossomos metacêntricos grandes, o maior do complemento, também ocorre em *H. luetkenii* do Arroio Bolaxa, conforme descrito para família Characidae.

A fórmula cariotípica descrita para população do Arroio Bolaxa, consistindo em  $4M + 10SM + 36A$ , foi a mesma encontrada para população do lago Polegar, assim como o número fundamental (NF) = 64, encontrado também em *H. aff. santae* (Lima & Moreira- Filho, 1990), mas com a fórmula cariotípica de  $4M + 24SM + 12ST + 10A$ . Isto indica que nos casos em que não há mudanças no número diplóide, inversões pericêntricas, que envolvem o centrômero, e paracêntricas podem estar predominando na evolução cromossômica destas espécies (Peres, 2005).

Variações no padrão das Ag-RONs são freqüentes em peixes, podendo ser simples, presentes em um par cromossômico ou múltiplas, presentes em mais de um par de cromossomos (Araújo & Morelli, 2000). Desse modo, o sistema múltiplo encontrado em *Astyanax* (Pfister e Moreira- Filho, 1997) ocorre também em *Hyphessobrycon*, como foi relatado por Lima & Moreira- Filho (1990), Miyazawa *et al.*, (1994), Centofante & Moreira- Filho (2002) e Centofante *et al.* (2003). Porém, no presente estudo, foi verificada marcação simples na região telomérica do braço curto do par acrocêntrico 13, enquanto que Machado e Born (2007) verificaram marcações

em até 3 cromossomos. Abel (2001) propôs que em populações isoladas em pequenos corpos d'água, as alterações cromossômicas seriam eventos importantes para a manutenção de sua variabilidade genética.

A coloração com nitrato de prata é limitada, uma vez que marcar apenas as RONS que foram ativamente transcritas durante as intérfases precedentes às metáfases analisadas, não possibilitando, muitas vezes, a demonstração do número real de RONS (Fernandes, 2006). Dessa forma, as RONS têm sido melhor caracterizadas pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), uma vez que determina a posição do DNAr independentemente de sua atividade (Artoni *et al.*, 2000; Fernandes, 2006; Fernandes & Martins- Santos, 2006). Logo, corroborando com as marcações de Ag-RONS, a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com a sonda de DNAr 18S mostrou os sítios destes genes localizados na região telomérica do braço curto também no par 13.

O padrão de distribuição da heterocromatina, verificado preliminarmente pelo bandamento C, apresentou distribuições teloméricas e centroméricas nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Vários cromossomos do complemento acrocêntrico mostraram blocos de heterocromatina também com distribuições teloméricas e centroméricas, assim como apenas centroméricas, corroborando com os dados encontrados por Machado & Born (2007),

A população de *H.luetkenii* do Arroio Bolaxa apesar de manter características cromossômicas semelhantes às do lago Polegar, como número diplóide e localização da heterocromatina constitutiva, apresenta marcações de RONS apenas em um par cromossômico e não um sistema múltiplo. Esta diferença pode indicar que a população do lago Polegar é derivada de alguma outra que possui as mesmas características que a do Arroio Bolaxa, mas que devido ao isolamento geográfico esteja sofrendo rearranjos cromossômicos. Outra hipótese é de que a amostragem feita no lago Polegar não tenha sido suficiente para detectar a presença de mais RONS ativas.

## 7. CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos na investigação citogenética das diferentes populações de *Astyanax* e *Hyphessobrycon*, as seguintes conclusões podem ser delineadas com respeito a diversidade cariotípica destes grupos:

1. *Astyanax eigenmanniorum* do Arroio Bolaxa e banhado do Taim embora estejam separadas geograficamente, compartilham as mesmas características citogenéticas;
2. *A. eigenmanniorum* apresenta citótipos diferentes entre as regiões de Minas Gerais, Argentina e Rio Grande do Sul, sugerindo ser outro “complexo de espécies”;
3. *A. jacuhiensis*, apesar de apresentar um número diplóide conservado ( $2n = 50$ ) nas regiões do banhado do Taim, canal Santa Isabel e lago Guaíba, mostra divergência em sua fórmula cariotípica e outros marcadores citogenéticos indicando um certo grau de diferenciação, possivelmente devido ao isolamento geográfico;
4. Dados citogenéticos semelhantes foram encontrados para as populações de *H. luetkenii* da região Sul ( $2n = 50$ , distribuição dos blocos heterocromáticos), porém, a variação na localização das RONS entre as populações do Arroio Bolaxa e do lago Polegar indica possível ocorrência de rearranjos cromossômicos devido ao isolamento geográfico entre as mesmas ou que a amostragem feita no lago Polegar não tenha sido suficiente para detectar a presença de mais RONS ativas.
5. Os resultados obtidos neste trabalho, além de contribuir para um melhor entendimento da diversidade e evolução de *Astyanax* e *Hyphessobrycon*, reforçam a complexidade destes grupos e a necessidade de uma revisão taxonômica mais detalhada aliando a sistemática à citogenética.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1998), **Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes**. In - Malabarba, L. R., Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S. and Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 603p.
- ARAÚJO, A. C. dos S. & MORELLI, S.(2000), **Estudo cariotípico da população de *Astyanax scabripinnis* (pisces- characidae) na nascente do correjo jatai, Uberlândia -MG**. In: 46 Congresso Nacional de Genética. *Genetics and Molecular Biology*. vol.23, p60.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. & BERTOLLO, L. A. C. (2000). **Citogenética de peixes neotropicais: Métodos, resultados e perspectivas**. *Biological and Health Sciences*, v.6 (1): 43-60.
- BATISTA, T. DE LIMA; CANTEIRO, R. C. A.; DORNELES, L. P. P. & COLARES I. G. (2007). **Levantamento florístico das comunidades vegetais na Área de Proteção Ambiental da Lagoa Verde, Rio Grande, RS**. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 225-227.
- BEHLING, G. M. (2007). **Refletindo o processo de criação da APA da Lagoa Verde pelo olhar da Educação Ambiental**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Educação Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, RS. 128p.
- BEMVENUTI, M. A. & MORESCO, A. (2005). **Peixes: áreas de banhados e lagoas costeiras do Extremo Sul do Brasil**. ABRH, Porto Alegre, 63p.
- BENINE, R. C. & LOPES, G. A . M. (2008). **A new species of *Hyphessobrycon* (Characiformes : Characidae) from rio Portuguesa, rio Orinoco basin, Venezuela**. *Zootaxa*, 61-68.

