

UEDSON PEREIRA JACOBINA

VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (TELEOSTEI: ERYTHRINIDAE) EM LAGOS DO SUDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada á
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2008

UEDSON PEREIRA JACOBINA

VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (TELEOSTEI: ERYTHRINIDAE) EM LAGOS DO SUDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2008.

Prof. Gisele Mendes Lessa Del Giudice
(Co-orientadora)

Prof. Rubens Pazza

Prof. Sergio Luis Pinto da Matta

Prof. José Lino Neto

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico este trabalho a minha adorada mãe Beatriz, por proporcionar-me a plenitude e o encorajamento de vôos cada vez mais altos.

AGRADECIMENTOS

A minha rainha e mãe Beatriz Alencar, a quem amo muito, por toda confiança em mim depositada, meu agradecimento, respeito e admiração.

Ao professor amigo e orientador Jorge Dergam, pela oportunidade de desenvolver este trabalho tão importante para o meu avanço profissional, e por disponibilizar tempo e atenção nas diferentes situações e etapas que o curso exigia.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a CENIBRA pela infra-estrutura e auxílio financeiro na realização desse trabalho.

Ao grande amigo e irmão Henrique Batalha, que nestes seis longos anos de convivência pelos quais passamos juntos, 1º em Jequié e agora em Viçosa, sempre me apoiou e incentivou a galgar mais uma vitória.

Ao meu grande amigo flamenguista Lucioni Fava, obrigado pelo apoio, companheirismo e compreensão neste nesta árdua jornada de um ano e meio de mestrado.

Aos ótimos amigos do laboratório Neinha, Hilton, Lílian, Gisele, Edmar, Diego, Nathália, Ana Paula, Mariana e ao Tiagão, que abandonou-nos antes, mas por uma boa causa, obrigado pela dedicação, compreensão, flexibilidade, amizade e por fazer parte de um ambiente de trabalho maravilhoso.

Aos bons companheiros Michel (Lajinha) e Leonardo Calado (O Acabado) pelos grandes momentos de descontração nesta curta mais inesquecível caminhada.

Ao amigo Luiz Gustavo pela captura das imagens de CMA₃/DAPI.

Ao Daniel do laboratório de Geoprocessamento pela elaboração do mapa das lagoas do médio rio Doce.

Ao Edson da CENIBRA pelo auxílio nas coletas nas lagoas do médio rio Doce.

Ao profs. Renato Feio, Lucio Antonio Oliveira Campos, pelos ensinamentos, pelos momentos de alegria e contribuição na realização deste estudo.

Ao prof. Dejair Messenger por ceder o microscópio para a captura das metáfases.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pelo suporte e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, Adnilson e Ritinha pelas diversas contribuições dadas.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente pra consolidação deste trabalho.

BIOGRAFIA

UEDSON PEREIRA JACOBINA, filho de Lídio Jacobina Vieira Santos e Beatriz Alencar Pereira Jacobina, nasceu em 08 de abril de 1981, em Jacobina, Estado da Bahia.

Residente em Jacobina, interior da Bahia, concluiu o Ensino Fundamental na Escola Leticia Texeira em 1991, nesta mesma localidade.

Em 1992 ingressou no Colégio Armando Xavier de Oliveira localizado também em Jacobina onde realizou os estudos do Ensino Médio.

Em 2002 ingressou no curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Genética na Universidade Estadual da Bahia – Bahia, no qual se graduou em agosto de 2006.

Em outubro de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal com área de concentração em Citogenética de Peixes, pelo Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.

SÚMARIO

	pág.
LISTA DE FIGURAS -----	vii
LISTA DE TABELAS -----	ix
RESUMO -----	x
ABSTRACT -----	xi
CAPÍTULO 1 -----	1
1. INTRODUÇÃO GERAL -----	1
1.1 A Ictiologia Neotropical -----	1
1.2 A Bacia do Rio Doce -----	3
1.3 Considerações históricas e geomorfológicas da bacia do rio Doce -----	4
1.4 O sistema de lagoas do médio rio Doce -----	5
1.5 A Família Erythrinidae -----	8
1.6 Características biológicas de <i>Hoplias malabaricus</i> -----	9
1.7 Aspectos citogenéticos do complexo de espécies <i>Hoplias malabaricus</i> -----	10
1.8 Bandamentos Cromossômicos -----	12
2. METODOLOGIA -----	15
2.1 Preparação dos cromossomos mitóticos (tratamento “in vivo”) -----	15
2.2 Classificação dos cromossomos -----	16
2.3 Detecção de Heterocromatina Constitutiva (Bandamento C) -----	17
2.4 Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs ou RONS) -----	17
2.5 Detecção de Coloração Sequencial com Fluocromos DA/DAPI/CMA ₃) -----	18
2.6 Análise do Material -----	19
CAPÍTULO 2 -----	21
INTRODUÇÃO -----	21
MATERIAL E MÉTODOS -----	24
RESULTADOS -----	27
DISCUSSÃO -----	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	53
REFERÊNCIAS -----	54

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Bacia do rio Doce e seus principais afluentes	3
Figura 2. Mapa das lagoas coletadas no médio rio Doce	26
Figura 3. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Carioca Giemsa (a) e Bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	29
Figura 4. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Cristal Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	30
Figura 5. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Curi Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	31
Figura 6. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Hortência Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	32
Figura 7. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Juiz de Fora Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	33
Figura 8. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Linguíça Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	34
Figura 9. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Marola Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	35
Figura 10. Cariótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da população da lagoa Tiririca Giemsa (a) e bandamento C (b). A barra corresponde a 10 μm .	36
Figura 11. Ocorrência dos tipos de Nors nas populações de <i>H. malabaricus</i> do médio rio Doce.	37
Figura 12: Diferentes padrões de NORs obtidos por impregnação de nitrato de prata nas populações de <i>Hoplias malabaricus</i> das lagoas do médio rio Doce.	38
Figura 13. Fenograma de similaridade entre as populações pelos padrões de banda C e marcação com CMA ₃ positivo no cromossomo sexual de <i>Hoplias malabaricus</i> .	39
Figura 14. Mapa com a sobreposição do fenograma nas lagoas	40
Figura 15. Gráfico evidenciando a relação entre a distância geográfica em Km entre as lagoas estudadas do médio rio Doce e o índice de dissimilaridade ($p < 0,05$).	41

Figura 16. Idiograma dos cromossomos metacêntricos das populações de *Hoplias malabaricus* das oito lagoas estudadas, evidenciando a distribuição dos blocos de heterocromatina (coloração preta). 42

Figura 17. Idiograma dos cromossomos submetacêntricos e dos cromossomos sexuais das populações de *Hoplias malabaricus* das oito lagoas estudadas, evidenciando a distribuição dos blocos de heterocromatina (coloração preta). 43

Figura 18. Mefases mitóticas de *Hoplias malabaricus* das lagoas Marola (fêmea A, B e C), Tiririca (macho D, E, F) e Lingüiça (macho G, H, I) após coloração com Cromomicina (CMA₃) evidenciando bandas fluorescentes positivas (C,F, I), DAPI marcas negativas (B, E, H) e sobreposições CMA₃/DAPI (A, D ,G). A barra corresponde a 10 µm. 44

Figura 19. Mefases mitóticas de *Hoplias malabaricus* das lagoas Juiz de Fora (fêmea A, B e C), Curi (macho D, E, F) e Carioca (macho G, H, I) após coloração com Cromomicina (CMA₃) evidenciando bandas fluorescentes positivas (C, F, I), DAPI marcas negativas (B, E, H) e sobreposições CMA₃/DAPI (A, D,G). A barra corresponde a 10 µm. 45

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Lista das espécies de peixes das lagoas do médio rio Doce. Dados adaptados de Sunaga e Verani, (1983) e Vono e Barbosa, (2001).	7
Tabela 2. Dados citogenéticos de <i>Hoplias malabaricus</i> adaptado de Bertollo <i>et al</i> (2000).	11
Tabela 3. Pontos de Coleta na região do médio rio Doce.	24
Tabela 4. Padrão de variações de NORs entre as lagoas. + presença e – ausência.	37
Tabela 5. Padrões de distribuição de heterocromatina entre populações de <i>H. malabaricus</i> nas lagoas do médio rio Doce.	39
Anexo. Matriz binária dos dados de distribuição da heterocromatina e de CMA ₃ em <i>H. malabaricus</i> .	67

RESUMO

JACOBINA, Uedson Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Variabilidade cariotípica em populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) em lagos do sudeste do Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-orientadores: Gisele Mendes Lessa Del Giudice e Renato Neves Feio.

A espécie *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra, está presente em praticamente todas as bacias do Brasil. Sob o ponto citogenético, essa espécie possui sete citótipos diferenciáveis. Na bacia do rio Doce, dois citótipos com $2n=42$ A e B, foram caracterizados em simpatria e sintopia na lagoa Carioca. O objetivo deste trabalho foi determinar a extensão da ocorrência de simpatria destes citótipos em outras sete lagoas: Tiririca, Curi, Juiz de Fora, Cristal, Lingüiça, Hortência e Marola. Todas as populações analisadas apresentaram $2n=42$ cromossomos em machos e fêmeas, com cromossomos sexuais diferenciados e que correspondem ao citótipo B. Este citótipo B apresentou-se estável em coloração Giemsa, entretanto ocorreram grandes diferenças interpopulacionais relativas aos padrões de NORs, bandamento C e fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI. A presença de marcações biteloméricas pela impregnação da prata foi bem evidente nos machos e em algumas fêmeas nas oito lagoas estudadas, caracterizando as populações do médio rio Doce, embora pelos padrões de CMA₃ apresentou-se com baixa fluorescência. A constante diferença de tamanho observada entre os cromossomos X é explicada pela regulação transcricional. O polimorfismo cromossômico mais evidente e extenso foi o de variação de heterocromatina, aparentemente apresentando um padrão de isolamento por distância. Tal variação foi considerada como de caráter subespecífico. Conclui-se que as condições de isolamento de 14.000 anos envolveram, em cada população, eventos independentes de ganho e perda de heterocromatina e que as lagoas podem ser consideradas como unidades de manejo e conservação, mesmo para uma espécie que aparentemente não é afetada pelas espécies introduzidas.

ABSTRACT

JACOBINA, Uedson Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **Karyotypic variability in populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) in lakes of southeastern Brazil.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Advisers: Gisele Mendes Lessa Del Giudice and Renato Neves Feio.

The species *Hoplias malabaricus* popularly known as trahira occurs in almost all Brazilian basins. Seven cytogenetic forms, cytotypes are recognized within this nominal taxon. Two $2n=42$ cytotypes (A and B) occur in the Doce River Basin are sympatric in the Carioca lake. This study aimed to determine the extension of sympatry of these cytotypes in other seven lakes: Tiririca, Curi, Juiz de Fora, Cristal, Lingüiça, Hortência e Marola. All populations were $2n=42$ and males and females had differentiated sex chromosomes, belonging to cytotype B. Gross morphology (Giemsa staining) of cytotype B was highly stable, but high levels of variation were observed in NORs, C-banding and base-specific fluorochromes. All populations were characterized by a sex bias in bitelomeric NORs, which occurred in all males and only some females. CMA₃ fluorescence of these regions was less evident. In females, an association of heterochromatin and NOR apparently defined a constant difference between the X chromosomes. Chromosomal polymorphism was more extensive and evident in heterochromatin variation, involving all chromosomes. A similarity analysis among lakes suggests an isolation by distance process of differentiation. This variation was considered as subspecific. We concluded that conditions of isolation along 14,000 years were restricted to independent processes of loss and gain of heterochromatin and that the lakes may be considered as units of management and conservation, even for a species that is resilient to the effects of introduced species.

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - A ictiologia neotropical

Desvendar o cenário evolutivo da fauna de peixes de água doce neotropical é o grande desafio dos ictiólogos. Três séculos já se passaram após as primeiras descrições de peixes de água doce nas Américas do Sul e Central, e ainda sabe-se muito pouco sobre os fatores que determinaram a grande diversidade dos peixes neotropicais. Muitas classificações tradicionais estão sendo reanalisadas e novas hipóteses filogenéticas elaboradas.

Segundo Böhlke *et al.* (1978), dentre os vários obstáculos que dificultam o maior conhecimento da fauna neotropical de peixes de água doce, devem ser ressaltados a riqueza e a complexidade dessa fauna, a vasta extensão dos sistemas aquáticos, os limitados recursos humanos e a infra-estrutura destinada à pesquisa. O ambiente aquático em que os peixes vivem torna mais difícil a sua observação e a determinação dos parâmetros biológicos, em comparação com a maioria dos outros vertebrados.

Estima-se que existam cerca 8.000 espécies na região Neotropical, constituindo a maior diversidade de peixes de água doce do mundo (Vari & Malabarba, 1998). Devido à íntima dependência dos peixes de água doce ao meio aquático, a ampla irradiação evolutiva de formas está, necessariamente, relacionada a fatores históricos e ecológicos envolvendo processos geomorfológicos antigos e recentes.

Em princípio, não existe um início definido sobre a origem das principais feições geomorfológicas determinantes da diversidade de peixes de água doce no continente sul-americano. Em termos mais restritos, relativos à fauna costeira atual, considera-se que a macrogeomorfologia da região começou com a formação do Atlântico Sul, provocada pela separação dos continentes da África e da América do Sul. Na região norte, a formação do istmo do Panamá representou o contato entre a América do Sul e a América Central e as montanhas dos Andes que dividem as drenagens do Pacífico, da América do

Sul, do Caribe e do Atlântico (Lundberg *et al.*, 1998). Estes eventos moldaram o cenário de evolução dos organismos aquáticos, possibilitando a criação de grande diversidade de ambientes e faunas com características ecológicas próprias, permitindo uma irradiação evolutiva provavelmente igualada ou superada apenas pelos peixes marinhos da região Indo-Pacífica (Böhlke *et al.*, 1978). Os efeitos vicariantes na deriva continental, associados a mudanças no nível do mar, principalmente durante as glaciações quaternárias, podem ter permitido a distribuição de muitas espécies de peixes e ter auxiliado nas dispersões de muitos grupos. Talvez as flutuações climáticas possam ter contribuído para especiação e recombinação de várias populações em vez de generalizá-las (Lowe-McConnell, 1987). Já existem hipóteses biogeográficas baseadas em estudos filogenéticos, que parecem ser resultado de múltiplos padrões históricos como consequência de diferentes respostas dos componentes da ictiofauna a possíveis eventos vicariantes seqüenciais (Lundberg *et al.*, 1998).

Com o fim da reativação e da separação completa relacionada de Gondwana, começou a história independente da América do Sul e a dos rios do Atlântico. Ao longo da margem leste do continente, a fragmentação resultou em um sistema de soerguimentos e rebaixamentos ("rift-valleys") e montanhas de blocos falhados (Ab'Sáber, 1998). Segundo este autor, a porção leste do continente representa um dos mais notáveis exemplos de complexidade evolutiva da drenagem sul-americana. No litoral leste do Brasil, alguns rios formam uma série de bacias isoladas, que são drenadas para o Atlântico Sul, tendo como os principais sistemas hidrográficos os rios Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Paraíba do Sul, Ribeira Iguape, Itajaí, Jacuí e Doce. Reconhece-se que a dinâmica de níveis eustáticos nos períodos glaciais e inter-glaciais pode explicar a semelhança faunística entre estas bacias (Ribeiro, 2006). No Estado de Minas Gerais, a bacia do rio Doce destaca-se pela abrangência geográfica (83.400 km²) e pelo estado precário de sua conservação (Alves & Viera, 1996).

1. 2 - A bacia do rio Doce

A bacia hidrográfica do rio Doce está situada na região Sudeste, entre os paralelos 18°45' e 21°15' de latitude sul e os meridianos 39°55' e 43°45' de longitude oeste, sendo 86% da drenagem pertencentes ao estado de Minas Gerais e o restante ao estado do Espírito Santo. Limita-se ao sul com a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, a oeste com a bacia do rio São Francisco, e, em pequena extensão, com a do rio Grande. Ao norte, limita-se com a bacia dos rios Jequitinhonha e Mucuri e a noroeste com a bacia do rio São Mateus. As suas nascentes estão situadas entre a serra da Mantiqueira e a serra do Espinhaço e correm na direção leste para o Oceano Atlântico. Seus principais afluentes são: pela margem esquerda os rios Piracicaba, Santo Antônio e Suaçuí Grande, em Minas Gerais, Pancas e São José, no Espírito Santo; pela margem direita os rios Casca, Matipó, Caratinga-Cuieté e Manhuaçu, em Minas Gerais, e Guandu, no Espírito Santo (Figura 1).

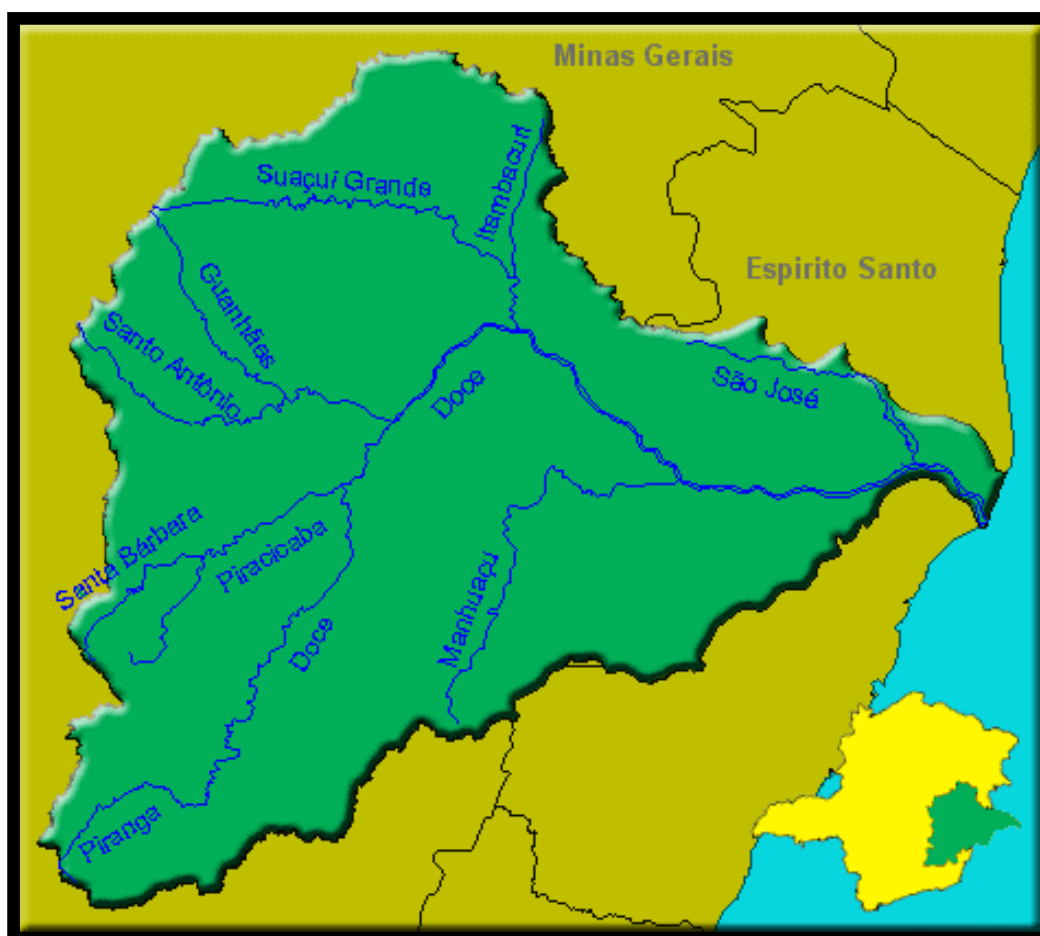


Figura 1. Bacia do rio Doce com alguns de seus principais afluentes (fonte: simge.mg.gov.br).

Com base em dados morfológicos, Godinho & Vieira (1998) reconhecem 77 espécies de peixes que vivem na bacia do rio Doce, das quais 37 são endêmicas ou de distribuição restrita à bacia. Esta diversidade de peixes está extremamente ameaçada, devido às alterações antrópicas como mineração, poluição por esgoto, alteração de habitat devido à construção de barragens e especialmente, à introdução de espécies exóticas, as quais são consideradas a principal causa de extinção de peixes de água doce. Em nível global conforme Harrison & Stiassny (<http://creo.amnh.org/pdi.html>), 11 das 23 extinções de peixes no mundo têm como principal causa, as espécies introduzidas.

1.3 - Considerações históricas e geomorfológicas da bacia do rio Doce

Semelhante às outras drenagens costeiras, a bacia do rio Doce possui uma história geomorfológica relacionada às flutuações do nível do mar em eras glaciais e interglaciais, que determinaram alterações no seu curso em direção ao leste do Oceano Atlântico. No passado, o rio Doce abandonou os canais ramificados após intensa fase erosiva na frente de progradação do delta passando a correr num único leito atual e transformando-se em rio anastomosado. Nos primeiros tempos da fase de rio anastomosado, sua desembocadura localizava-se cerca de 10 quilômetros ao norte do atual. A dinâmica costeira propiciou a formação de bancos paralelos à costa, obstruindo o fluxo do rio, que se desviou para o sul. O rompimento das cúspides de cordões litorâneos que bordejavam a antiga desembocadura, visível nas fotos aéreas, indica que a mudança para a posição atual ocorreu de forma rápida (Bandeira Jr *et al.*, 1975).

No Brasil são evidentes as provas de variação do nível do mar durante o Quaternário. As amplas planícies costeiras, caracterizadas pelos cordões litorâneos paralelos à costa e os depósitos com restos de organismos marinhos, presentes nessas planícies, demonstram que elas foram ocupadas por mar holocênico (Petri & Fúlfaro, 1983). Quando o mar estava mais recuado os rios costeiros cavaram seus vales, em certos casos, até cotas inferiores ao presente nível do mar, condicionados a um nível do mar mais baixo. Com a ingressão marinha subsequente as desembocaduras dos rios principais e afluentes ficaram afogadas e assoreadas devido à intensa sedimentação. As

águas dos cursos a montante e das enchentes saturadas de sedimentos invadiram parcialmente as áreas represadas perdendo rapidamente a velocidade, formando verdadeiros diques normais ao curso principal e isolando lagoas. É o caso, por exemplo, de inúmeras lagoas alongadas, encaixadas nos tabuleiros terciários, que bordejam a planície deltaica do rio Doce (Bandeira Jr *et al.*, 1975). A grande maioria dessas lagoas encontra-se hoje assoreadas, sendo que o assoreamento é proporcional à área da drenagem do curso represado.

1.4 O sistema de lagoas do médio rio Doce

As lagoas do médio rio Doce tiveram origem bastante complexa envolvendo processos de levantamentos de crosta, com formação de montanhas, falhas tectônicas, processos erosivos e deposição de sedimentos, ocasionando a mudança do leito do rio Doce e preenchimento dos paleovales com sedimentos o que levou a formação de aproximadamente 160 lagos (Pflug, 1969). Em se tratando da idade das lagoas do médio rio Doce, a datação dos depósitos aluviais oriundos de acumulação dos vales tributários indica que esta fase foi finalizada entre 10.000 e 14.000 anos atrás (Meis & Monteiro, 1979).

As lagoas do médio rio Doce - MG estão localizadas entre latitudes 19°48' - 19°29'S e longitudes 42°29' - 42°28'W. Estes corpos d'água apresentam morfometria predominante dendrítica, com tamanhos e profundidades diferenciadas e estão em geral relativamente afastados da calha do rio Doce, com resultado da formação de várias calhas ao longo do tempo. São sistemas permanentes e fechados com ciclo hidrológico regido diretamente pelo aporte de água de chuvas ou pelo escoamento da bacia de drenagem, com contribuições do lençol freático (Espíndola *et al.*, 2003). Em termos de hidrodinâmica, as lagoas do médio rio Doce são muito estáveis, com padrões de circulação vinculados as variações climáticas sazonais. Anualmente, a maioria dessas lagoas se estratifica na primavera, permanecem estratificadas durante o verão e o outono, havendo circulação da coluna d'água no inverno. As principais forças que influenciam a hidrodinâmica destas lagoas são as

variáveis climatológicas, especialmente a radiação solar, a precipitação pluviométrica e o vento (Tundisi & Meis, 1985).

As lagoas são geralmente ricas em nutrientes e sustentam uma flora rica em fitoplâncton, porém, possuem relativamente baixa diversidade em espécies de peixes e invertebrados. Isoladas, estas lagoas podem ser consideradas como ilhas que apresentariam um equilíbrio entre colonização e extinção, com resultante final de níveis diferenciados de riqueza e tamanho das populações (Espíndola *et al.*, 2003). As diferenças quanto à composição de espécies em cada lago foram anteriormente interpretadas como evidência de que as lagoas seriam verdadeiras ilhas de comunidades de peixes (Sunaga & Verani, 1983).

Pesquisas sobre os peixes destas lagoas têm sido bastante freqüentes nas últimas décadas (Sunaga & Verani, 1983 e 1989; Godinho & Godinho 1995; Vono & Barbosa, 2001; Pompeu & Godinho, 2001; Dergam *et al.*, 2002; Latini 2004 e 2005). Os diversos levantamentos de ictiofauna verificaram a existência de 23 espécies representando 11 famílias (Tabela 1).

Utilizando a metodologia de estudo RAP (Protocolos de Avaliação Rápida), Latini (2005) constatou que 52 lagoas em 56 apresentam espécies não nativas. O tucunaré e a piranha ocorrem em 58,9% das lagoas, enquanto as cinco espécies restantes ocorrem nas seguintes proporções: *Clarias gariepinus* (bagre africano) 14,3%, *Hoplosternum littorale* (tamboatá) 14,3%, *Astronotus ocellatus* (apaiari) 10,7%, *Oreochromis niloticus* (tilápia) 5,3% e *Colossoma macropomum* (tambaqui) 1,7% das lagoas estudadas.

Dentre as espécies nativas algumas se destacam por serem de ampla de distribuição e podem ser analisadas sob a perspectiva de estudos populacionais. Uma delas é a traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), sendo que algumas populações de traíras deste sistema de lagoas já foram estudadas por Ferreira *et al.* (1989), Dergam *et al.* (2002) e Born & Bertollo (2000; 2006).

Tabela 1. Lista das espécies de peixes das lagoas do médio rio Doce. Modificado de Sunaga e Verani (1983) e Vono e Barbosa (2001).

Taxa	Nome Vulgar	Lagoas					
		D. Helvécio	Carioca	Jacaré	Amarela	Hortência	da Pedra
Ord. Characiformes							
Fam. Characidae							
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Tambiú	+	+	+	+	+	-
<i>Astyanax</i> sp.	Lambari	+	-	-	-	+	+
<i>Astyanax fasciatus</i>	Lambari	-	+	-	-	-	-
<i>Astyanax taeniatus</i>	Lambari	-	-	-	-	+	+
<i>Moenkhausia doceana</i>	Chatinha	+	+	-	-	+	+
<i>Characidium</i> sp.	Canivete	-	-	-	-	+	+
<i>Oligosarcus solitarius</i>	Lambari-bocarra	+	+	-	+	-	-
Subfam. Bryconinae							
<i>Brycon</i> cf. <i>ferox</i>	Piabanha	+	+	-	-	-	-
Sufam. Serrasalminae							
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Piranha	+	+	+	-	-	-
Fam. Curimatidae							
<i>Cyphocharax gilbert</i>	Sardinha	-	+	-	+	-	-
Fam. Prochilodontidae							
<i>Prochilodus vimbooides</i>	Curimba	+	-	+	-	-	-
Fam. Anostomidae							
<i>Leporinus steindachneri</i>	Piau-caboclo	-	+	-	-	-	-
Fam. Erythrinidae							
<i>Hoplias malabaricus</i>	Traíra	+	+	+	+	+	+
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	Jeju	-	+	-	-	+	+
Ord. Siluriformes							
Fam. Auchenipteridae							
<i>Parauchenipterus striatulus</i>	Cumbaca	-	+	-	+	-	-
Fam. Pimelodidae							
<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre	-	+	+	+	+	-
Fam. Loricariidae							
<i>Loricariichthys spixii</i>	Cascudinho	-	-	+	-	-	+
Ord. Perciformes							
Fam. Cichlidae							
<i>Cichla monoculus</i>	Tucunaré	+	+	+	-	-	-
<i>Cichlasoma facetum</i>	Riscadinho	-	-	+	-	+	-
<i>Crenicichla</i> cf. <i>lacustris</i>	Bastiana	-	-	+	-	-	-
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Cará	+	+	+	-	+	-
Fam. Scianidae							
<i>Pachyurus adpersus</i>	Curvina	+	-	+	-	-	+
Ord. Gymnotiformes							
Fam. Gymnotidae							
<i>Gymnotus carapo</i>	Sarapó	-	-	-	-	+	+

1.5 - A Família Erythrinidae

Hoplias malabaricus pertence à ordem Characiformes, que inclui peixes distribuídos em todos os continentes, exceto na Austrália e Antártida (Moyle & Cech, 1988). Os Characiformes são peixes restritos basicamente a ambientes de água doce e que possuem grande diversidade morfológica no formato do corpo, estruturas maxilares, dentições e anatomia interna e estão representadas por aproximadamente 1.300 espécies (Da Rosa, 2006). Dentro da ordem, o alto nível de variação representa fontes potencialmente informativas para questões de cunho filogenético. Entretanto, o parentesco em vários níveis sistemáticos é pouco conhecido, incluindo a monofilia dos Characiformes. Sabe-se que dentro do táxon é comum a existência de evolução convergente e as revisões das espécies são feitas geralmente dentro de famílias (Nelson, 1994).

A família Erythrinidae é relativamente pequena dentre os Characiformes, com seus representantes, em geral, sendo predadores piscívoros. Apresentam corpo cilíndrico e curto, nadadeira caudal arredondada, dentes caninos na maxila superior e inferior, dentes pequeno no osso mesopterigóide do palato e nas traíras, sobre a língua determinando uma superfície áspera ao tato. A família é composta pelos gêneros *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903. Os Erythrinidae ocorrem desde a Costa Rica até o rio Colorado na Argentina (Oyakawa, 2003). *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* são conhecidos popularmente por “jejus” ou “marobás”, enquanto o gênero *Hoplias* inclui as “traíras” e “trairões”.

O gênero *Hoplerythrinus* é composto por três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847), *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Oyakawa, 2003). Este gênero possui ampla distribuição na região neotropical, embora possua hábito sedentário e não migrador, formando populações isoladas geralmente em lagos ou lagoas marginais (Trego *et al.*, 2002). O gênero *Erythrinus* é representado pelas espécies *E. erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) e *E. kessleri* (Steindachner, 1876) e distribuem-se na América do Sul e nos rios brasileiros do estado da Bahia, respectivamente (Oyakawa, 2003).

O gênero *Hoplias* se distingue dos outros dois gêneros da família por apresentar dentes caninos no maxilar e na porção superior e inferior do dentário. Possuem nadadeira ventral com 8 raios e nadadeira anal com 10 a 12 raios (Britski *et al.*, 1988). Segundo Oyakawa (2003), o gênero é composto por nove espécies: *H. aimara* (Valenciennes, 1847), *H. brasiliensis* (Agassiz, 1829), *H. lacerdae* (Miranda Ribeiro, 1908), *H. macrophthalmus* (Pellegrin, 1902), *H. malabaricus* (Bloch, 1794), *H. microcephalus* (Agassiz, 1820), *H. microlepis* (Günther, 1864), *H. patana* (Valenciennes, 1847) e *H. teres* (Valenciennes, 1847). Cinco delas ocorrem no Brasil: *H. aimara*, *H. brasiliensis*, *H. lacerdae*, *H. malabaricus* e *H. microcephalus*. *H. lacerdae* e *H. malabaricus* são as mais amplamente distribuídas e distinguem-se pela aparência da região gular, onde em *H. malabaricus* a linha dentária converge em forma de “V” com o vértice apontando para a sínfise mandibular, enquanto em *H. lacerdae* estas linhas são aproximadamente paralelas e não se encontram na região sinfisiana (Britski *et al.*, 1972).

1.6- Características biológicas de *Hoplias malabaricus*

Hoplias malabaricus é um peixe predador carnívoro e sua distribuição na América do Sul equivale à distribuição dos Erythrinidae. Habita ambientes preferencialmente lênticos e não apresenta hábitos migratórios. Não apresenta nadadeira adiposa, característica típica da maioria dos Characiformes. Geralmente seu corpo apresenta listras irregulares, e a parte inferior da cabeça apresenta-se marmoreada. As nadadeiras dorsais, anais e caudais também possuem listras, porém, escuras alternadas com claras e as nadadeiras peitorais são manchadas. A sua fecundação é externa com desova parcelada e com cuidado parental, uma característica própria de espécies sedentárias (Lamas, 1993). A coloração da traíra varia de parda a marrom com boca terminal apresentando leve prognatismo (Britski *et al.*, 1988). Embora estudos morfológicos sejam ainda pouco em *H. malabaricus*, os estudos citogenéticos nesta espécie teve início com os trabalhos de Bertollo (1978). Nas últimas décadas, a espécie tornou-se um modelo para estudos de evolução cariotípica na região neotropical (Bertollo *et al.*, 2000).

1.7- Aspectos citogenéticos da espécie *Hoplias malabaricus*

A sistemática da espécie *H. malabaricus* conhecida vulgarmente como traíra continua não resolvida desde a sua descrição feita por Bloch em 1794, que apontou sua localidade tipo como Malabar, na Índia. Segundo Dergam (1996), evidências circunstanciais - como o fato de que todas as espécies descritas por Bloch provinham do Suriname - sugerem que o material-tipo seja o Suriname. Os primeiros estudos citogenéticos nesta espécie nominal (Bertollo *et al.*, 1978) evidenciaram que suas populações mostram diferenças quanto ao número diplóide, variando de $2n=39$ em machos do Paraná superior, a 42 cromossomos em populações de diferentes localidades. Posteriormente, Bertollo *et al.* (2000), indicaram a existência de sete citótipos em *H. malabaricus*, com diferenciações interpopulacionais acentuadas nos cariótipos. Estes autores classificaram os citótipos em dois grandes grupos cariotípicos, denominados grupo I (citótipos A, B, C e D) e Grupo II (citótipos E, F e G) (Tabela 2). Os sistemas de cromossomos sexuais, assim como a ocorrência de cromossomos atípicos são especialmente informativos para compreensão das relações evolutivas entre os citótipos do que as similaridades no número diplóide.

Alguns citótipos mostram ampla distribuição geográfica, enquanto outros parecem ser endêmicos a determinadas bacias hidrográficas. Situações de simpatria e sintopia entre citótipos, sem a detecção de espécimes com fórmulas cromossômicas híbridas, já foram constatadas em várias localidades, o que reforça a diferenciação existente nesse grupo, sugerindo a inexistência de fluxo gênico entre os citótipos (Ferreira *et al.*, 1989; Scavone *et al.*, 1994; Lemos *et al.*, 2002; Pazza & Júlio Jr 2003; Born & Bertollo, 2006). A biologia molecular vem complementando os estudos citogenéticos, reiterando a diferenciação presente nesse grupo (Dergam *et al.*, 1996; 2002).

Tabela 2. Dados citogenéticos de *Hoplias malabaricus*. Modificado de Bertollo *et al.*, (2000).