- BERTACO, V. A. & CARVALHO, T. P. (2005). **A new characid fish, *Hyphessobrycon hexastichos* (Characiformes: Characidae) from Chapada dos Parecis, Mato Grosso, Brazil.** *Neotropical Ichthyology*, 3(3): 439-443.
- BERTACO, V. A.; MALABARBA, L. R. & DERGAM, J. A. (2007), **New *Hyphessobrycon* from the upper rio Pardo drainage in eastern Brazil (Teleostei: Characiformes: Characidae),** *Neotropical Ichthyology*, 5(3):245-249.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA-FILHO, O. (1978), **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae).** *Brazilian Journal of Genetics*, n.1. p.103-120.
- BOTTEGONI, A. L.; SÁNCHEZ, S. & JORGE, L. C. (2003). **Estudios citogenéticos en *Hopleryttrinus unitaeniatus* y *Astyanax eigenmanniorum* (Pisces) de la localidad de Corrientes, Argentina. Universidad nacional del nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Resumen: V-035.**
- BRAGA, P. L. S. & ABDALLAH, P. R. (2004) **Valoração contingente – Estudo de caso: Estação ecológica do Taim, RS.** In: *III Mostra de Produção Universitária da FURG*.
- BRITSKI, H. A. (1972). **Peixes de água doce de São Paulo: sistemática.** In: *Poluição e Psicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, São Paulo* p. 79-108.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y. & ROSA, A. B. S. (1998). **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco).** Ministério da irrigação- CODEVASF, Minas Gerais, 3ª edição, 115p.
- BUCKUP, P.A. & MALABARBA, L.R. (1983). **A list of the fishes of the Taim Ecological Station, Rio Grande do Sul, Brazil.** *Iheringia: Série Zoologia*, 63:103-113.

- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. & GHAZZI, M. S. (2007). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. *Museu Nacional*. Rio de Janeiro. 195p.
- CABRAL, N. A. R. J. & SOUZA, M. P. de. (2005). **Áreas de proteção ambiental: Planejamento e gestão de áreas protegidas**. São Carlos: Editora Rima, 158p.
- CARVALHO, M. L.; OLIVERIA, C.; NAVARRETE, M. C.; FROEHLINCH, O. & FORESTI, F. (2002). **Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysii) from the Neotropical region**. *Genetics and Molecular Biology*. vol. 25 n. 1.p. 49- 55.
- CARVALHO, G.R. (2003). **Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation**. *Jornal Fish Biology*, 43:53-73.
- CARVALHO, T.P. & BERTACO, V. A. (2006). **Two new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from upper rioTapajós basin on Chapada dos Parecis, Central Brazil**. *Neotropical Ichthyology*, 4(3):301-308.
- CARVALHO, F. R.; LANGEANI, F. MIYAZAWA, C. S. & TROY, W.P. (2008). ***Hyphessobrycon rutiliflavus* n. sp., a new characid fish from the upper rio Paraguai, State of Mato Grosso, Brazil (Characiformes : Characidae)**. *Zootaxa*. (1674)39-49.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A.C.; MIYAZAWA, C. S. & MOREIRA- FILHO, O. (2003), **Diferenciação cromossômica em populações alopátricas de *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae)**. *Cytologia*, 68(3): 283-288.
- DANIEL-SILVA, M. de F. Z. (1996), **Estudos Citogenéticos Comparativos em Quatro Espécies do Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 176p.

- DANIEL-SILVA, M. de F. Z. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F (2001). **Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae).** *Caryologia*, 54: 209-215.
- DENTON, T.E. (1973). **Fish Chromosome Metodology.** *Charles C. Thomas Publisher*, Springfield (USA).
- EIGENMANN, C.H. (1921). **The American Characidae.** *Mem MusComp Zool* 23:209-310 *In: Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertolo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2007). Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes).* *Genetics and Molecular Biology*, 30, 3, 529-535.
- FAUAZ, G.; VICENTE, V.E & MOREIRA-FILHO, O. (1994). **Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae).** *Revista Brasileira de Genética*, 17: 157-163.
- FERNANDES, C. A. & MARTINS- SANTOS, I. C. (2002a), **Estudos citogenéticos em duas populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) da bacia do Rio Paraná, PR, Brasil.** *In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, resumo: 003.
- FERNANDES, C. A. & MARTINS- SANTOS, I. C. (2002b). **Caracterização citogenética em duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) da bacia do Rio Ivaí, PR, Brasil.** *In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, resumo: 004.
- FERNANDES, C. A. (2006). **Estudos citogenéticos em três espécies do gênero *Astyanax*, com ênfase no DNA ribossomal.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 66p.
- 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.** *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 464-468.
- FINK, S. V. & FINK, W. L. (1981). **Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei).** *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol .72, n.4, p.297-353.
- FROESE, R. & PAULY, D. (2007). (Eds). *In: Fishbase*. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acessado em: 17/10/07.
- GARCIA, A., BEMVENUTI M. A., VIEIRA, J. P., MARQUES, D. M. L. M., BURNS, M.D. M., MORESCO, A. & CONDINI, M. V. L. (2006a), **Checklist comparison and Dominance patterns of the fish fauna at Taim Wetland, South Brazil.** *Neotropical Ichthyology*, 4(2). p. 261-268.
- GARCIA, A.; HOEINGHAUS, D. J.; VIEIRA, J. P.; WINEMILLER, K. O.; MOTTA-MARQUES, D. M. L. & BEMVENUTI, M. A. (2006b). **Preliminary examination of food web structure of Nicola Lake (Taim Hydrological System, south Brazil) using dual C and N stable isotope analyses.** *Neotropical Ichthyology*, 4(2):279-284,
- GARUTTI, V. & BRITSKI, H. A. (2000), **Descrição de uma nova espécie de Astyanax (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia.** *Museu de Ciência e Tecnologia PUCRS Série Zoologia*, **13**, p65-88.
- GÉRY, J. (1977). **Characoids of the world.** *T.F.H. Publications*: 672p,
- GOLD, JR. L.C.; SHIPLEY, N.S, & POWERS P.K. (1990). **Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding.** *Journal of Fish Biology*, v. 37: p563-575.
- GROSER, K.M.; KOCH, W.R. & DRUG- HAHN, S. (1994). **Ocorrência e distribuição de peixes na estação ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil (Pisces, Teleostomi).** *Iheringia: Série Zoologia*, **77**:89-98.

- GUERRA, M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara, 142p.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D.A. (1980), **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method**. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- JIM, S. M. & TOLEDO, V. (1975). **Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (characidae, tetragonopterinae)**. *Ciencia e Cultura*, v. 27: 1122-1124.
- KANTEK, D. L. Z. (2005). **Estudo citogenético comparativo entre populações de uma espécie de *Astyanax* (characidae, tetragonopterinae) endêmica do rio Iguaçu**. Dissertação de mestrado. Curitiba (Brasil): Universidade Federal do Paraná. 70p.
- KANTEK, D. L. Z.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S. & CESTARI, M. M. (2007a). **Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin**. *Braz. arch. biol. technol.*, jan., vol.50, nº.1, p.67-74. ISSN 1516-8913.
- KANTEK, D. L. Z.; CIPRIANO, R. R.; ABILHOA, V.; ARTONI, R. F. & CESTARI, M. M. (2007b). **Cytotaxonomic and Evolutionary Considerations about Karyotypic Data of Fishes from the Iguaçu River Basin in South of Brazil**. *Braz. arch. biol. technol.* Vol.50, nº.5: p.793-802. ISSN 1516-8913.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. (2007). **Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes)**. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3): p529-535.
- KURTS, F. C., ROCHA, J.S. M., KURTS, S. M. S. M., ROBAINA, A.D., GARCIA, S. M., SANTOS, A.H. O., DILL, P, R, J., ATAIDES, P. R. V. & BOLZAN, F. (2003),

**Zoneamento ambiental dos banhados da Estação Ecológica do Taim, RS.**  
*Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.1, p.77-83.

LEVAN, A.; FREDGA, K. E. & SANDBERG, H. A. (1964). **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas*, vol. 52, p201- 220.

LIMA, F. C. T. & GERHARD, P. (2001), **A new *Hyphessobrycon* (Characiformes, Characidae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, with notes on its natural history.** *Ichthyology Explor. Freshwater*, 12(2): 105-114.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C. & LUCINDA, P.H.F. (2003). **Genera incertae sedis in Characidae.** In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; 59 FERRARIS, Jr., C.J., *Check list of the freshwater fishes of South and Central America.* Porto Alegre, Edipucrs, 106-169p.

LUCENA, C. A. S. (1993). **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osthariophysi, Characiformes).** São Paulo- SP: Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 158p.

MACHADO, P. C. (2006) **Caracterização cariotípica de *Astyanax eigenmanniorum* (Cope, 1894) e *Hyphessobrycon luetkenii* (Boulenger, 1887) do Lago Polegar, FURG e *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) do Canal de Santa Isabel, Região Sul do Rio Grande do Sul (Characidae; Tetragonopterinae).** Trabalho de graduação. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 68p.