Localidade	Citótipo	2n Fórmula	Sistema Sexual	Referências
Manaus (AM) – igarapé mindú	A	42M/SM	-	2
Poconé (MT) – rio Bento Gomes	A	42M/SM	-	2
Araguaiana (MT) – córrego dois de agosto	A	42M/SM	-	2,11
Reserva Ecológica do Jataí (SP) – rio Mogi-Guaçu	A	42M/SM	-	9
Três Marias (MG) – rio São Francisco	A	42M/SM	-	2
S. J. do Marinho (SP) – rio Grande	A	42M/SM	-	2,14
Conceição das Alagoas (MG) – rio Grande	A	42M/SM	-	10
Juquiá (SP) – rio Juquiá	A	42M/SM	-	12
Itatinga (SP) – : rio Paranapanema	A	42M/SM	-	2
Poço Preto (SC) – rio Iguaçu	A	42M/SM	-	2
Guaíba (RS) – rio Guaíba	A	42M/SM	-	2
Corrientes – Argentina – rio Aguapey	A	42M/SM	-	3,4
Palmeira (PR) – rio Iguaçu	A	42m/sm	-	18,19
Ponta Grossa (PR) – rio Tibagi	A	42m/sm	-	19
Ivaí (PR) – rio Ivaí	A	42m/sm	-	19
Ponta Grossa e Castro (PR) – rio Ribeira	A	42m/sm	-	19
Piraquera – Açu (SP) – rio Ribeira	A	42m/sm	-	19
Nova Prata do Iguaçu (PR) – rio Iguaçu	A	42m/sm	-	20
Parque Estadual Rio Doce (MG) Lagoa Carioca	A	42m/sm	-	21
Aragarças (GO) – rio Araguaia	C	40M/SM	-	2
Goiás Velho (GO)	C	40M/SM	-	1
Corumbá (MS) – rio Paraguai	C	40M/SM	-	1,2
Miranda (MS) – rio Miranda	C	40M/SM	-	1,2
Misiones – Argentina – rio Paraná	C	40M/SM	-	3
Corrientes – Argentina – rio Aguapey, rio Riachuelo	C	40M/SM	-	4,5
Itirapina (SP) – represa do Lobo	D	40M/SM	X1X1X2X2	2,6
		39MSM	X1X2Y	
São Carlos (SP) – ribeirão Monjolinho	D	40M/SM	X1X1X2X2	2,7,8
		39MSM	X1X2Y	
Pirassununga (SP) – rio Mogi-Guaçu	D	40M/SM	X1X1X2X2	2,8
		39MSM	X1X2Y	
Ipeúna (SP) – rio Passa-Cinco	D	40M/SM	X1X1X2X2	9
		39MSM	X1X2Y	
Piracicaba (SP) – rio Piracicaba	D	40M/SM	X1X1X2X2	9
		39MSM	X1X2Y	
Novo Horizonte (SP) – rio Três Pontes	D	40M/SM	X1X1X2X2	9
		39MSM	X1X2Y	
Mirassolândia (SP) – ribeirão Barra Grande	D	40M/SM	X1X1X2X2	2
		39MSM	X1X2Y	
Reserva Ecológica Jataí (SP) – rio Mogi-Guaçu	D	40M/SM	X1X1X2X2	9
		39MSM	X1X2Y	
Conceição das Alagoas (MG) – rio Grande	D	40M/SM	X1X1X2X2	10
		39MSM	X1X2Y	
Londrina (PR) – ribeirão Três Bocas	D	40M/SM	X1X1X2X2	2
		39MSM	X1X2Y	
Porto Trombetas (PA) – rio Trombetas	E	42M/SM/A	-	2
Jequié (BA) – rio das Contas	F	40M/SM	-	17
Jacobina (BA) rio Itapicuru	F	40M/SM	-	17
Paramaribo – Suriname	F	40M/SM	-	1
Tucuruí (PA) – rio Tocantins	F	40M/SM	-	1
São Luiz (MA)	F	40M/SM	-	1
Natal (RN) – lagoa Redonda	F	40M/SM	-	1,2
Recife (PE)	F	40M/SM	-	1
Três Marias (MG) – rio São Francisco	F	40M/SM	-	1,7
		40M/SM	XX	
Porto Trombetas (PA) – rio Trombetas	G	41M/SM/A	XY1Y2	2
		40M/SM	XX	
Porto Velho (RO) – rio Madeira	G	41M/SM/A	XY1Y2	2
		40M/SM	XX	
Aripuanã (MT) – rio Aripuanã	G	41M/SM/A	XY1Y2	2,6

Referências: 1. Bertollo *et al.* (1997a); 2. Bertollo *et al.* (2000); 3. Lopes e Fenocchio (1994); 4. Lopes *et al.* (1998); 5. Jorge (1995); 6. Bertollo *et al.* (1983); 7. Dergam e Bertollo (1990); 8. Bertollo *et al.* (1997b); 9. Scavone *et al.* (1994); 10. Dergam (1996); 11. Born (não publicado); 12. Bertollo *et al.* (1979); 13. Ferreira *et al.* (1989); 14. Cavallini e Bertollo (não publicado); 15. Dergam (não publicado); 16. Born e Bertollo (2000); 17. Jacobina (não publicado); 18. Vicari *et al.* (2003); 19. Vicari *et al.* (2003b); 19. Vicari *et al.* (2005); Born & Bertollo (2006).

Na bacia do rio Doce as primeiras populações foram estudadas por Bertollo *et al.* (1978), que as caracterizou como $2n=42$. Posteriormente, Ferreira *et al.* (1989) e Born & Bertollo (2000; 2006) descreveram a ocorrência de dois citótipos A e B com o mesmo número diplóide $2n=42$ na Lagoa Carioca. O citótipo A caracteriza-se pela fórmula cromossômica 11 pares metacêntricos e 10 pares submetacêntricos e pela ausência de cromossomos sexuais diferenciados citologicamente. Ele ocorre com baixa frequência (1/22 em Ferreira *et al.*, 1989 e 1/22 em Born & Bertollo, 2006). O citótipo B é abundante e apresenta fórmula cromossômica 12 pares metacêntricos e 9 pares submetacêntricos e um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, o qual estaria relacionado à presença de cistrons de DNA ribossomal (Born & Bertollo, 2000). Born & Bertollo determinaram que os cromossomos X do citótipo B apresentam um grande bloco de heterocromatina, o que contrasta com o pequeno bloco do cromossomo Y. Em termos biogeográficos, a bacia do rio Doce é a única bacia costeira que apresenta dois citótipos vivendo em sintopia.

1.8- Bandamentos Cromossômicos

Nas últimas décadas, a citogenética vem se destacando por uma abordagem eficiente na caracterização de grupos naturais, utilizando dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e na elaboração de padrões de relacionamento e ou filogenias (citossistemática). Essa ferramenta vem oferecendo o suporte para espécies taxonomicamente problemáticas ou em casos possíveis de espécies crípticas (Bertollo *et al.*, 1986). A grande maioria das espécies é cariotipicamente única, diferindo de outras em relação ao número e a morfologia cromossômica e/ou em relação a características citológicas (Dias & Giuliano-Caetano, 2002).

Em peixes, a maioria dos estudos citogenéticos utilizam técnicas como coloração convencional por Giemsa, impregnação pela prata para o reconhecimento das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) e visualização da heterocromatina constitutiva (Bandamento C) (Nirchio & Oliveira, 2006). Os estudos realizados em diferentes grupos de peixes neotropicais permitem delinear algumas tendências quanto à evolução cariotípica de alguns grupos, considerando número, fórmula cromossômica,

localização de sistemas de cromossomos sexuais assim como a detecção de cromossomos B ou supra-numerários (Almeida-Toledo, 1998). Estes conhecimentos estão possibilitando um tipo de abordagem com vários fins aplicativos em peixes sob o ponto de vista da biotecnologia, destacando-se a manipulação cromossômica e a obtenção de linhagens poliplóides, ginogenéticas, androgenéticas e de híbridos interespecíficos (Toledo-Filho *et al.*, 1998).

As NORs são regiões do DNA responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, ocorrem em padrões característicos nos diferentes grupos de peixes, podendo variar no número, localização, intensidade de coloração e tamanho, com diferenças inter-individuais dentro de uma mesma espécie ou mesmo na modalidade de mosaico, entre células de um mesmo indivíduo (Morelli, 1998). Variações numéricas inter ou intra-individuais no tamanho, localização e no número já foram descritas em vários gêneros. Em alguns grupos apenas um par de cromossomos é corado com prata. Este padrão já foi observado em Prochilodontidae (Pauls & Bertollo, 1990), Anostomidae (Galetti *et al.*, 1984), Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1984) entre outros. Em outros peixes ocorrem NORs múltiplas e simples, como *Astyanax* (Morelli, 1981; Moreira-Filho, 1989; Paganelli, 1990) ou múltiplas como em *Serrasalmus* (Galetti *et al.*, 1985). Em *Hoplias malabaricus* as NORs são múltiplas com números variando entre três até sete (Bertollo, 1996).

O Bandamento C evidencia regiões de DNA altamente repetitivo (Guerra, 1988), pode também estar presente nas NORs, como também em centrômeros, telômeros assim como em regiões intersticiais. A posição da heterocromatina em *Hoplias malabaricus* ocorre tipicamente na região centromérica de todos os cromossomos e na região telomérica de alguns cromossomos.

Outras técnicas de bandamentos têm sido empregadas para caracterização das NORs como fluorocromos base específicos. A cromomicina A3 por exemplo, evidencia blocos ricos em GC específicos nos cromossomos presentes nas regiões interespaçadoras das NORs, independentemente do estado de atividade delas (Schweizer, 1980). O DAPI, que evidencia regiões ricas em AT é associado para evidenciar os diferentes tipos blocos de heterocromatina podendo separá-la em dois grupos: facultativa ou constitutiva

(Schweizer, 1980). Esses estudos de padrões de NORs, heterocromatina ou fluorocromos base- específico podem identificar e esclarecer polimorfismos cromossômicos e cromossomos sexuais, assim como esclarecer entendimento sobre alguns processos evolutivos cariotípicos em diferentes grupos de peixes.

2- METODOLOGIA

2.1- Preparação dos cromossomos mitóticos (tratamento “in vivo”).

O tecido utilizado para análises citogenéticas foi o rim cefálico, o qual consiste basicamente de tecido linfóide. A técnica de preparo foi originalmente descrita por Egozque (1971) e modificada para peixes (Bertollo *et al.*, 1978). As divisões celulares no tecido renal cefálico podem ser estimuladas por meio de agentes mitogênicos como fermento biológico ou um antígeno comercial (Munolan®). O comprimido de antígeno é dissolvido em 2 mL de água e injetado na cavidade peritoneal em doses diárias, na razão de um comprimido por 100 g de peso total. Geralmente, os peixes são processados após duas doses de Munolan.

01- Injetar, na cavidade peritoneal, solução aquosa de colchicina (0,025% em peso/volume) na proporção 1 mL/100 g de peso do animal.

02- Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 30 a 35 minutos. Decorrido esse tempo, sacrificar o animal e retirar o rim cefálico.

03- Lavar rapidamente o rim, em solução hipotônica de KCl (0,075 M).

04- Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M).

05- Fragmentar bem o material, com auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até obter uma suspensão celular homogênea.

06- Colocar a suspensão obtida a 36-37°C, durante 20 min.

07- Filtrar a solução em lâ de vidro e transferi-la para um tubo Falcon de 15 mL.

08- Acrescentar gotas de fixador recém preparado (álcool metílico: ácido acético na proporção de 3/1) na proporção de uma gota para cada mL de suspensão; ressuspender o material e centrifugar por 10 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur. Desagregar o botão celular

com vibração produzida por batidas leves do dedo indicador no fundo do tubo Falcon.

09- Adicionar, vagorosamente, 5 a 7 mL de fixador recém preparado, deixando-o escorrer pela parede do tubo.

10- Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar o material por 10 minutos a 1000 rpm, descartando o sobrenadante.

11- Repetir os itens 08 e 09. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1,5 a 2 mL de fixador e ressuspender bem o material. O material pode então ser guardado no refrigerador por um período aproximado de um mês, acondicionado em pequenos frascos plásticos, tipo Eppendorf, ou trabalhado imediatamente conforme os seguintes passos:

12- Pingar 3 a 4 gotas de suspensão, com pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, aquecida em água destilada a 80°C.

13- Eliminar o excesso de material e fixador, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro.

14- Secar ao ar.

15- Corar com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 7- 10 minutos.

16- Lavar a lâmina com água de torneira e deixar secar ao ar.

2.2 - Classificação dos cromossomos.

Os cromossomos mitóticos foram classificados de acordo com Levan *et al.* (1964), com base no índice relação de braços (RB = comprimento do braço maior / comprimento do braço menor), da seguinte forma:

1,00 – 1,69 metacêntrico (m)

1.70 – 2.99 submetacêntrico (sm)

3,00 – 6,99 subtelocêntrico (st)

7,00 – ∞ telocêntrico (t)

2.3 - Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandamento C).

Bandamento é uma abordagem química ou molecular que permite determinar a organização do cromossomo eucarioto, por meio da diferenciação longitudinal dos braços cromossômicos (Sumner, 1972). O padrão de heterocromatina constitutiva das espécies tem sido um dado cariotípico muito relevante em estudos de peixes neotropicais (Almeida-Toledo, 1998).

Para o estudo da heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica de Sumner (1972), com pequenas modificações:

1-Tratar o material, preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N em temperatura de 42° C, por 6 min.

2- Lavar em água destilada e secar ao ar.

3- Incubar a lâmina por 25 s a 1 min, em solução de Ba (OH)₂ 8H₂O, a 5%, a 42°C, recém preparada e filtrada. O tempo do tratamento do hidróxido de bário deve ser determinado para cada espécie. Melhores resultados com o tempo de 55 s a 1 minuto.

4- Lavar rapidamente em solução de HCl 0,2 N.

5- Lavar várias vezes em água destilada e secar ao ar.

6- Incubar em solução 2X SSC, a 60°C, por 1 hora.

7- Lavar várias vezes em água destilada e secar ao ar.

8- Corar em Giemsa, diluído a 2% em tampão fosfato pH 6.8, durante 20-30 minutos. Pode-se corar com Giemsa 5% por 5 a 10 minutos.

9- Lavar em água corrente e secar ao ar.

2.4 - Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs ou RONS).

As NORs são regiões dos cromossomos envolvidas na transcrição de RNA ribossômico, e conforme a sua função nas células, elas podem ser detectadas pela técnica de tratamento com nitrato de prata, que mostra essas regiões manchadas de preto em alguns cromossomos. Características das NORs têm sido usadas para propor hipóteses sobre tendências evolutivas dos cariótipos (Almeida-Toledo, 1998).

A caracterização das regiões organizadoras foi feita seguindo a técnica descrita por Howell & Black (1980), com algumas modificações:

1- Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica para cromossomos mitóticos, uma gota de solução aquosa de gelatina 2% (acrescida de ácido fórmico diluído na relação de 1 mL/100 mL de solução de gelatina).

2- Adicionar sobre a gota de gelatina duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata 50%. Cobrir com lamínula.

3- Incubar em estufa a 70°C, por um período de 3 a 8 min, monitorando a coloração da lâmina e dos cromossomos, ao microscópio.

4- Quando as NORs e os nucléolos assumirem uma coloração preta ou marrom e os cromossomos um tom amarelado, lavar bem em água deionizada com o auxílio de uma pisseta, possibilitando que a lamínula seja retirada pelo jato d'água.

5- Corar com solução de Giemsa, (1% em tampão fosfato, pH 6,8) durante 1 min. Lavar em água destilada e secar ao ar.

2.5- Detecção de Coloração Sequencial com Fluocromos DA/DAPI/CMA₃).

Os fluorocromos são corantes que ao serem excitados por uma fonte de luz bastante energética, fluorescem emitindo luz dependendo do comprimento de onda absorvido.

Para realizar a observação foi utilizado um microscópio de fluorescência, composto de fonte luminosa, lentes de aumento adequadas e jogos de filtro capazes de filtrar a luz de determinados comprimentos de onda.

Uma grande variedade de fluorocromos vem sendo utilizada na coloração de cromossomos em estudos citogenéticos, produzindo um padrão característico de bandas fluorescentes, conforme a especificidade do fluorocromo. Duas categorias são conhecidas de acordo com a afinidade por seqüências de DNA: aqueles que são específicos para AT, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), Quinacrina, Hoechst 33258 e os específicos para GC, Cromomicina A3, Mitramicina, Actinomicina.

Para a caracterização dos fluorocromos foi utilizado o protocolo proposto por Carvalho *et al.*, (2005):

Para a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, as lâminas foram envelhecidas por três dias, coradas com 10 µL de CMA 0,5 mg/mL por 30 min e em seguida corada com 10 µL de DAPI 2 µg/mL por 60 min (Carvalho *et al.* 2005, com modificações). As lâminas foram montadas em tampão glicerol-McIlvaine pH 7,0 (1:1) e novamente envelhecidas por três dias antes da análise no microscópio de fluorescência Leica DMLB. A captura de imagens foi feita com uma câmera de vídeo Cohu CCD e *software* Leica QFISH. As imagens foram posteriormente editadas no Adobe Photoshop versão 7.0.

3 – Análise do Material.

Para uma segura análise a respeito da montagem dos cariótipos das oito localidades onde os espécimes de traíra (*H.malabaricus*) foram coletados, obtive uma média de 15 metáfases por lâmina analisada por indivíduo. Essas metáfases foram analisadas em um microscópio Olympus CX41 e fotografadas em um microscópio OlympusTM BX60 com uma objetiva de 100x, ligado à uma câmera CCD (Optronics, modelo DEI-470). As imagens foram capturadas em alta definição, o que permitiu a realização de medidas relativamente precisas dos cromossomos, com o auxílio do programa Image-Pro® Plus, versão 3.1 (Media Cybernetics, 1998). Porém o trabalho final das imagens foi realizado em outro programa Adobe® Photoshop, versão 7.0.1 (Adobe Systems, 1996).

Os cromossomos foram identificados em função entre os braços (AR), dividindo-se o tamanho do braço maior pelo tamanho do braço menor, seguindo a regra criada por Levan *et al.* (1964) onde os cromossomos são classificados em metacêntricos (M, AR = 1,00 – 1,69), submetacêntrico (SM, AR = 1.70 – 2.99), subtelocêntrico (ST, AR = 3,00 – 6,99) e telocêntrico (T, AR > 7,00). Cada cromossomo do complemento cariotípico, bem como os braços dos cromossomos dessa espécie de peixe destas oito localidades teve seu tamanho medido tanto de modo absoluto como de modo relativo. A medida absoluta foi à média dos tamanhos de cada cromossomo nas quinze metáfases analisadas por lâmina de modo a evitar problemas relacionados a diferentes graus de condensação de cada cromossomo. Já a medida relativa foi realizada

comparando o tamanho de cada cromossomo com o tamanho do cromossomo maior do complemento e seu valor também foi resultado de uma média das quinze metáfases analisada por lâmina. No momento que as relações entre os tamanhos dos cromossomos foram definidas, o cariótipo foi montado seguindo a proposta de Levan *et al.*, (1964), em função da razão dos braços, em ordem decrescente.

Com os padrões observados com os bandamentos C, NOR, e os tratamentos com fluorocromos, foram construídos os cariótipos para as localidades onde os espécimes de traíra (*H. malabaricus*) foram coletados para o estudo do presente trabalho, facilitando a comparação entre os cariótipos dessa espécie.

Todos os espécimes logo após o processamento citogenético foram fixados em formol 10% e transferidos para álcool 70%. Todos os indivíduos foram depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

CAPÍTULO 2

Variação Cariotípica em Populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) em Lagos do Sudeste do Brasil

INTRODUÇÃO

A região neotropical é reconhecida como a mais rica do mundo em termos de espécies de peixes de água doce (Schaefer, 1998). Os mecanismos responsáveis por essa diversidade e sua ação temporal são, porém, basicamente desconhecidos. A análise do padrão de distribuição biogeográfica destas espécies pode beneficiar-se de dados da história geomorfológica de diferentes regiões. Por apresentarem limitações fisiológicas e morfológicas que impedem sua sobrevivência fora do ambiente aquático, os peixes são animais especialmente informativos para investigar o passado geológico e modificações ambientais, especialmente os de água doce (Myers, 1938). Por este motivo, análises biogeográficas destes organismos fornecem uma ligação natural entre evolução geológica e a biótica, uma vez que a dispersão de peixes depende de conexões entre cabeceiras ou drenagens adjacentes (ex: Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003).