MACHADO, P. C. & BORN, G. G. (2006a), **Análise citogenética preliminar de *Astyanax eigenmanniorum* Cope, 1894 (Characiformes, Characidae) do Lago Polegar do Campus da FURG.** In: V Mostra de Produção Universitária da FURG, XV Congresso Iniciação Científica, Resumo CD-ROM.

- MACHADO, P. C. & BORN, G. G. (2006b). **Análise citogenética preliminar de *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characiformes, Characidae) do Arroio Sarandi, Rio Grande, RS.** In: *VIII Jornada Biológica, resumo CD-ROM*.
- MACHADO, P. C. & BORN, G. G. (2007). **Primeiras análises cariotípicas em *Hyphessobrycon luetkenii* Boulenger, 1887 do lago Polegar do Campus da FURG, Rio Grande/RS (Characidae, Tetragonopterinae).** In: *IX Encontro de Pós Graduação. Universidade Federal do Rio Grande*.
- MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. (2000). **Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae).** *Genetic and Molecular Biology*, vol.23, no.2, 365-369p.
- MARIANO, A. R. T. & MORELLI, S. (2002), **Caracterização da macroestrutura cariotípica de *Astyanax eigenmanniorum* (Characidae, Tetragonopterinae) da população do córrego dos Caetano (Uberlândia, MG) utilizando cromomicina A3.** In: *IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, resumo: 013*.
- MARTINS, C. & GALETTI, Jr P. M. (1999). **Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes).** *Chromosome Research*. v. 7: 363-367.
- MICHELE, J.L. & TAKAHASHI, C.S. (1977a). **Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces).** *Cytologia*. 42: 535-537.
- MICHELE, J.L.; TAKAHASHI, C.S. & FERRARI, I. (1977b). **Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces).** *Cytologia*, v. 42: 539-546.
- MORELLI, S., BERTOLLO, L. A.C., FORESTI, F., MOREIRA- FILHO, O. & TOLEDO FILHO, S. A. (1983), **Cytogenetic consideration on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). Karyotypic variability.** *Caryologia*, 36: 235- 244.

- MOTTA MARQUES, D. M. L., C. TUCCI, D. CALAZANS, V. L. M. CALLEGARO & VILLANUEVA, A. (2002). **O Sistema Hidrológico do Taim - site 7**. p125-144. In: GARCIA, A., BEMVENUTI M. A., VIEIRA, J. P., MARQUES, D. M. L. M., BURNS, M.D. M., MORESCO, A. & CONDINI, M. V. L., 2006, *Checklist comparison and Dominance patterns of the fish fauna at Taim Wetland, South Brazil. Neotropical Ichthyology*, 4(2). p261-268.
- NAOUM, C. P. (2001). **Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial**. Revista. *Brasileira de Hematologia*. São José do Rio Preto. vol.23, nº.2.
- NELSON, J. S. (1994), **Fishes of the world**. John Wiley e Sons. New York- USA, 3ª edition, 600p.
- NEMA/ FBNP. (2004). **Projeto educação e monitoramento ambiental para o sistema Arroio- Lagoa do Bolaxa**. Relatório final.
- NEMA. (2008). **Projeto NEMA: espaço ecológico no ar**. Instituto Ecológico Aqualung. Disponível em: <http://espacoecologicoanoar.com.br>. Acessado em: 20/08/2008.
- OLIVEIRA- PINTO, K. P. de, PERES, W. A. M., BUCKUP, P. A. & MOREIRA- FILHO, O. (2006), **Análises citogenéticas em *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae), em uma região de transposição de rio**. In: *XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, I International Congress of Fish Genetics*, resumo: 057.
- OLIVEIRA, C., FORESTI, F. HILSDORF, A. W. S. (2008). **Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations**. *Fish Physiol Biochem*.
- OZOUF- COSTAZ, C. & FORESTI, F. (1992), **Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives**. *Netherlands J. Zoology* 42(2-3): 277- 290.
- PACHECO, R. B., GIULIANO -CAETANO, L. G., MALABARBA, L. R., JÚLIO JR., H. F. & DIAS, A. L. (2006), **Primeiros estudos citogenéticos em *Astyanax jacuhiensis***

**(Characidae, Tetragonopterinae) da bacia do Lago Guaíba/RS. In: XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and genetics, I International Congress of Fish Genetics, resumo: 276.**

PAZZA, R. (2005), **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 98p.

PERES, W. A. M. (2005), **Análise da diversidade cariotípica de Characidae da bacia do São Francisco**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 102p.

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

PORCIÚNCULA, R. A.; QUINTELA, F. M. & LOEBMANN, D. (2006). **Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae, *Austrolebias minuano* Costa & Cheffe, 2001 and *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924): new species records at Rio Grande city, Rio Grande do Sul state, Brazil. *Check List* 2006: 2(2) ISSN: 1809-127X.**

PORTO, F. E. & MARTINS- SANTOS, I. C. (2002), **Diversidade cariotípica em populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) das bacias do Rio Paraná e Iguaçu. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, resumo: 002.**

QUINTELA, F. M., PORCIUNCULA, R. A., CONDINI, M.V.L., VIEIRA, J. P. & LOEBMANN, D. (2007). **Composição da ictiofauna durante o período de alagamento em uma mata paludosa da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2(3): 191-198.**

RAMOS, M. S. M., VÊNERE, P. C., SOUZA, I. L. & GARUTTI, V. (2006), **Cariótipo, RONS e bandas c de *Astyanax argyrimarginatus* e *Astyanax* sp (nova espécie)**

- (Characiformes, Characidae) do médio Rio Araguaia. In: XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, I International Congress of Fish Genetics, resumo: 096.**
- REEVES, A. & TEAR, J. (2000). **MicroMeasure**. Colorado State University. Version 3.3.
- REIS, R. O., KULLANDER, S. O. & FERRARIS Jr. (2003), **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 742p.
- SCHAEFER, S.A. (1998), **Conflict and Resolution: Impact of New Taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical Cascudinos**. In: MALABARBA, L.R; R.E. REIS; R.P. VARI, Z.M.S. LUCENA, & C.A.S. LUCENA (Eds), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- SCHENINI, P.; COSTA, A. & CASARIN, V. (2004), **Unidades de conservação: Aspectos históricos e sua evolução**. In: *Congresso Brasileiro de Cadastro Técnico Multifilantári – COBRAC*, UFSC - Florianópolis.
- SOUZA, V. A. G. de, (2003). **Diversidade cariotípica em Tetragonopterinae (Pisces, Characiformes) na região do médio rio Araguaia**. Dissertação de Mestrado, Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso. 124p.
- SUMNER, A. T. (1972), **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin**. *Exptl Cell Res*, 75: 304-306.
- TAGLIANI, P. R. A. (1994). **Ecologia da assembléia de peixes de três riachos da planície costeira do Rio Grande do Sul**. *Atlântica*. Rio Grande. 16: 55-68.
- TOLEDO, V. & FERRARI, I. (1976). **Estudo citogenético em três espécies do gênero Pimelodus (Pimelodidae, Pisces)**. *Cientifica*, v. 4: 101-106.

- VARI, R. & MALABARBA, L. R. (1998). **Neotropical ichthyology: an overview**. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (L.R. Malabarba; R.E. Reis; R.P. Vari; Z.M.S. Lucena; C.A.S. Lucena (Eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p1-11.
- WEITZMAN, S. H. & PALMER, L.(1997). **A new species *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from the Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative 'rosy tetra clade'**. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 7(3): 209-242.
- WEITZMAN, S. H.& MALABARBA, L. (1998). **Perspectives about the phylogeny and classification oh the Characidae**. In: PERES, W. A. M. (2005), *Análise da diversidade cariotípica de Characidae da bacia do São Francisco*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 102p.

## 9. ANEXOS

**TABELA 1.** Vinte e quatro famílias que ocorrem no banhado do Taim, com ênfase nas dezenove espécies de Characidae (Garcia *et al.*, 2006).

| Famílias               | Espécies                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anablepidae</b>     | <i>Jenynsia multidentata</i> (Jenyns, 1842)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Aspredinidae</b>    | <i>Bunocephalus iheringii</i> Boulenger, 1891                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Atherinopsidae</b>  | <i>Odontesthes bonariensis</i> (Valenciennes, 1835)<br><i>O. humensis</i> de Buen, 1953<br><i>O. mirinensis</i> Bemvenuti, 1995<br><i>O. perugiae</i> Evermann & Kendall, 1906<br><i>O. retropinnis</i> (de Buen, 1953)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Auchenipteridae</b> | <i>Trachelyopterus lucenai</i> Bertoletti, Silva & Pereira, 1995                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Callichthyidae</b>  | <i>Corydoras paleatus</i> (Jenyns, 1842)<br><i>Callichthys callichthys</i> (Linnaeus, 1758)<br><i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock, 1828)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Characidae</b>      | <b><i>Astyanax eigenmanniorum</i> (Cope, 1894)</b><br><b><i>A. fasciatus</i> (Cuvier, 1819)</b><br><b><i>A. jacuhiensis</i> (Cope, 1894)</b><br><b><i>Astyanax</i> sp.</b><br><b><i>Bryconamericus iheringii</i> (Boulenger, 1887)</b><br><b><i>Charax stenopterus</i> (Cope, 1894)</b><br><b><i>Cheirodon ibicuiensis</i> Eigenmann, 1915</b><br><b><i>C. interruptus</i> (Jenyns, 1842)</b><br><b><i>Cyanocharax alburnus</i> (Hensel, 1870)</b><br><b><i>Hyphessobrycon anisitsi</i> (Eigenmann, 1907)</b><br><b><i>H. bifasciatus</i> Ellis, 1911</b><br><b><i>H. boulengeri</i> (Eigenmann, 1907)</b><br><b><i>H. luetkenii</i> (Boulenger, 1887)</b><br><b><i>H. meridionalis</i> Ringuelet, Miquelarena &amp; Menni, 1978</b><br><b><i>Macropsobrycon uruguayanae</i> Eigenmann, 1915</b><br><b><i>Mimagoniates inequalis</i> (Eigenmann, 1911)</b> |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                      | <b><i>Oligosarcus jenynsii</i> (Günther, 1864)</b><br><b><i>O. robustus</i> Menezes, 1969</b><br><b><i>Pseudocorynopoma doriae</i> Perugia, 1891</b>                                                                                                                                                                          |
| <b>Cichlidae</b>     | <i>Australoheros facetum</i> (Jenyns, 1842)<br><i>Cichlasoma portalegrense</i> (Hensel, 1870)<br><i>Crenicichla lepidota</i> Heckel, 1840<br><i>C. punctata</i> Hensel, 1870<br><i>Gymnogeophagus gymnogenys</i> (Hensel, 1870)<br><i>G. rhabdotus</i> (Hensel, 1870)<br><i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard, 1824) |
| <b>Clupeidae</b>     | <i>Platanichthys platana</i> (Regan, 1917)                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Crenuchidae</b>   | <i>Characidium rachovii</i> Regan, 1913                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Curimatidae</b>   | <i>Cyphocharax voga</i> (Hensel, 1870)                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Erythrinidae</b>  | <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Gobiidae</b>      | <i>Ctenogobius shufeldti</i> (Jordan & Eigenmann, 1887)                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Gymnotidae</b>    | <i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus, 1758                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Heptapteridae</b> | <i>Heptapterus sympterygium</i> Buckup, 1988<br><i>Pimelodella australis</i> Eigenmann, 1917<br><i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)                                                                                                                                                                                  |
| <b>Hypopomidae</b>   | <i>Brachyhypopomus</i> spp                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Loricariidae</b>  | <i>Hisonotus taimensis</i> (Buckup, 1981)<br><i>Hypostomus commersoni</i> Valenciennes, 1836<br><i>Loricariichthys anus</i> (Valenciennes, 1836)<br><i>Rineloricaria cadeae</i> (Hensel, 1868)<br><i>R. longicauda</i> Reis, 1983                                                                                             |
| <b>Mugilidae</b>     | <i>Mugil platanus</i> Gunther, 1880                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Pimelodidae</b>   | <i>Parapimelodus nigribarbis</i> (Boulenger, 1889)<br><i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803                                                                                                                                                                                                                               |