No Brasil, poucas regiões possuem o seu registro geológico bem documentado, o que dificulta a interpretação temporal dos padrões biológicos observados. Neste sentido, a bacia do médio rio Doce representa uma condição especial, já que inclui um sistema lacustre que é caracterizado como uma relíquia do Pleistoceno Superior (Meis & Moura, 1984). Petri & Fúlfaro (1984) indicam a evolução geomorfológica da bacia do médio rio Doce como um paradigma de evolução quaternária no Brasil, com datação indicada para dois ciclos; um primeiro ciclo pleistocênico entre 10.000 a 14.000 anos (Meis & Monteiro, 1979) e um segundo ciclo holocênico datado entre 7.800 (+/-250) e 3.365 (+/-155) (Tundisi & Meis, 1985). Esta região é composta por aproximadamente 150 lagoas que variam em tamanho e que apresentam uma

ampla gama de ambientes e de graus de eutrofização natural (Espíndola *et al.*, 2003).

A perspectiva temporal representa uma fonte promissora para estudos de caráter evolutivo, onde cada lagoa pode ser considerada como unidade experimental de fenômenos biológicos incluindo frequências alélicas e taxas de substituições moleculares (ex: Dergam *et al.*, 2002), assim como padrões que dependem de aspectos demográficos, como a fixação de rearranjos cromossômicos. Por outro lado, o sistema lacustre também representa um laboratório do processo de degradação da biodiversidade, como resultado da presença de espécies introduzidas (Sunaga & Verani, 1983; Godinho, 1994; Alves & Vieira, 1996; Vono & Barbosa, 2001; Latini, 2004; 2005). A fauna de peixes das lagoas reúne cerca de um terço da riqueza de peixes da bacia do rio Doce (Godinho & Vieira, 1998). Em três lagos do rio Doce, a presença de tucunarés (*Cichla monoculus*) e de piranhas (*Pygocentrus nattereri*) resultou na redução de metade das espécies de peixes nativos (Godinho *et al.*, 1994). Em 2005, estas espécies introduzidas ocorriam em 90% das lagoas do Parque Estadual do Rio Doce (Latini, 2005). Apesar dessa degradação biótica, a singularidade geológica e ambiental dessa região qualifica este sistema lacustre com a categoria máxima (categoria especial) para conservação no bioma Mata Atlântica (MMA/SBF 2000).

A espécie *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra, pertence à família Erythrinidae e está presente em praticamente todas as bacias do Brasil (Oyakawa, 2003). Sob o ponto de vista citogenético, essa espécie possui sete citótipos diferenciáveis e cada um deles com características cromossômicas exclusivas, refletindo a fixação de diversas mudanças cromossômicas e genéticas. Este alto grau de diversificação sugere que este táxon nominal é constituído por várias unidades biológicas independentes, requerendo uma re-análise de sua situação taxonômica (Bertollo *et al.*, 2000). Na bacia do rio Doce, dois citótipos com número diploide $2n=42$ já foram encontrados. O primeiro denominado citótipo A, sem cromossomos sexuais diferenciados e fórmula cromossômica (11 pares metacêntricos, 10 submetacêntricos) e o citótipo B (12 pares metacêntricos, 8 submetacêntricos e 1 par subteloentríco nas fêmeas e um subteloentríco e um sumetacêntrico nos machos) indicando a presença de cromossomos

sexuais do tipo XX/XY, foram caracterizados em simpatria e sintopia na lagoa Carioca (Ferreira *et al.*, 1989; Born & Bertollo, 2006). Nos dois estudos, o citótipo A foi encontrado em baixa frequência (1/22) (Ferreira *et al.*, 1989) e (1/22) (Born & Bertollo, 2006). O citótipo B também ocorre nas lagoas Ferrugem, Amarela, Azul e Dos Patos (Born, 2000). A traíra aparentemente é a única espécie indígena que não está ameaçada pela presença de espécies invasoras neste sistema lacustre e por esse motivo, estudos comparativos entre as diferentes populações podem incluir todas as lagoas do sistema. Os objetivos deste trabalho foram: determinar a ocorrência de simpatria dos citótipos A e B em sete lagoas, além da Lagoa Carioca, comparar as diferentes populações das oito lagoas sob o ponto de vista citogenético, verificar a ocorrência de polimorfismos e/ou variações interpopulacionais e caracterizar o nível de diferenciação cariotípica ocorrido no intervalo temporal do Pleistoceno ao atual.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 66 espécimes (31 machos e 35 fêmeas) provenientes de oito lagoas do médio rio Doce (Figura 2 e Tabela 3). Os espécimes foram condicionados em sacos plásticos com água e oxigênio sendo transportados ao laboratório, onde foram mantidos vivos em aquário até o seu processamento.

Tabela 3. Pontos de Coleta na região do médio rio Doce.

Localidade	Coordenadas GPS	Tamanho amostral (machos/fêmeas)
Marola	19° 19' 05, 33157" S 42° 25' 05, 07202" O	2 machos e 2 fêmeas
Lingüiça	19° 33' 26, 11000" S 42° 29' 47, 49000" O	2 machos e 2 fêmeas
Cristal	19° 36' 57, 11000" S 42° 28' 06, 69000" O	5 machos e 3 fêmeas
Juiz de Fora	19° 41' 49, 49310" S 42° 29' 08, 29559" O	2 machos e 3 fêmeas
Curi	19° 42' 11, 64000" S 42° 27' 44, 61000" O	3 machos e 8 fêmeas
Hortência	19° 42' 14, 55080" S 42° 26' 04, 09600" O	2 machos e 5 fêmeas
Tiririca	19° 45' 02, 92000" S 42° 27' 15, 30000" O	5 machos e 6 fêmeas
Carioca	19° 45' 32, 44840" S 42° 37' 15, 54440" O	10 machos e 6 fêmeas

A divisão celular foi estimulada “*in vivo*” com duas aplicações de Munolan® na razão de um comprimido diluído em 0,5 ml de água na proporção de 100 g de peso do animal. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior, segundo Bertollo *et al.* (1978). Para o estudo da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de Sumner (1972), com modificações (resultados satisfatórios foram obtidos com exposição da lâmina ao bário 42° durante um minuto). A detecção de NORs foi feita conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980). A dupla coloração com os fluorocromos base específicos CMA₃ (rico em GC) e DAPI (rico em AT) foi realizada segundo Carvalho *et al.* (2005). As metáfases foram analisadas em um microscópio Olympus CX41 e fotografadas em um microscópio Olympus™ BX60 com uma objetiva de 100x, ligado à uma câmera CCD (Optronics,

modelo DEI-470). As medidas cromossômicas foram obtidas com o auxílio do programa Image-Pro Plus, versão 3.1 (Media Cybernetics, 1998). As medidas cromossômicas foram feitas conforme Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntrico (M, AR = 1,00 – 1,69), submetacêntrico (SM, AR = 1.70 – 2.99), subtelocêntrico (ST, AR = 3,00 – 6,99) e telocêntrico (T, AR > 7,00). Foi utilizado os programas NTSYS (Rohlf, 1989) e o GENES (Cruz, 2007), o primeiro para construção de um fenograma, obtido pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) e o segundo para realização do teste de Mantel, para verificar a relação entre o índice de dissimilaridade e a distância geográfica. Os idiogramas foram construídos com Easydio® versão 1.0 (disponível em www.keithley.com).

Todos os espécimes logo após o processamento citogenético foram fixados em formol 10% e transferidos para álcool 70%. Todos os indivíduos foram depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

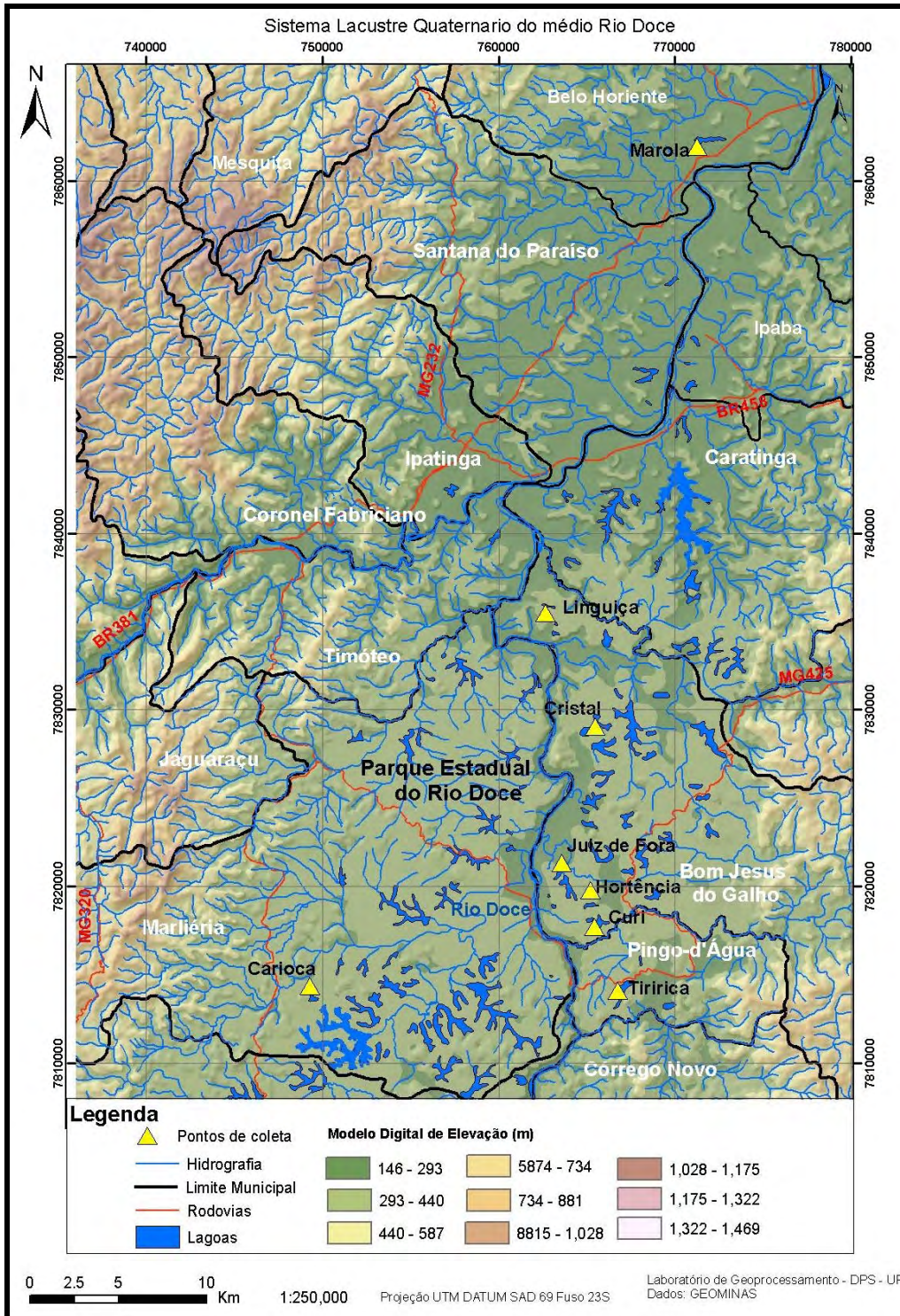


Figura 2. Mapa parcial do sistema lacustre do médio rio Doce.

RESULTADOS

Todas as populações analisadas de *Hoplias malabaricus* apresentaram $2n=42$ cromossomos em ambos os gêneros, com cromossomos sexuais XX/XY, correspondendo ao citótipo B, conforme definido por Ferreira *et al.* (1989) e Born e Bertollo (2000). O cariótipo é constituído por 12 pares de cromossomos metacêntricos, 8 pares submetacêntricos um par subtlocêntrico em fêmeas, enquanto os machos apresentam um cromossomo subtlocêntrico e outro submetacêntrico de menor tamanho, com número fundamental de $NF=84$ (Figuras 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A e 10A).

Os números de sítios evidenciados pelo nitrato de prata (NORs) mostraram-se extremamente variáveis, localizados preferencialmente na região telomérica em alguns pares cromossômicos e variando em número de 2 a 7 no mesmo indivíduo. As marcações biteloméricas variando de um a dois pares por metáfase dentro do mesmo indivíduo. As NORs biteloméricas apareceram em todos os machos, associadas ou não a NORs teloméricas. Por outro lado, algumas fêmeas não apresentaram NORs biteloméricas. Marcações de NORs nos cromossomos sexuais ocorreram em menor frequência (Tabela 4 e Figuras 11 e 12).

Todos os cromossomos apresentaram blocos heterocromáticos na região centromérica ou pericentromérica e alguns cromossomos também apresentaram blocos na região telomérica (Figuras: 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B e 10B), conforme observado em outras populações do grupo. Entretanto, foi observada uma diferença constante entre os blocos heterocromáticos dos cromossomos X nas fêmeas. Diferenças conspícuas foram também observadas entre as amostras das lagoas, envolvendo a ocorrência dos blocos biteloméricos entre os pares cromossômicos, o tamanho dos blocos centroméricos e a ocorrência de blocos heterocromáticos teloméricos nos braços superiores e inferiores de alguns cromossomos (Tabela 5). Este padrão de variação foi codificado (Anexo1) e representado num fenograma (Figura 13) e apresentado também em forma de idiograma (Figuras 16 e 17). O padrão geral de variação sugere que existe uma relação entre a distância entre as lagoas e a similaridade cromossômica, com a lagoa Marola sendo a mais

divergente (Figura 14). A implementação pelo teste de Mantel indicou uma possível correlação entre o índice de dissimilaridade e a distância geográfica ($r = 0,6163$; $p < 0,05$) (Figura 15).

Os resultados obtidos com fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI nas lagoas Carioca (fêmea), Juiz de Fora (fêmea), Lingüiça (macho), Marola (fêmea) Tiririca (macho) e Curi (fêmea), evidenciaram marcações bem conspícuas em várias regiões cromossômicas, com número máximo de oito marcações fluorescentes por metáfase (Figuras 18 e 19). O CMA₃ evidenciou forte marcação do cromossomo X em machos das lagoas Tiririca (Figura: 18F) e Lingüiça (Figura 18I). A marcação com CMA₃ foi menos intensa e restrita a apenas um dos cromossomos X das fêmeas das lagoas Juiz de Fora, Carioca e Curi (Figuras 19C, 19F e 19I). Entretanto, esta marcação não foi evidenciada nas fêmeas da lagoa Marola (Figuras 18A e 18C). Algumas regiões ricas em GC aparentemente associadas à condição de NORs biteloméricas foram também evidenciadas, embora com baixo nível de fluorescência. Em todos os casos, as regiões ricas em GC apresentaram-se com baixo nível de fluorescência de DAPI (Figuras 18B, 18E, 18H e 19B, 19E e 19H). Alguns cromossomos submetacêntricos que não são portadores de NORs também apresentaram marcações bem conspícuas nas regiões pericentromérica ou telomérica (Figuras 18A, 18D, 18G e 189, 19D, 19G).

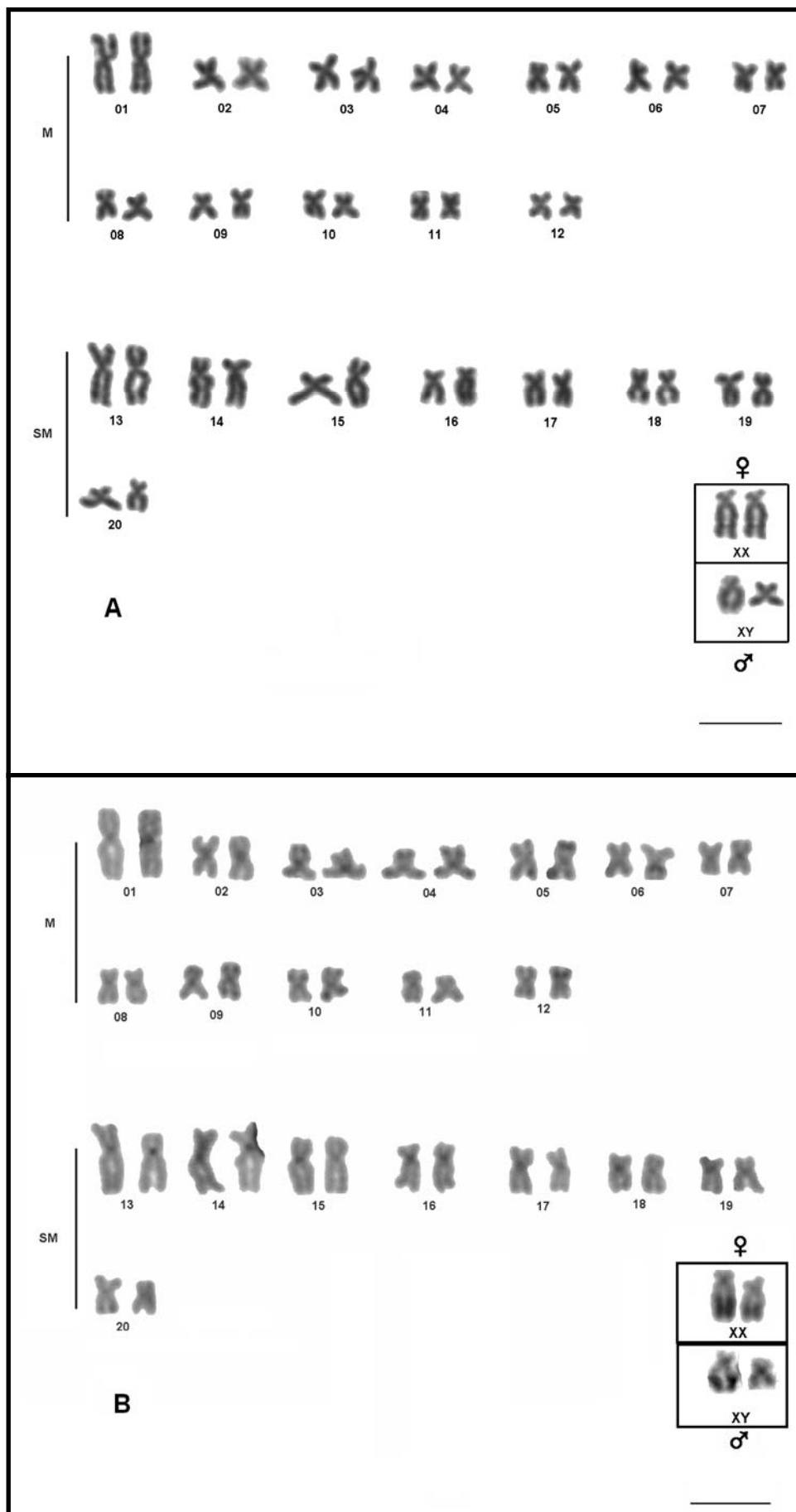


Figura 3. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Carioca. Giemsa (A) e Bandamento C (B). A barra corresponde a 10 μ m.

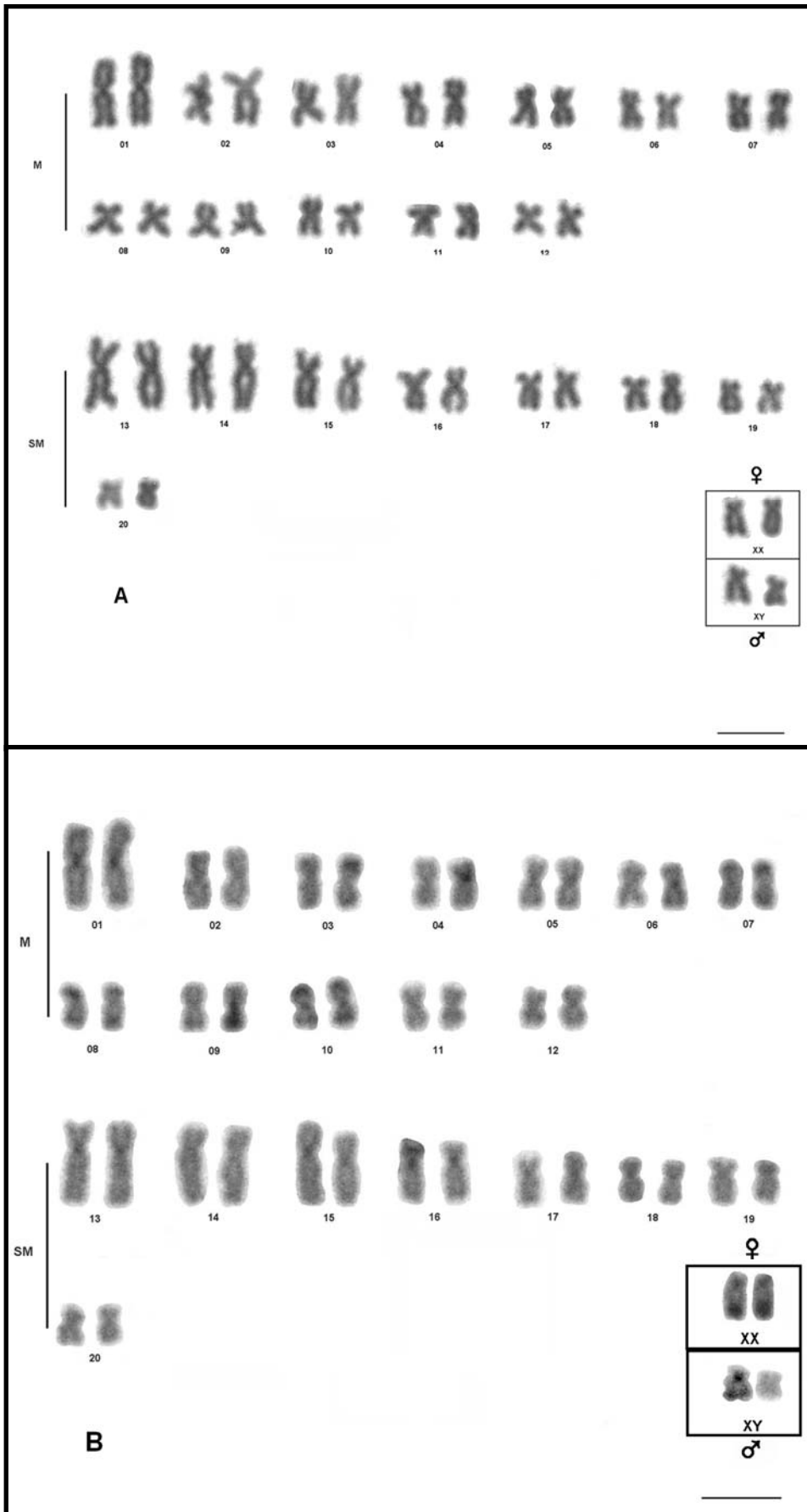


Figura 4. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Cristal. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 µm.

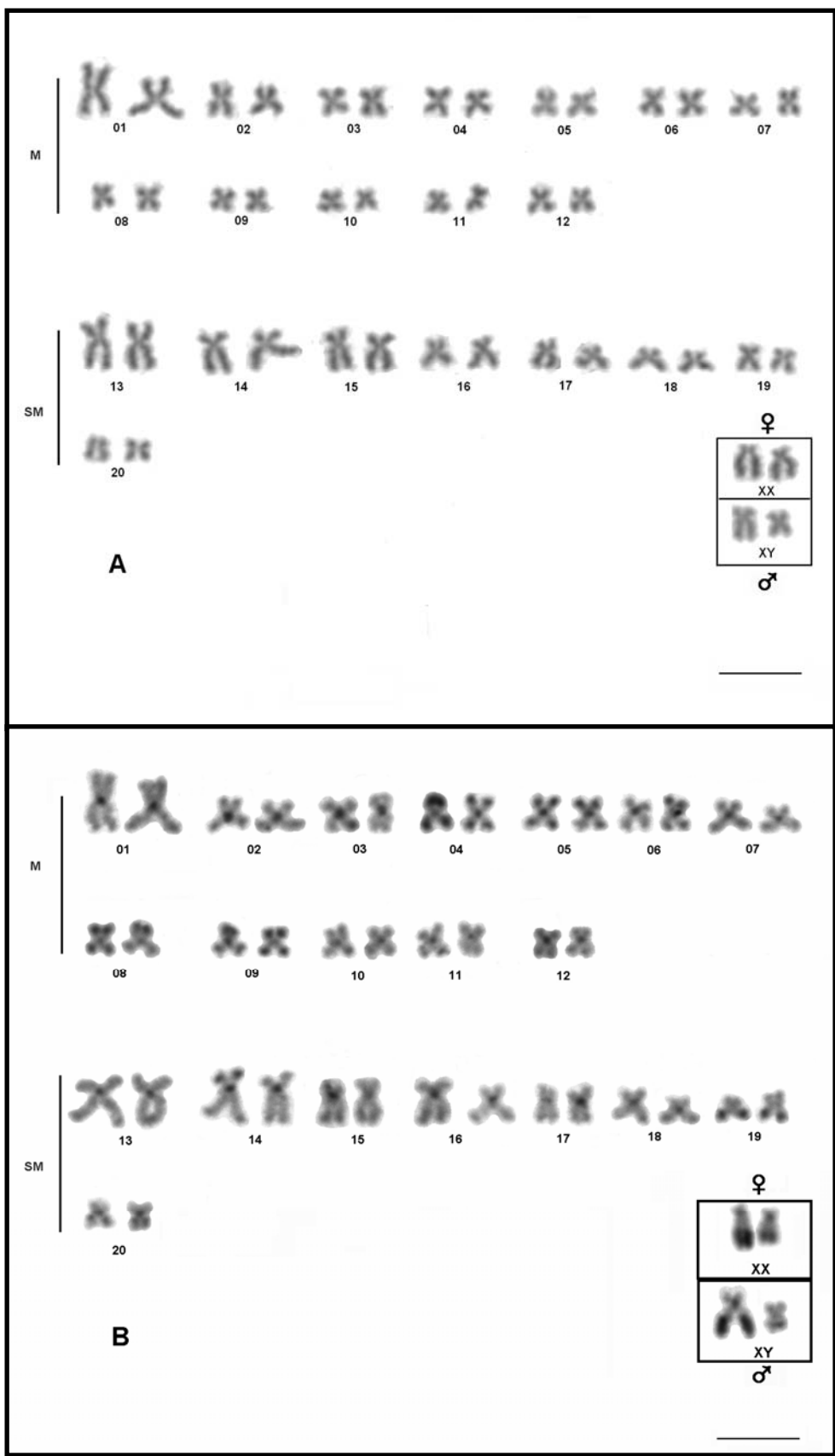


Figura 5. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Curi. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 μ m.

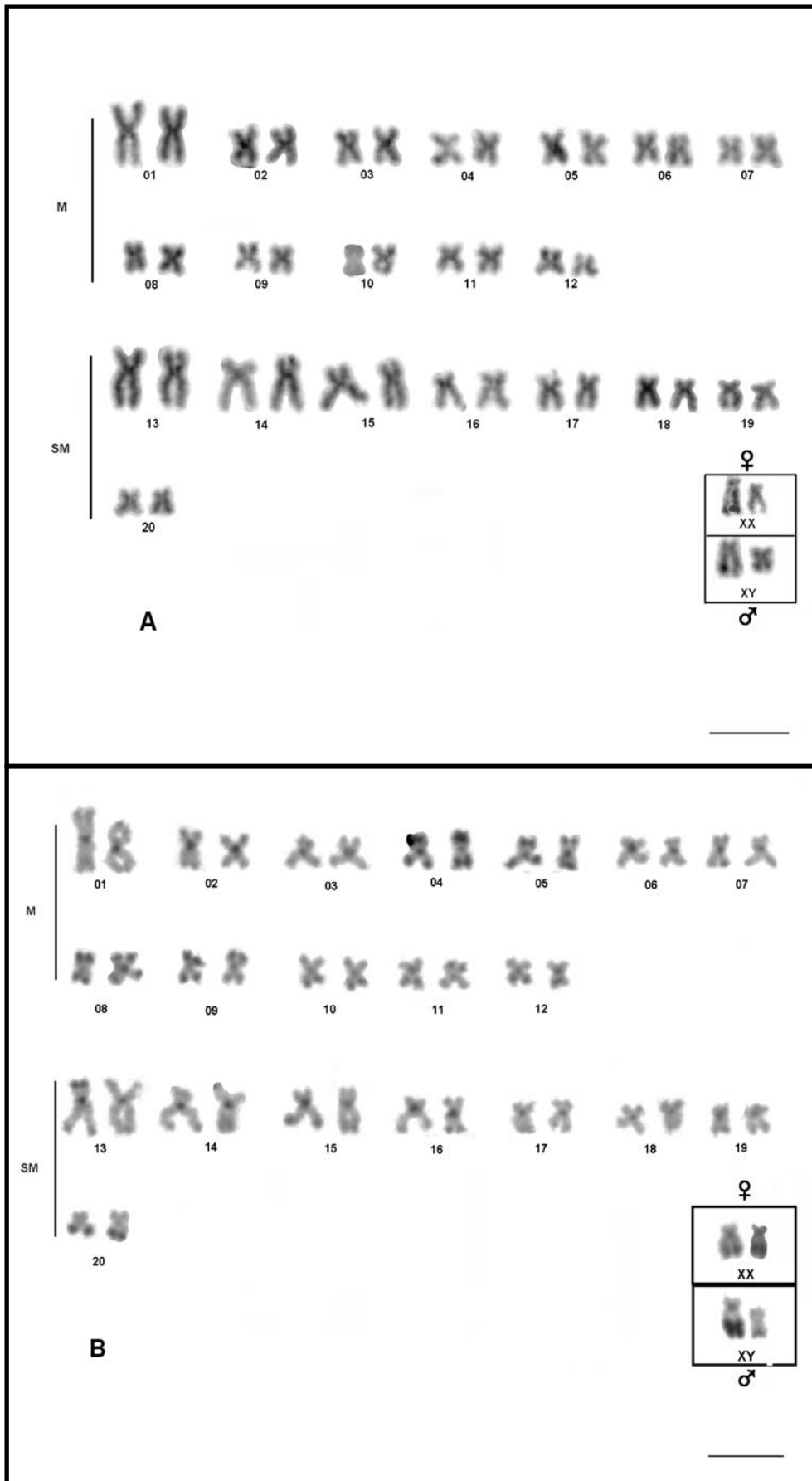


Figura 6. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Hortência. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 μm.

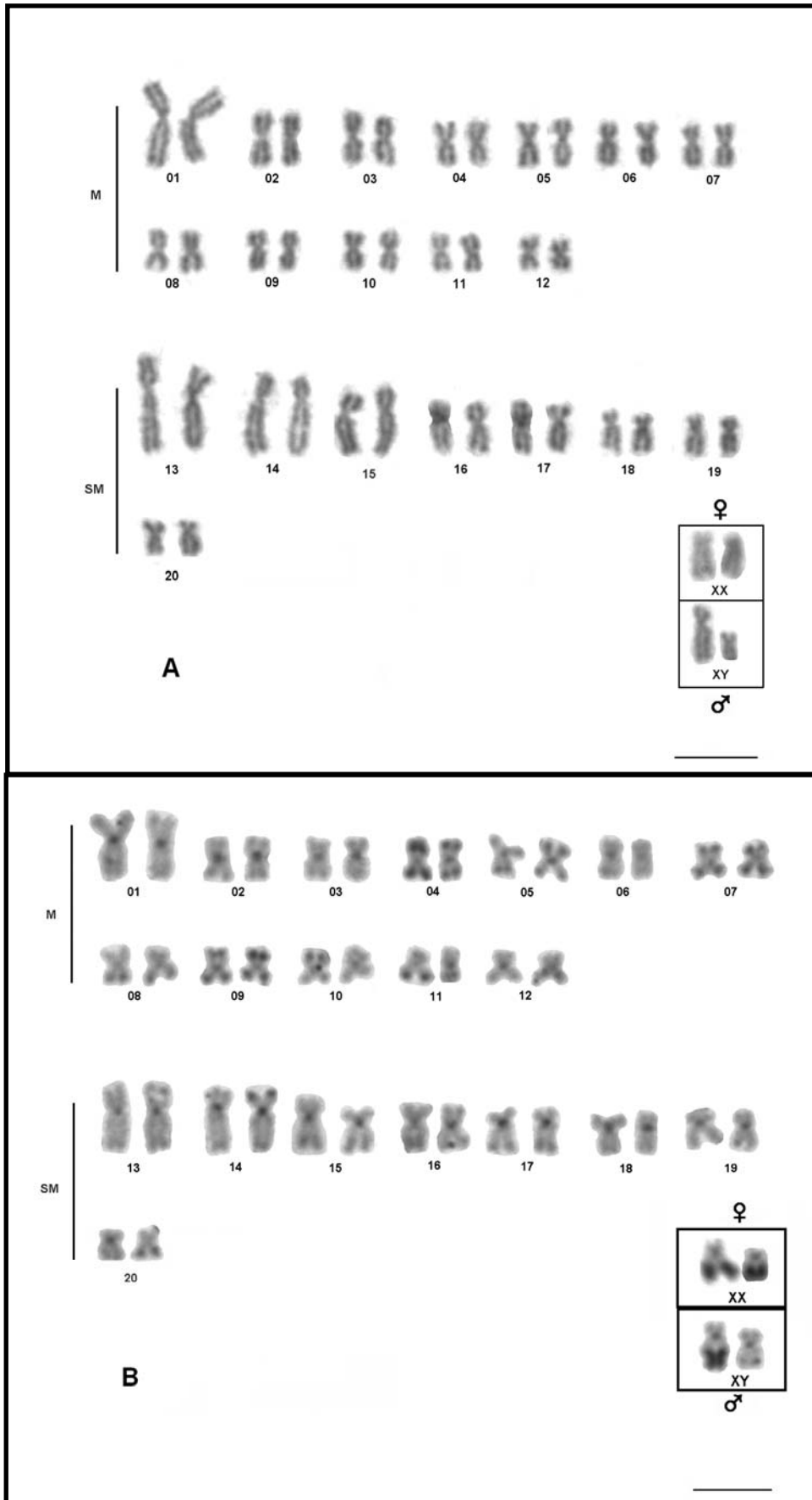


Figura 7. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Juiz de Fora. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 µm.

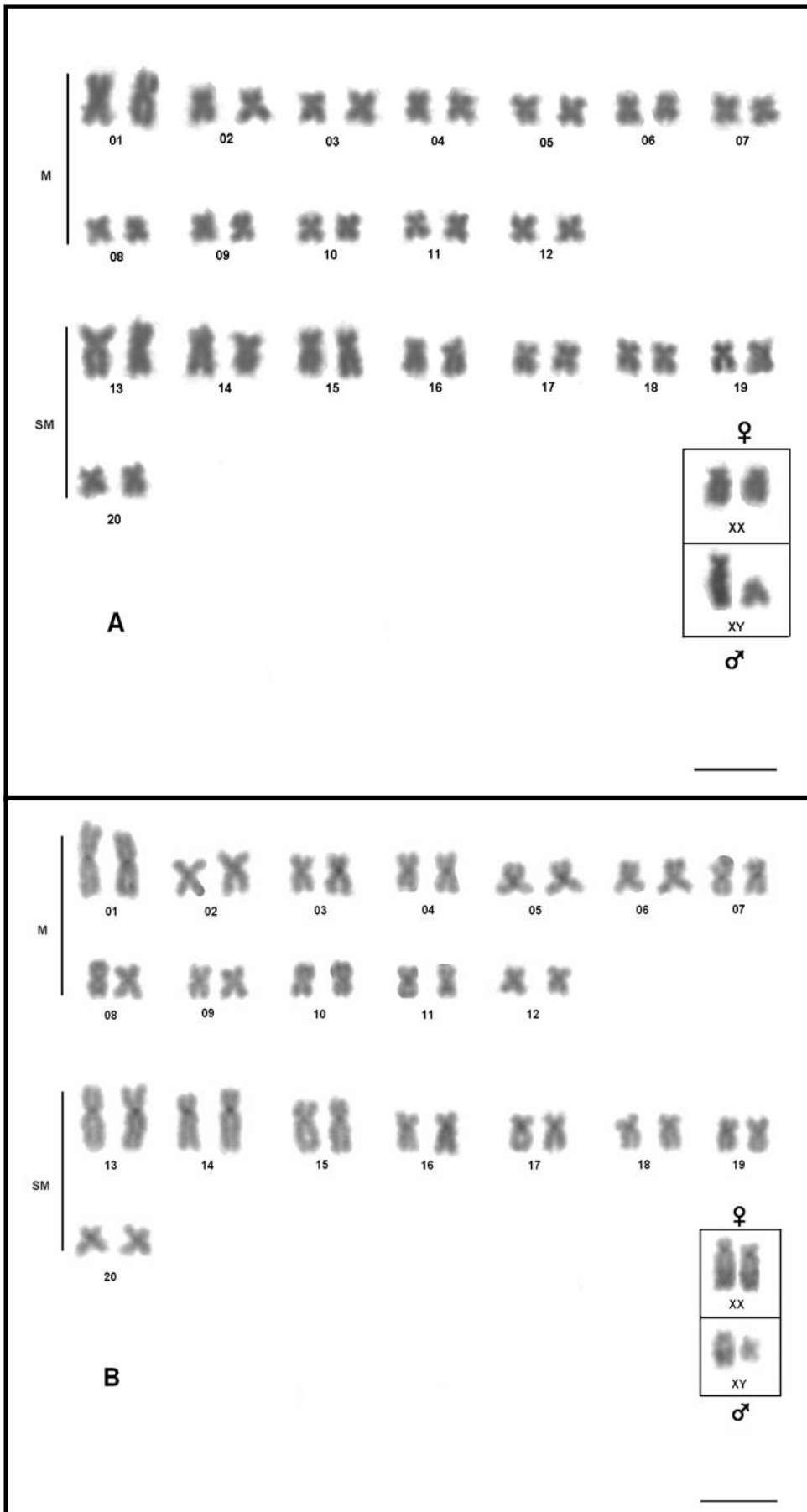


Figura 8. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Lingüiça Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 µm.