|                          |                                                                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Poeciliidae</b>       | <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenyns, 1842)<br><i>Phalloceros caudimaculatus</i> (Hensel, 1868) |
| <b>Pseudopimelodidae</b> | <i>Microglanis cottoides</i> (Boulenger, 1891)                                                       |
| <b>Rivulidae</b>         | <i>Cynopoecilus melanotaenia</i> (Regan, 1912)                                                       |
| <b>Sternopygidae</b>     | <i>Eigenmannia trilineata</i> López & Castello, 1966                                                 |
| <b>Synbranchidae</b>     | <i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch, 1795                                                            |
| <b>Trichomycteridae</b>  | <i>Homodiaetus anisitsi</i> Eigenmann & Ward, 1907                                                   |

**TABELA 2.** Composição específica das comunidades nos três riachos, com os índices de constância de ocorrência das espécies. Ênfase nos para os dois gêneros mais representativos (Tagliani, 1994).

| CHARACIDAE                       | Arroio<br>Martins | Arroio<br>Senandes | Arroio<br>Bolaxa |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| <i>Hypthessobrycon luetkenii</i> | 100.00            | 86.4               | 81.8             |
| <i>H. bifasciatus</i>            | 90,1              | 68,2               | 81,8             |
| <i>H. reticulatus</i>            | 81,1              | 40,9               | 32,0             |
| <i>H. meridionalis</i>           | 18,2              | 4,5                | 22,7             |
| <i>H. sp</i>                     | 31,8              | 9,1                | 36,4             |
| <i>Astvanax eigenmanniorum</i>   | 77.3              | 86.4               | 72.7             |
| <i>Cheirodon sp.</i>             | 59,1              | 36,4               | 77,3             |
| <i>Characidium sp.</i>           | 90,1              | 81,8               | 86,4             |
| <i>Asiphonicthys stenopterus</i> | -                 | 18,2               | 27,3             |
| <i>Glandulocauda inequalis</i>   | 9,0               | -                  | 9,1              |
| <i>Oligosarcus sp.</i>           | 31,8              | 40,9               | 31,8             |

**TABELA 3.** Espécies de *Astyanax*, indicando ocorrência, número diplóide e fundamental, fórmula cariotípica e RONS, destacando ocorrência de diferenças inter e intrapopulacionais, como em *A. eigenmanniorum*

| Espécie                           | Localidade                                | 2n        | NF | Fórmula Cariotípica |    |    |    | RONS                |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-----------|----|---------------------|----|----|----|---------------------|
| <i>Astyanax abramis</i>           | Rio Miranda (MT)                          | 50        | -  | -                   | -  | -  | -  | -                   |
| <i>Astyanax cf. abramis</i>       | Rio Tenente Amaral (MT)                   | 50        | -  | 6                   | 30 | 8  | 6  | simples             |
|                                   | Rio Bento Gomes (MT)                      | 50        | 82 | 22                  | 10 | 6  | 12 | simples             |
| <i>Astyanax altiparanae</i>       | Rio Claro - Tamarana (PR)                 | 50        | 90 | 10                  | 26 | 4  | 10 | múltipla            |
|                                   | Rio Claro - Tamarana                      | 50        | 88 | 10                  | 24 | 4  | 12 | múltipla            |
|                                   | Rio Claro - Tamarana                      | 50        | 86 | 10                  | 22 | 4  | 14 | múltipla            |
|                                   | Rio das Pedras(MG)                        | 50        | 94 | 16                  | 26 | 4  | 4  | múltipla            |
|                                   | Córrego Jataí – Uberlândia (MG)           | 50        | 96 | 16                  | 22 | 6  | 6  | múltipla            |
|                                   | Rio Iguaçu – Bacia do Paraná              | 50        | 90 | 10                  | 26 | 4  | 10 | múltipla<br>3 pares |
|                                   | Rio Pirapó – Bacia do Paraná              | 50        | 88 | 10                  | 22 | 6  | 12 | múltipla<br>3 pares |
|                                   | Rio Índio - Bacia do Paraná               | 50        | -  | 6                   | 30 | 4  | 10 | múltipla<br>5 pares |
|                                   | Rio Paraná                                | 50        | -  | 6                   | 26 | 6  | 12 | simples             |
|                                   | Córrego Monjolinho (SP)                   | 50        | -  | 8                   | 20 | 12 | 10 | -                   |
|                                   | Córrego do Óleo – Uberlândia (MG)         | 50        | -  | -                   | -  | -  | -  | -                   |
|                                   | Rio Araguaia – Uberlândia (MG)            | 50        | -  | -                   | -  | -  | -  | -                   |
|                                   | Alto doRio Tibagi (PR)                    | 50        | 92 | 6                   | 28 | 8  | 8  | múltipla            |
|                                   | Rio Iguaçu (PR)                           | 50        | 94 | 6                   | 30 | 8  | 6  | simples             |
| <i>Astyanax argyrimarginatus</i>  | Rio Araguaia – Barra do Garças (MT)       | 50        | -  | 6                   | 26 | 10 | 8  | múltipla            |
| <i>Astyanax asuncionensis</i>     | Rio Correntes – Afluente do Piriqui (MS)  | 50        | -  | 8                   | 26 | 8  | 8  | -                   |
| <i>Astyanax cf. asuncionensis</i> | Córrego Pipa (MS)                         | 50        | -  | 12                  | 20 | 12 | 6  | simples             |
| <i>Astyanax bimaculatus</i>       | Rio das Contas                            | 50        | -  | 6                   | 28 | 12 | 4  | múltipla<br>até 4   |
|                                   | Ribeirão Mineiro – Bacia do Recôncavo Sul | 50        | -  | 6                   | 28 | 12 | 4  | múltipla<br>ate 4   |
| <i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>  | Ribeirão São Bartolomeu – Bacia do Doce   | 50        | -  | 10                  | 22 | 12 | 6  | simples<br>1par     |
|                                   | Rio Carangola – Bacia Paraíba do Sul      | 50        | -  | 10                  | 22 | 12 | 6  | simples<br>1 par    |
|                                   | Rio Macacu (RJ)                           | 50        | -  | 14                  | 22 | 8  | 6  | -                   |
| <i>Astyanax eigenmanniorum</i>    | Córrego dos Caetano (MG)                  | 48/<br>50 | -  | -                   | -  | -  | -  | <b>59</b><br>-      |
|                                   | Lago Polegar –FURG (RS)                   | 48        | 86 | 8                   | 18 | 12 | 10 | múltipla<br>2 pares |

|                                |                                                   |    |    |         |    |         |    |                      |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|----|----|---------|----|---------|----|----------------------|
| <i>Astyanax fasciatus</i>      | Angatuba – Bacia do Paranapareme (SP)             | 46 | -  | -       | -  | -       | -  | múltipla 2 pares     |
|                                | Córrego das Rosas – Tributário do Rio Pirapó (PR) | 46 | 88 | 12      | 22 | 8       | 4  | múltipla             |
|                                | Ribeirão Araras (SP)                              | 48 | -  | 6       | 14 | 16      | 12 | -                    |
|                                | Rio Puimhi – Bacia São Francisco                  | 48 | -  | 8       | 20 | 16      | 4  | -                    |
|                                | Rio das Contas (NE)                               | 48 | -  | 8       | 24 | 12      | 4  | múltipla             |
|                                | Rio Preto da Costa (NE)                           | 48 | -  | 8       | 24 | 10      | 6  | simples              |
|                                | Ribeirão Mineiro (NE)                             | 48 | -  | 8       | 18 | 16      | 6  | simples              |
| <i>Astyanax aff. Fasciatus</i> | Ribeirão Três Bocas – Bacia Tibagi (SP)           | 46 | -  | 34m/s m |    | 12 st/a |    | -                    |
| <i>Astyanax giton</i>          | Rio Paraitinga – Bacia do Rio Paraíba do Sul (SP) | 50 | -  | 12      | 14 | 10      | 14 | simples              |
| <i>Astyanax intermedius</i>    | Rio Paraitinga – Bacia do Rio Paraíba do Sul (SP) | 50 | -  | 6       | 8  | 4       | 32 | múltipla até 6       |
|                                | Rio Macacu - Bacia dos Rios Costeiros (RJ)        | 50 | -  | 6       | 8  | 4       | 32 | -                    |
| <i>Astyanax jacuhiensis</i>    | Rio Guaíba – Porto Alegre (RS)                    | 50 | 92 | 8       | 30 | 4       | 8  | múltipla 1 a 3       |
|                                | Arroio Sarandi – Rio Grande (RS)                  | 50 | 94 | 8       | 28 | 8       | 6  | simples 1 par        |
| <i>Astyanax janeiroensis</i>   | Rio Ribeira (PR)                                  | 50 | -  | 6       | 14 | 14      | 16 | múltipla             |
| <i>Astyanax lacustris</i>      | Rio São Francisco (MG)                            | 50 | 94 | 8       | 20 | 16      | 6  | -                    |
| <i>Astyanax lineatus</i>       | Córrego Salobrinha – Serra da Bodoquena (MS)      | 50 | 68 | 6       | 12 | 14      | 18 | múltipla até 4       |
|                                | Rio Claro – Chapada dos Guimarães (MT)            | 50 | 84 | 8       | 22 | 4       | 16 | múltipla até 3 pares |
|                                | Rio Paciência – Chapada dos Guimarães (MT)        | 50 | 88 | 12      | 14 | 12      | 12 | -                    |
| <i>Astyanax marionae</i>       | Rio Paciência – Chapada dos Guimarães (MT)        | 48 | 88 | 8       | 24 | 8       | 8  | múltipla até 4       |
| <i>Astyanax parahybae</i>      | Rio Paraitinga –                                  | 48 | -  | 8       | 18 | 12      | 10 | simples              |