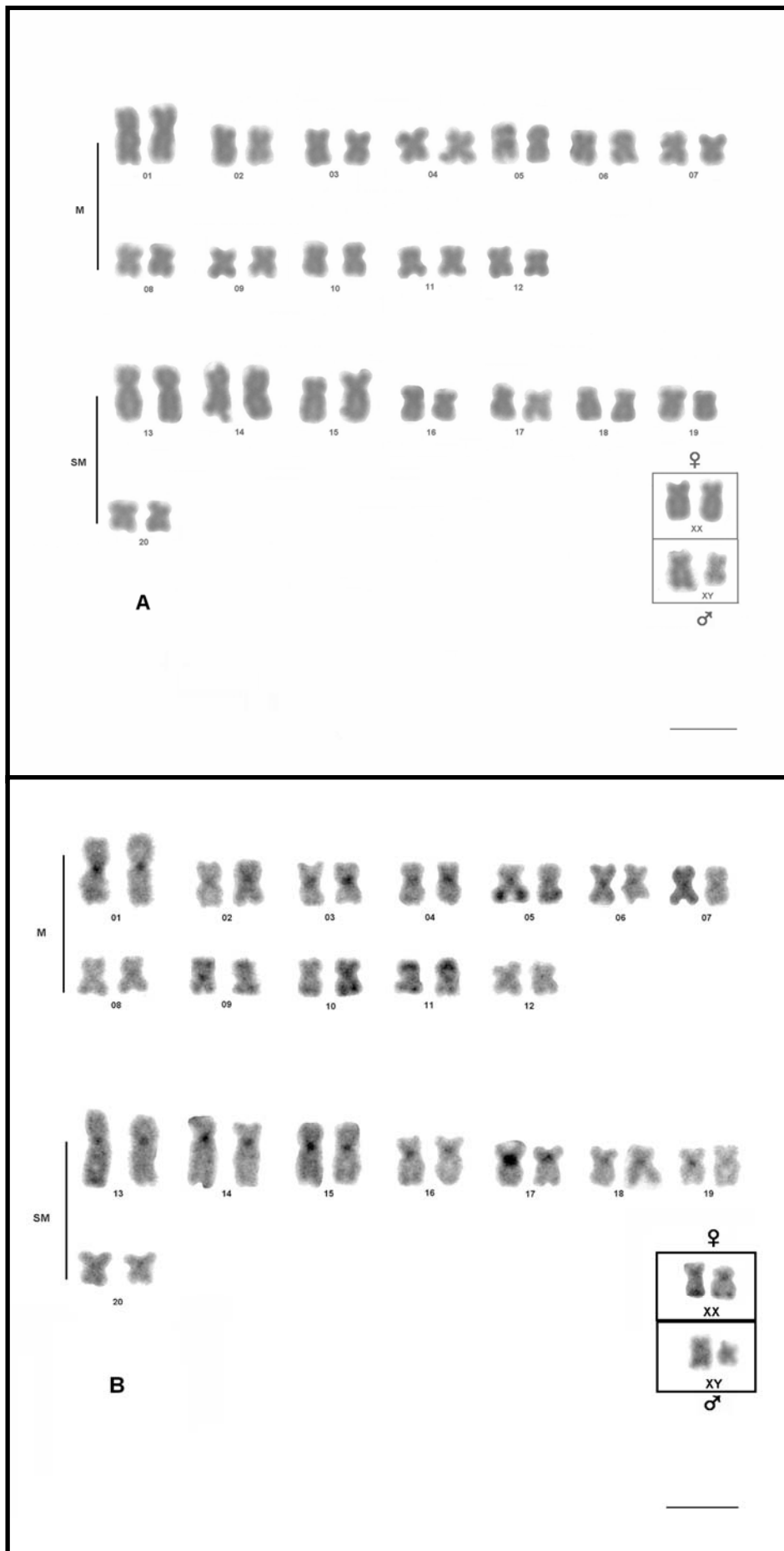


Figura 9. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Marola. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 μm.

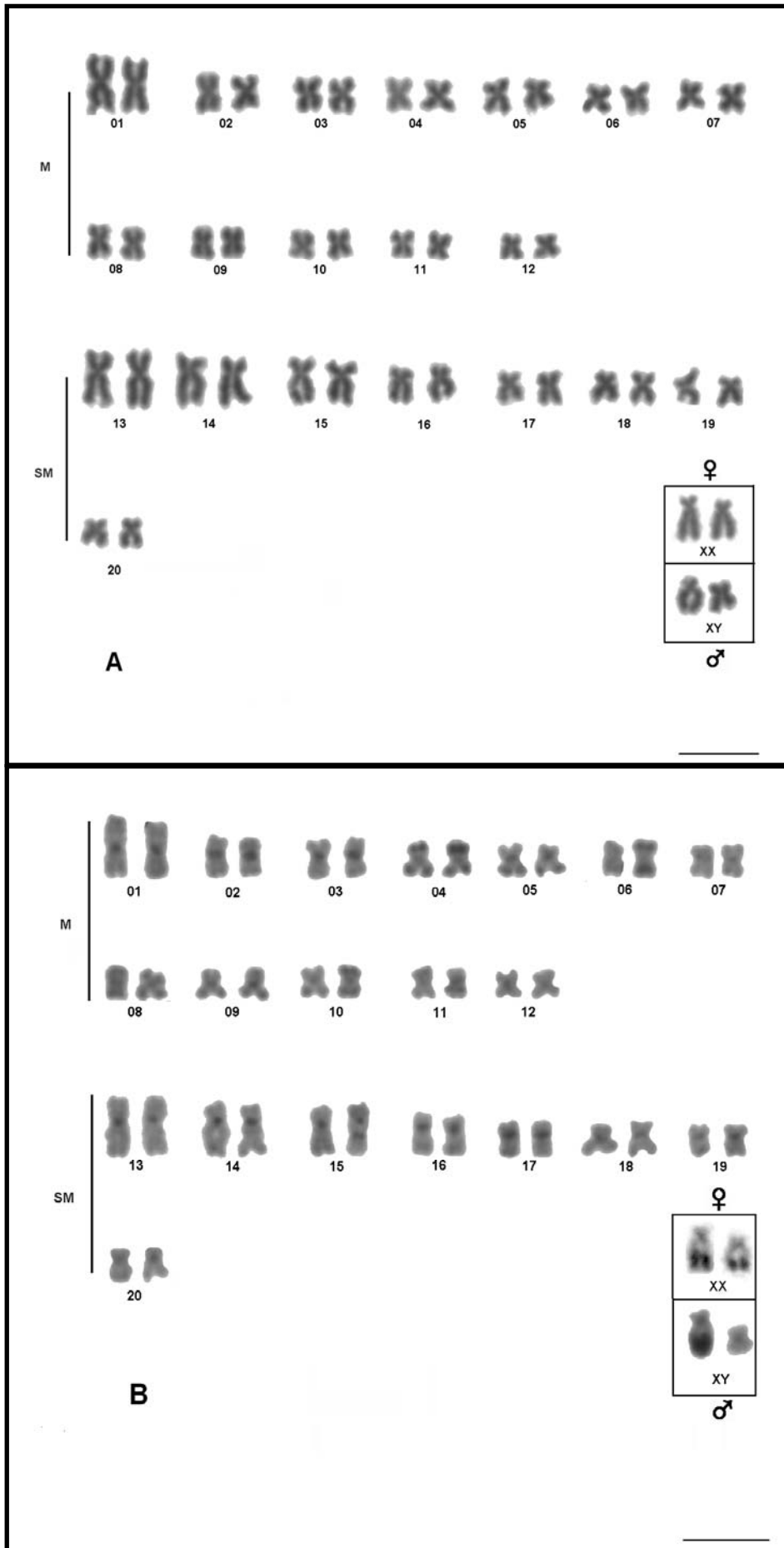


Figura 10. Cariótipos de *Hoplias malabaricus* da população da lagoa Tiririca. Giemsa (A) e bandamento C (B). A barra corresponde a 10 μ m.

Tabela 4. Padrão de variação de NORs nas lagoas. + presença e - ausência

Lagoas	Nº de cromossomos portadores de NORs (moda)	Biteloméricas	Cromossomos sexuais	Nº de metáfases
Carioca	2-5 (4)	+	-	11
Cristal	3-7(5)	+	+	10
Curi	1-4(2)	+	-	11
Hortência	2-6 (4)	+	+	13
Juiz de Fora	1-4 (4)	+	+	15
Lingüiça	4-7(5)	+	-	9
Marola	1-5(4)	+	-	9
Tiririca	1-4 (4)	+	+	15

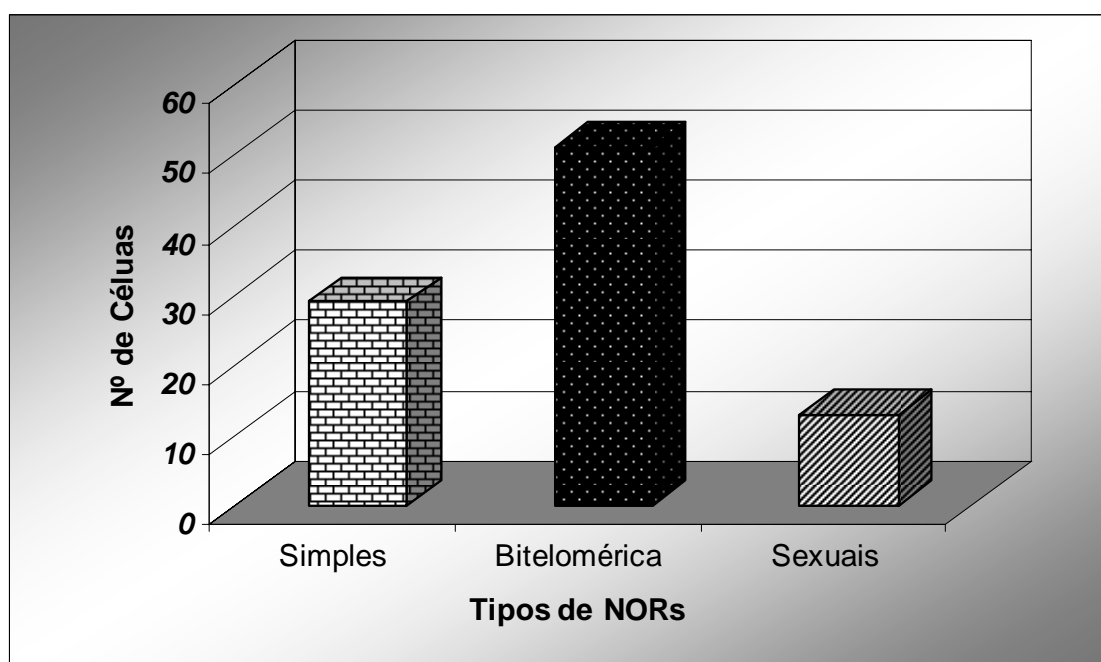


Figura 11. Ocorrência dos tipos de Nors nas populações de *H. malabaricus* do médio rio Doce.

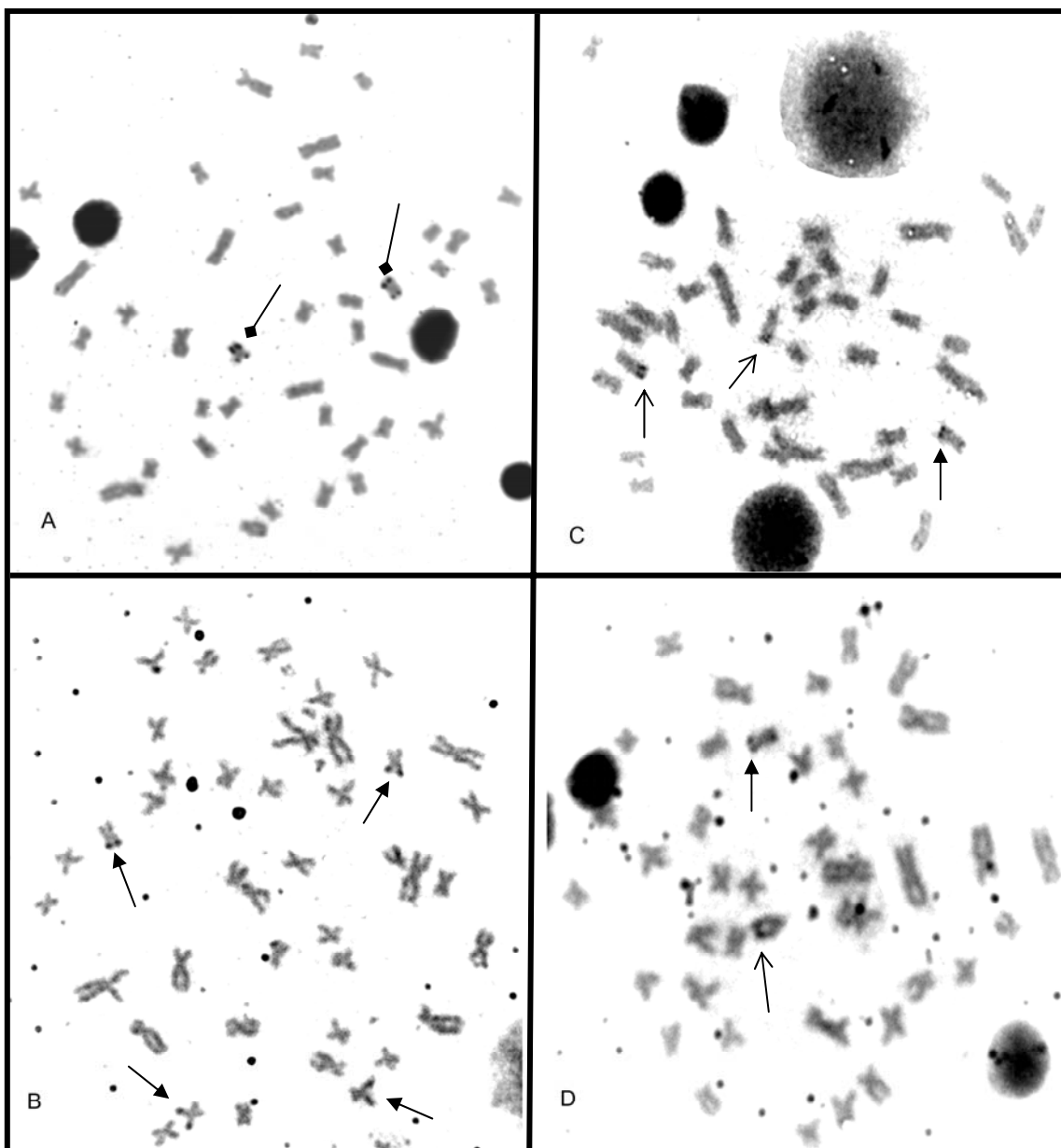


Figura 12. Diferentes padrões de NORs obtidos por impregnação de nitrato de prata nas populações de *Hoplias malabaricus* das lagoas do médio rio Doce. As setas indicam o tipo de marcação: (Marcação simples →), (Marcação Bitelomérica →♦), (Marcação no sexual →).

Tabela 5. Padrões de distribuição de heterocromatina entre populações de *H. malabaricus* das lagoas do médio rio Doce. Os números indicam os pares portadores dos blocos de heterocromatina.

<i>Lagoas</i>	<i>Grandes blocos controméricos</i>	<i>Marcações nos telômeros braço curto</i>	<i>Marcações nos telômeros braço longo</i>	<i>Marcações biteloméricas</i>	<i>Tamanho dos blocos heterocromáticos no cromossomo X</i>
Carioca	2	-	20	4, 5, 9,10, 12	grande
Cristal	-	-	20	6, 7, 8, 9,10	grande
Curi	-	14	19, 20	4, 5, 8, 9, 10,11	grande
Hortência	2	-	15, 19, 20	4, 5, 8, 9, 10, 11, 12	grande
Juiz de Fora	-	14	15,17, 20	4, 5, 7, 8, 9, 11	grande
Lingüiça	-	-	-	6, 9, 10, 11	grande
Marola	1, 2, 3, 4, 14, 17	-	5, 20	8, 9, 10, 11	pequeno
Tiririca	2, 3, 16, 17	-	17, 19, 20	4, 6, 8, 9, 10	grande

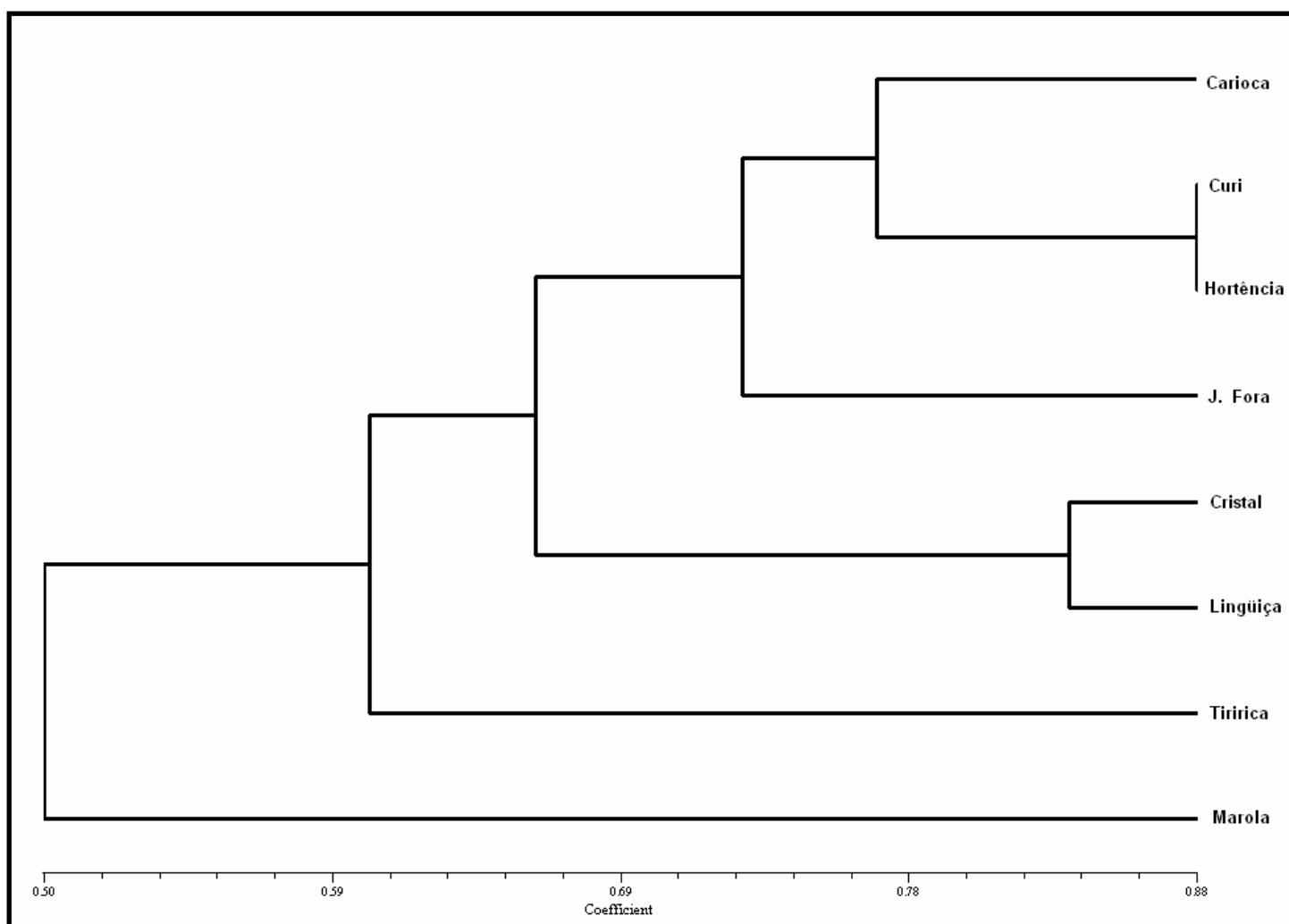


Figura 13. Fenograma de similaridade entre as populações de *Hoplias malabaricus* nas lagoas estudadas pelos padrões de banda C e marcação com CMA₃ positivo no cromossomo sexual.

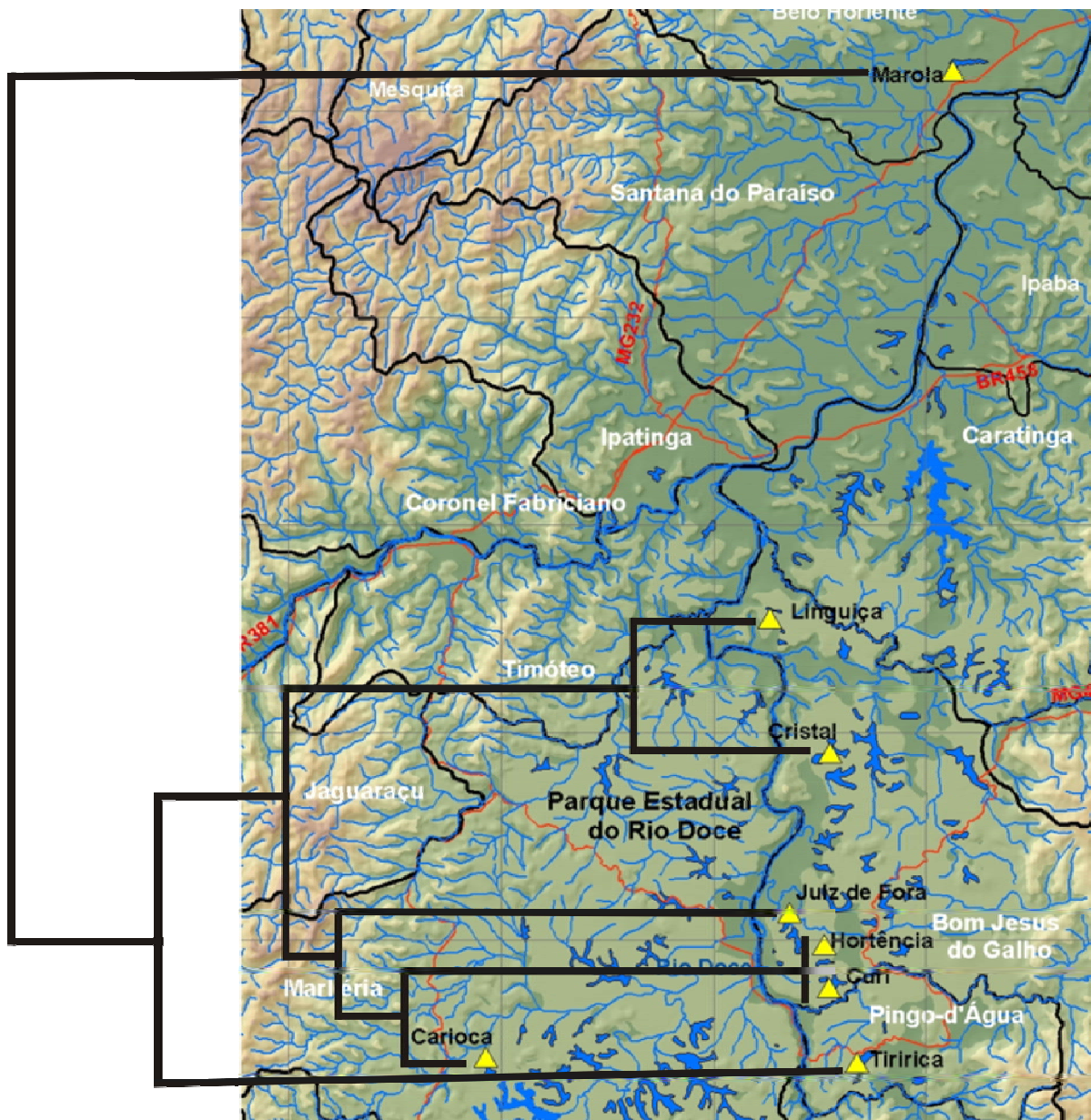


Figura 14. Fenograma da Figura 13 sobreposto ao mapa da região estudada.

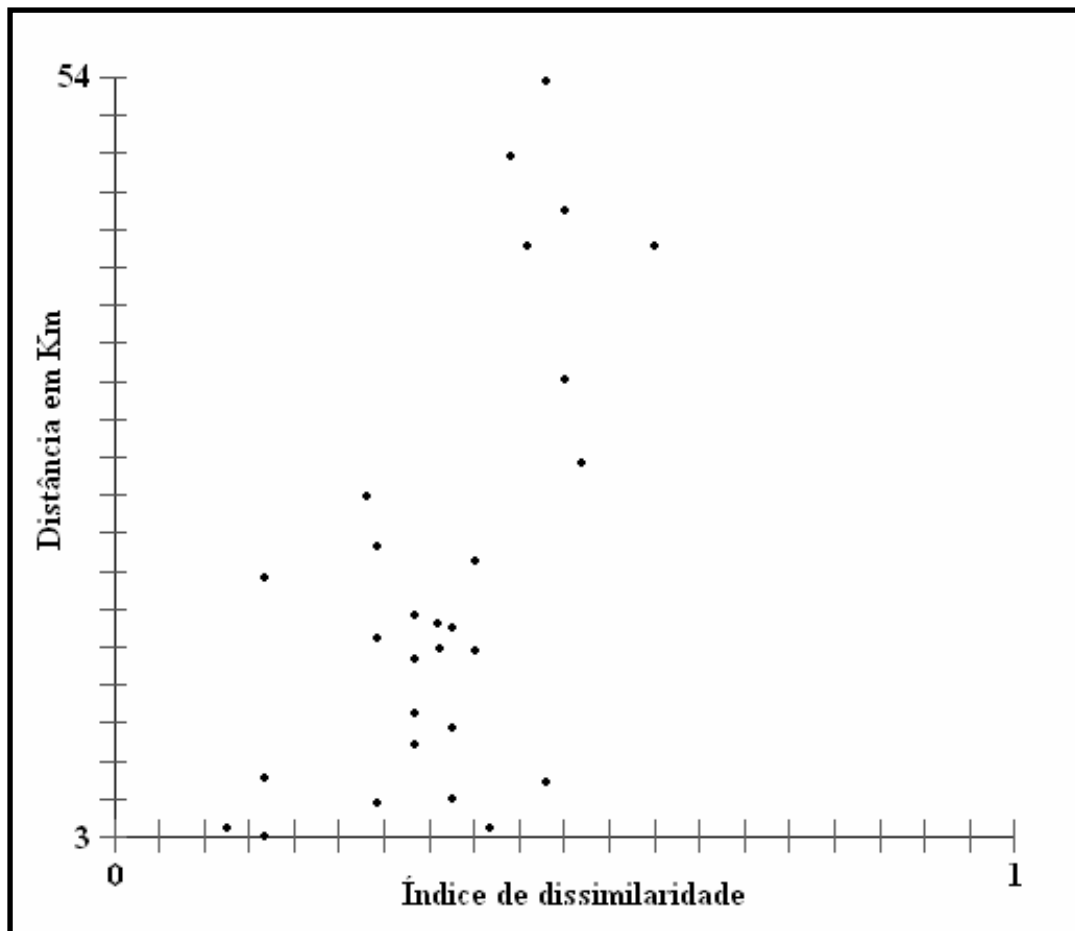


Figura 15. Gráfico evidenciando a relação entre a distância geográfica em Km entre as lagoas estudadas do médio rio Doce e o índice de dissimilaridade ($p < 0,05$).

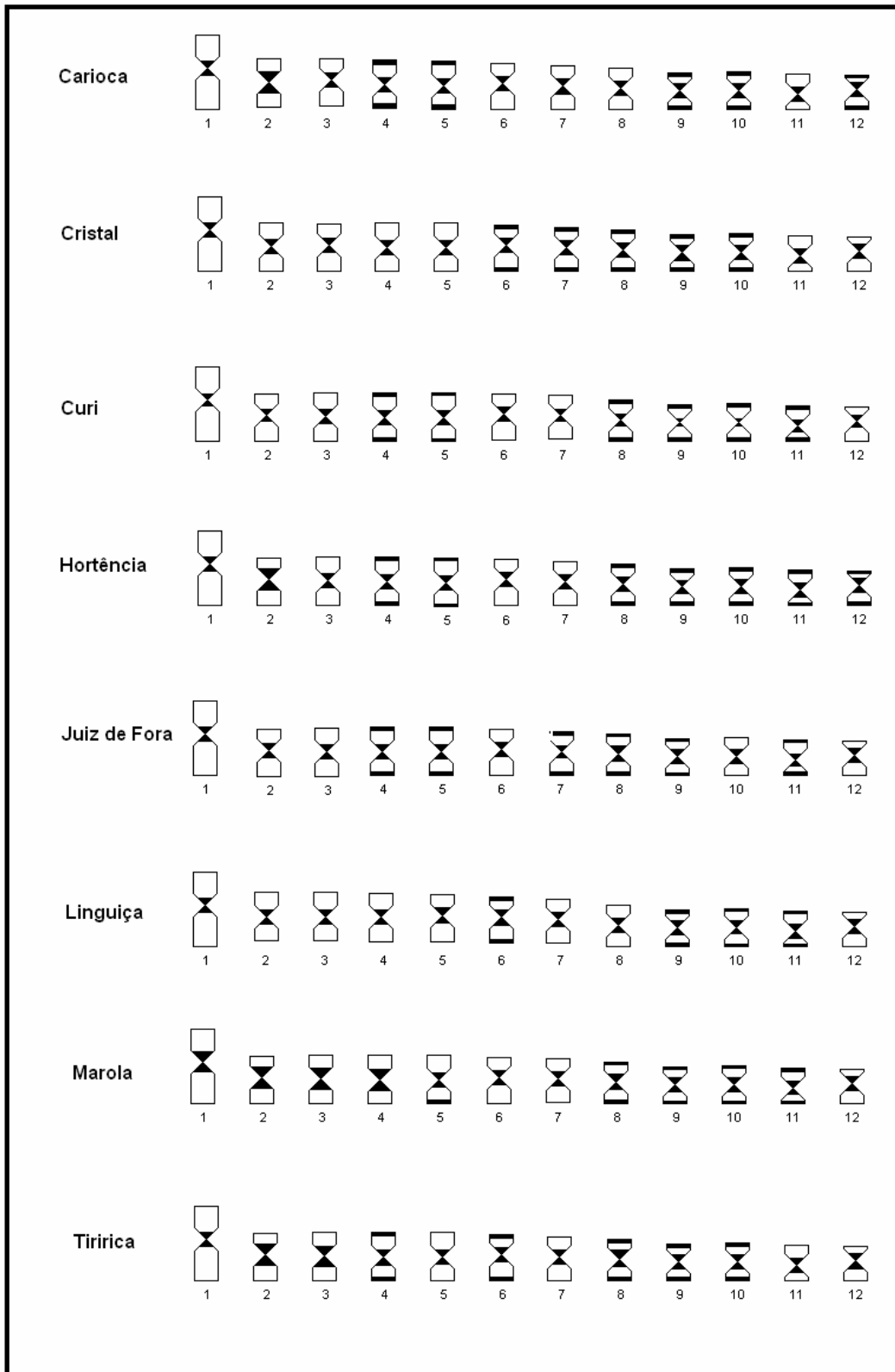


Figura 16. Idiograma dos cromossomos metacêntricos das populações de *Hoplias malabaricus* das oito lagoas estudadas, evidenciando a distribuição dos blocos de heterocromatina (coloração preta).

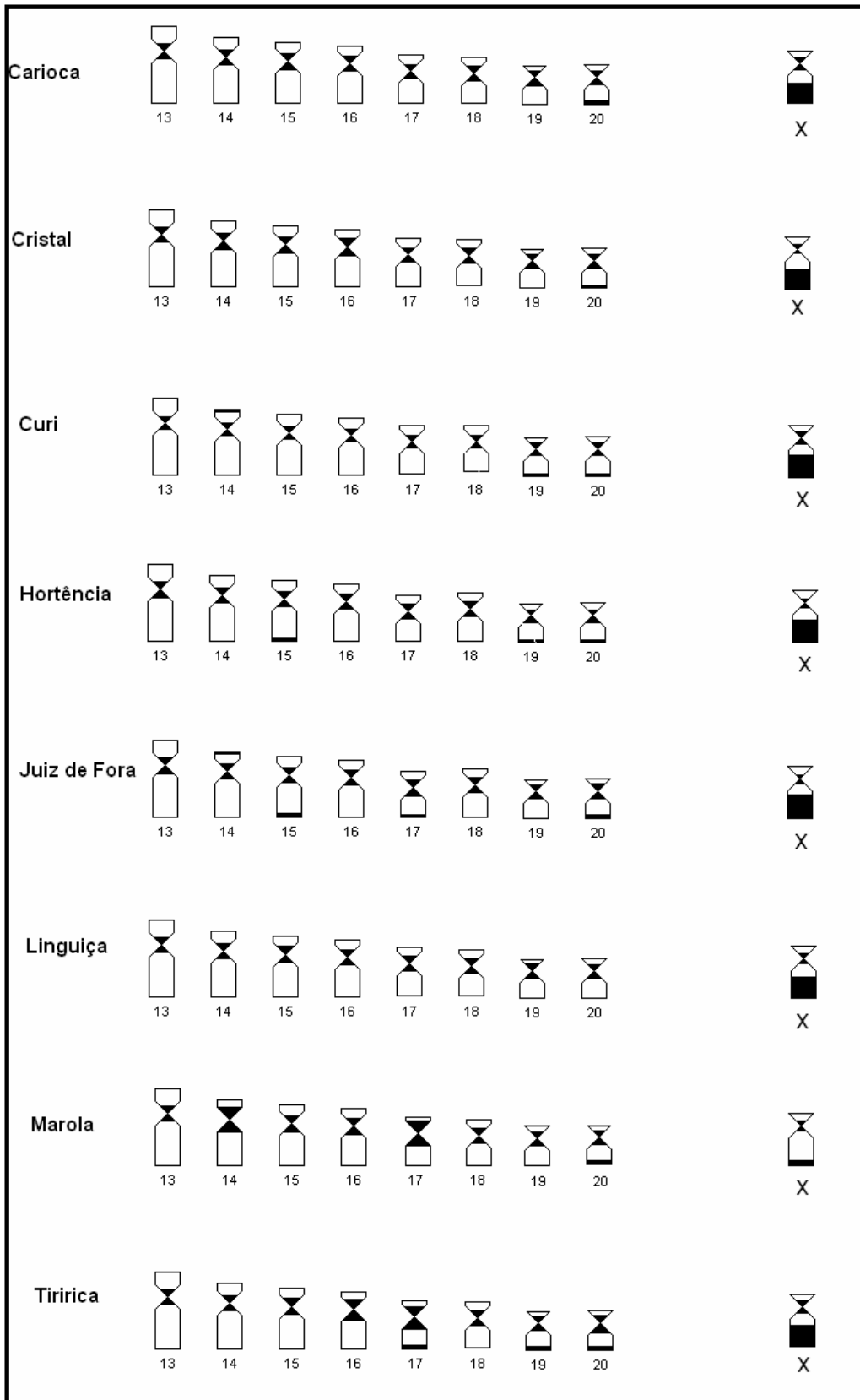


Figura 17. Idiograma dos cromossomos submetacêntricos e dos cromossomos sexuais das populações de *Hoplias malabaricus* das oito lagoas estudadas, evidenciando a distribuição dos blocos de heterocromatina (coloração preta).