|                                  |                                                   |    |    |    |    |    |    |                  |
|----------------------------------|---------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|------------------|
|                                  | Bacia do Rio Paraíba do Sul (SP)                  |    |    |    |    |    |    |                  |
| <i>Astyanax scabripinnis</i>     | Rio Puimhi (MG)                                   | 46 | -  | 4  | 18 | 18 | 6  | múltipla até 4   |
|                                  | Riacho dos Amores – Bacia do Rio Ivaí (PR)        | 48 | 84 | 8  | 24 | 4  | 12 | múltipla         |
|                                  | Rio do Índio – Bacia do Rio Ivaí (PR)             | 48 | 82 | 8  | 20 | 6  | 14 | múltipla 3 pares |
|                                  | Rio da Onça – Bacia do Tibagi                     | 48 | -  | 14 | 16 | 10 | 8  | simples          |
|                                  | Rio Tibagi – Bacia do Tibagi                      | 50 | -  | 12 | 16 | 8  | 14 | múltipla         |
|                                  | Rio Paraitinga – Bacia do Rio Paraíba do Sul (SP) | 50 | -  | 12 | 14 | 10 | 14 | simples          |
|                                  | Rio dos Patos – Bacia do Rio Iguaçu               | 50 | -  | 10 | 16 | 8  | 16 | simples          |
|                                  | Rio Funari – Bacia do Tietê                       | 50 | -  | 14 | 18 | 6  | 12 | múltipla         |
|                                  | Córrego Tagaçaba – Afluente do Rio Ivaí (PR)      | 50 | -  | 10 | 22 | 6  | 12 | múltipla 2 pares |
|                                  | Córrego Tauá – Afluente do Rio Pirapó (PR)        | 50 | -  | 12 | 16 | 8  | 14 | múltipla         |
|                                  | Córrego do Cintra - Botucatu                      | 50 | -  | 8  | 18 | 14 | 10 | múltipla         |
|                                  | Córrego Cascatinha – Botucatu                     | 50 | -  | 7  | 16 | 12 | -  | múltipla         |
|                                  | Córrego Estância Funari - Botucatu                | 50 | -  | 4  | 18 | 16 | 12 | múltipla até 3   |
|                                  | Córrego da Igreja Santo Antônio – Bacia do Tietê  | 50 | -  | 6  | 26 | 8  | 10 | simples          |
| <i>Astyanax cf. scabripinnis</i> | Ribeirão dos Apertados – Afluente do Tibagi (PR)  | 46 | -  | 6  | 30 | 4  | 6  | -                |
|                                  | Rio São Francisco (MG)                            | 50 | 94 | 8  | 20 | 16 | 6  | -                |

|                                          |                                                  |    |    |    |    |    |    |                     |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|---------------------|
|                                          | Ribeirão Araras (SP)                             | 50 | 88 | 6  | 24 | 8  | 12 | múltipla<br>6 pares |
|                                          | Córrego Jataí –<br>Uberlândia (MG)               | 50 | 86 | 6  | 24 | 6  | 14 | múltipla<br>até 4   |
| <i>Astyanax scabripinnis<br/>paranae</i> | Ribeirão dos Bicudos<br>– Broto (SP)             | 50 | -  | -  | -  | -  | -  | -                   |
|                                          | Rio Cascatinha –<br>Tributário do Tietê<br>(SP)  | 50 | -  | 8  | 22 | 10 | 10 | múltipla<br>2 pares |
| <i>Astyanax schubarti</i>                | Rio Mogi- Guaçu<br>(SP)                          | 36 | 64 | 14 | 14 | 6  | 2  | -                   |
|                                          | Rio Mogi- Guaçu                                  | 36 | 64 | 12 | 16 | 4  | 4  | simples             |
| <i>Astyanax taeniatus</i>                | Rio Doce<br>(MG)                                 | 50 | 64 | 6  | 8  | 8  | 28 | -                   |
| <i>Astyanax cf. taeniatus</i>            | Rio Macacu – Bacia<br>dos Rios Costeiros<br>(RJ) | 50 | -  | 8  | 10 | 14 | 18 | -                   |