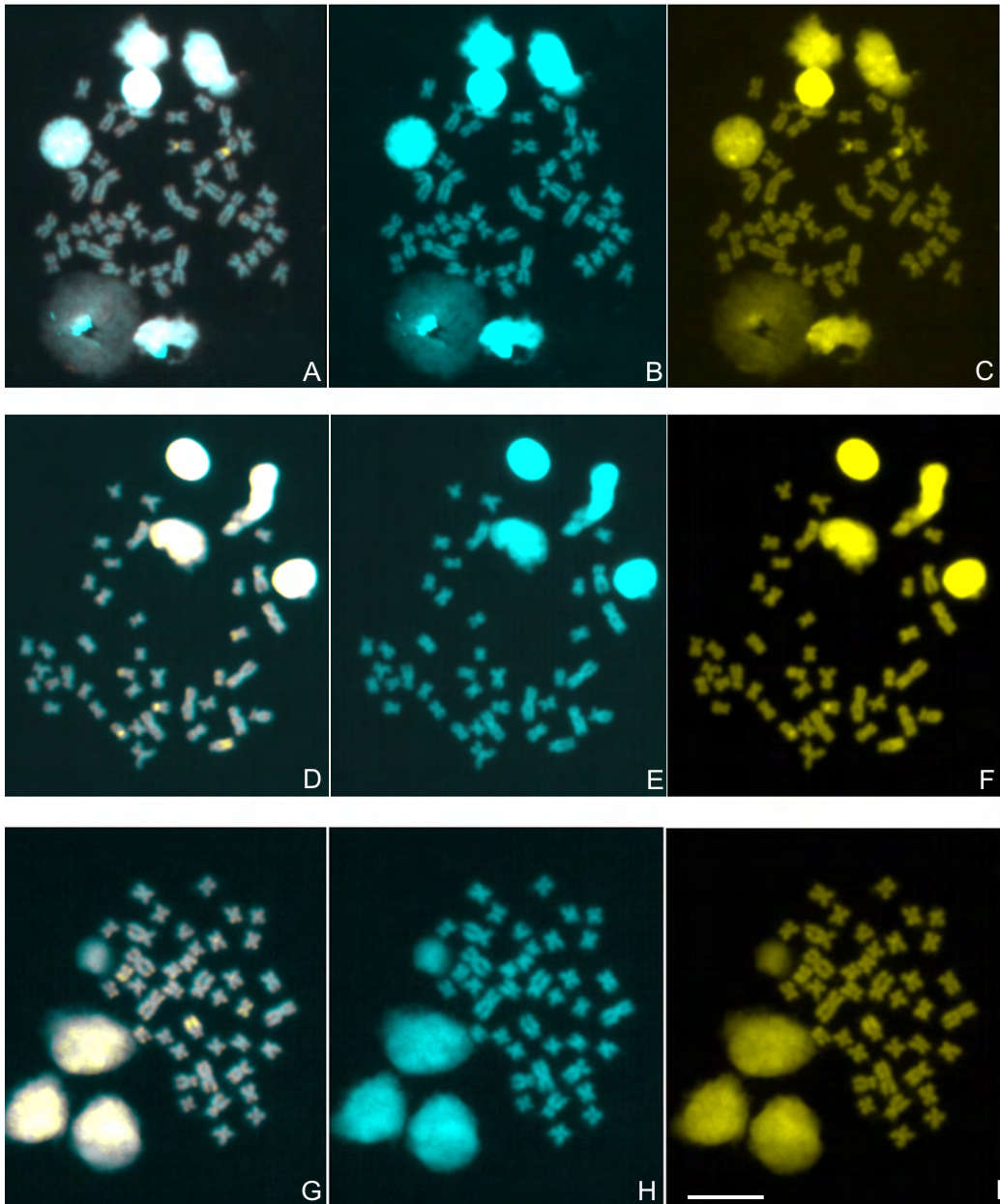


Figura 18. Metáfases mitóticas de *Hoplias malabaricus* das lagoas Marola (fêmea A, B e C), Tiririca (macho D, E, F) e Lingüiça (macho G, H, I) após coloração com Cromomicina (CMA₃) evidenciando bandas fluorescentes positivas (C, G, I), DAPI marcas negativas (B, E, H) e sobreposições CMA₃ /DAPI (A, D, G). A barra corresponde a 10 μ m.

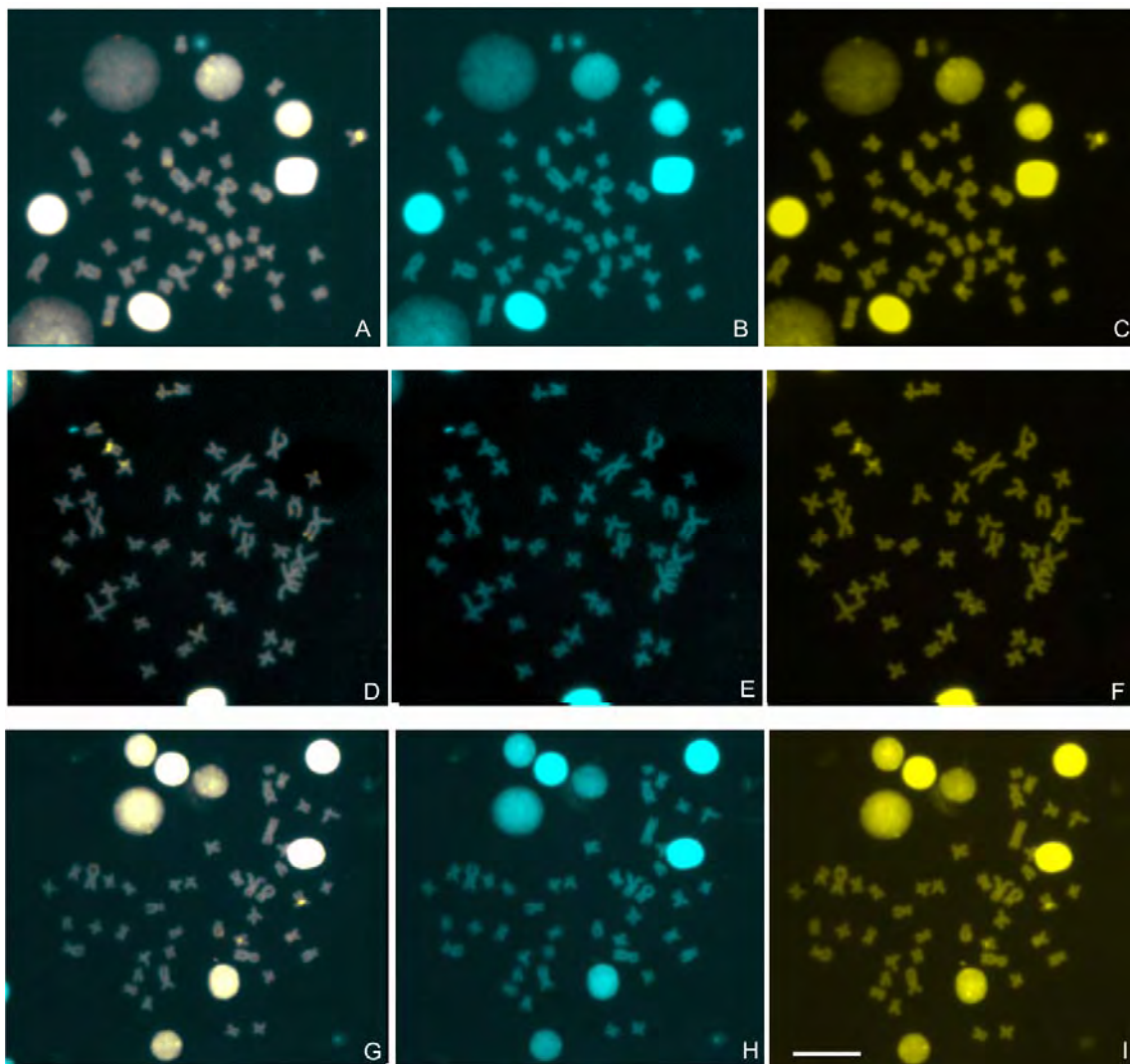


Figura 19. Metáfases mitóticas de *Hoplias malabaricus* das lagoas Juiz de Fora (fêmea A, B e C), Curi (macho D, E, F) e Carioca (macho G, H, I) após coloração com Cromomicina (CMA₃) evidenciando bandas fluorescentes positivas (C, F, I), DAPI marcas negativas (B, E, H) e sobreposições CMA₃/DAPI (A, D, G). A barra corresponde a 10 μm.

DISCUSSÃO

A predominância do citótipo B é consistente com o indicado inicialmente para as lagoas Carioca, Ferrugem, Amarela, Azul e Dos Patos (Bertollo *et al.* 1978; Ferreira *et al.*, 1989; Born & Bertollo, 2000). Ferreira *et al.*, (1989) propuseram que este citótipo derivou do citótipo A, via uma inversão pericêntrica que originaria os cromossomos sexuais do tipo XX/XY envolvendo também a modificação de um par submetacêntrico em subtelocêntrico. A natureza polimórfica do cromossomo X, descrita por Born (2000) é um caráter diagnóstico que diferencia os citótipos A e B. Embora Born & Bertollo (2000) consideraram o citótipo B como restrito ao sistema lacustre do Parque Estadual do Rio Doce (PERD), estes resultados demonstram que ele predomina em outras lagoas do sistema, assim como nas cabeceiras do rio Piranga (Dergam, obs. pess.), o principal afluente da bacia do rio Doce. O citótipo A é de ampla distribuição e ocorre na maioria das bacias do sudeste do Brasil (Bertollo *et al.*, 2000). O citótipo A não foi encontrado em nenhuma das lagoas estudadas, mas é possível que ainda ocorra em baixa frequência, já que o tamanho amostral não permitiu descartar essa possibilidade.

Embora o citótipo B apresentou-se estável em termos de coloração convencional com Giemsa, ocorreram grandes diferenças interpopulacionais relativas aos padrões de NORs, bandamento C e fluorocromos CMA₃ e DAPI. A condição de NORs múltiplas teloméricas é característica de *H. malabaricus* (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2000; Vicari *et al.*, 2003 e 2006) e também caracteriza a família Erythrinidae (Bertollo, 1996). A presença de marcações biteloméricas por impregnação pela prata foi bem evidente nas oito lagoas estudadas, indicando que este estado de caráter é próprio das traíras com citótipo 2n=42, como comprovado também por outros estudos (Born & Bertollo, 2000; 2006; Lemos *et al.*, 2002 e Vicari *et al.*, 2003; 2006). Porém, sua ocorrência em todos os machos e em algumas fêmeas parece caracterizar as populações do médio rio Doce. Geralmente em cromossomos de peixes, as marcações evidenciadas pela prata mostram estreita relação com as regiões ricas em GC como é o caso da cromomicina CMA₃ (Galetti & Rasch, 1993; Mestriner *et al.*, 1995). Entretanto, nas populações estudadas, os sítios

biteloméricos caracterizaram-se por apresentar baixa fluorescência. MANDRIOLI et al. (2001) identificaram sítios positivos à impregnação com prata, mas que se mostravam negativos em coloração com fluorocromo CMA₃ em *Gobius niger* (Gobiidae). A presença e a origem das NORs biteloméricas é uma questão pouco elucidada na citogenética de peixes, aparecendo em espécies não aparentadas, como no ciprinodontídeo *Poecilia latipunctata* (Galetti Jr & Rasch, 1993). Vale ressaltar que os padrões de variações quanto ao número de NORs tanto intraindividuais como intrapopulacionais são normalmente visualizadas em populações de *H. malabaricus*, e tais diferenças são normalmente atribuídas a mecanismos de regulação transcricional (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2000). A regulação transcricional também explicaria a constante diferença de tamanho observada entre os cromossomos X.

Born & Bertollo (2000), realizando estudos com sondas específicas para localização de rDNA 18S nas populações de *Hoplias malabaricus* do Parque Estadual do rio Doce, confirmaram marcações em até 10 cromossomos do cariótipo, incluindo o cromossomo X subtelocêntrico. Vicari et al. (2003) discutem que a presença dos cístrons ribossomais 18S associados à heterocromatina, em uma região rica em GC, evidencia uma provável homeologia entre o cromossomo X do citótipo B e o 16º par cromossômico do citótipo A, o qual teria um possível papel para o DNA repetitivo desse segmento na diferenciação desses cromossomos sexuais, no que se refere à evolução do sistema XX/XY do citótipo B. A técnica de impregnação por prata demonstrou uma NOR situada em posição distal ou subterminal no braço longo e adjacente a um bloco heterocromático no cromossomo X, conforme indicado anteriormente por Born & Bertollo (2000). As variações populacionais de heterocromatina constitutiva são consistentes com o indicado por Born & Bertollo (2000), os quais mostram variações no tamanho da NOR e/ou no segmento heterocromático rico em GC. Os resultados deste trabalho indicam, porém, que esta variação pode caracterizar populações de algumas lagoas, como no caso da redução do bloco heterocromático da lagoa Marola. O amplo grau de variação heterocromática, observado nas populações do sistema lacustre, pode representar um importante grau de diferenciação genética.

Vários estudos destacam a importância e o papel da heterocromatina. Irick (1994), estudando a distribuição de heterocromatina em *Drosophila*, propôs que esta seria responsável pela segregação dos cromossomos homólogos durante a meiose. Outros autores também sugerem que a heterocromatina teria um papel na arquitetura nuclear (Denburg *et al.*, 1996) e também na expressão gênica pelo efeito de posição (Pardue & Henning, 1990). Lewin (1994) sugere que a posição centromérica da heterocromatina estaria relacionada à função estrutural no cromossomo, uma vez que é nesta região que se encontram os cinetócoros que exercem um importante papel na segregação cromossômica durante os processos de meiose e mitose.

Entretanto, outros autores consideram que a variação na estrutura da heterocromatina teria um efeito negativo em determinados organismos. John (1988) considera que polimorfismos de heterocromatina geralmente estão relacionados à replicação múltipla, mudanças unilaterais na amplificação, acumulação e deleção. Este autor ainda ressalta que o papel e a presença dos blocos heterocromáticos inibem a formação de quiasmas, embora existam algumas exceções como o caso de *Allium* em que os quiasmas são formados adjacentes aos blocos de heterocromatina (Loidl, 1982). Segundo White (1973), em quase todas as populações naturais encontram-se casos de polimorfismo cromossômico. John & Lewis (1979), discutindo o polimorfismo de inversões em várias populações naturais de *Drosophila*, consideram que o polimorfismo, por si, é adaptativo, e estas alterações poderiam de alguma forma ajustar o indivíduo as diferentes condições impostas pelo ambiente, respondendo geneticamente as variações espaciais e temporais. A heterocromatina tem sido reconhecida como relevante na evolução cariotípica dos peixes, principalmente na identificação dos polimorfismos (Ojima & Ueda 1979), com uma composição altamente repetitiva, ela poderia facilitar alterações que determinariam os rearranjos cromossômicos, constituindo uma importante fonte de variação (Wichman *et al.*, 2001), interferindo no processo de recombinação, comprometendo igualmente a formação de quiasmas em regiões eucromáticas adjacentes (John & King 1985; John, 1988). Alguns casos de polimorfismos de heterocromatina já foram documentados na ictiofauna neotropical, com exemplos de variações intrapopulacionais em *Astyanax scabripinnis* (ex: Mantovani *et al.*, 2000) e variações interpopulacionais em *H.*

malabaricus dos rios Tibagi e Iguçu (Vicari *et al.*, 2003). Embora geralmente a heterocromatina esteja relacionada com os efeitos do pareamento cromossômico na meiose e com o crossing-over estes efeitos nem sempre são consistentes, e a idéia geral de como a heterocromatina controla essas funções ainda é pouco conhecida (Sumner, 2003).

O fenograma obtido a partir dos padrões de heterocromatina agrupou algumas lagoas próximas como as lagoas Curi e Hortência, Juiz de Fora e Cristal e por outro lado, separou a lagoa mais distante (Marola), sugerindo efeitos de isolamento por distância, aparentemente relacionados com baixos níveis de fluxo gênico entre as lagoas. O teste de Mantel também reforça esta hipótese.

Os fluorocromos CMA₃/DAPI também permitiram identificar algumas particularidades que não são evidentes com os bandamentos C e NORs como marcações teloméricas nos cromossomos submetacêntricos marcadas positivamente pela cromomicina e negativamente pelo DAPI. Essas regiões particulares coradas por esses fluorocromos parecem não corresponder aos locus de rDNA. Pendás *et al.* (1983) consideram que variações em tamanhos dos blocos heterocromáticos assim como das próprias NORs, podem ser devidos a mecanismos de crossing-over desigual ou trocas entre cromátides irmãs, envolvendo as seqüências repetidas dessas regiões. Entretanto, estes autores ainda consideram que nem sempre a cromomicina e a coloração pelo nitrato de prata são os melhores métodos para a localização do rDNA em espécies de peixes, onde uma grande soma da heterocromatina rica em bases GC é associada com as NORs. Desta forma, Gold *et al.* (1990) indicam que em salmonídeos não existe uma relação entre o sinal da cromomicina A₃ e a NOR, já que este fluorocromo também pode corar seletivamente a heterocromatina. Por outro lado, uma clara associação entre NORs e fluorocromos GC específicos tem sido demonstrada em outros casos (Pendás *et al.*, 1993 Galetti Jr 1998; Born & Bertollo, 2000 e 2006). Em alguns casos, as regiões organizadoras de nucléolos mostram-se adjacentes às bandas heterocromáticas (Artoni & Bertollo, 1999; Vicari *et al.*, 2003) enquanto que, em outros casos, parece ocorrer uma intercalação dessas duas regiões no cromossomo (Pendás *et al.*, 1993).

Com base na incerteza dos efeitos e funções da heterocromatina, consideramos que os polimorfismos cromossômicos obtidos com os padrões de banda C e de fluorescência nas populações de *H. malabaricus* do sistema lacustre do médio rio Doce devem ser considerados como variações interpopulacionais. Embora o processo de isolamento de 14.000 anos não envolva especiação, a diferença dos bandamentos sugere que a população de cada lagoa responde de maneira independente e ao acaso, através dos processos de acúmulo de heterocromatina, já sugerido pelo padrão de diferenciação molecular indicado por Dergam *et al.* (2002) para o mesmo sistema lacustre. Os resultados sugerem ainda que as lagoas devam ser consideradas como unidades de manejo e conservação, mesmo para uma espécie que aparentemente não é afetada pelas espécies introduzidas.

Por outro lado, o sistema de lagos do médio rio Doce aparentemente tem permitido a especiação de um caracídeo, *Oligosarcus solitarius*, o qual, segundo Menezes (1987) apresenta na mesma bacia, a espécie-irmã *O. argenteus*.

Muito se tem debatido sobre o papel potencial do Pleistoceno e os seus efeitos sobre a especiação e diversificação dos seres vivos a nível global. O Pleistoceno é caracterizado como a era das glaciações, as quais estão associadas às flutuações do nível do mar (Wetzel, 1975; Salgado-Laboriau, 1994; Bryan, 1997; Neto & Zavatini, 2000). Na América do Norte, o desaparecimento de alguns lagos pluviais teve efeitos biogeográficos importantes, causando a extinção plantas e animais que viviam nesses corpos d'água ou ao redor deles. Além disso, a redução de grandes lagos em lagos menores e isolados levou à especiação alopátrica de espécies como o peixe *Cyprinodon* do sudeste dos Estados Unidos (Miller 1961; Smith, 1981).

Na América do Sul, o primeiro modelo biogeográfico foi proposto por Ab'Saber (1977), quem propôs a teoria de refúgios criados a partir de fragmentações de florestas em períodos de aridez. Este autor ressalta que esses fatores teriam indiretamente favorecido através dos efeitos de vicariância, a especiação de alguns grupos de animais. Recentemente, uma quantidade crescente de dados da paleoecologia são interpretados como incompatíveis com a teoria de refúgio (Rull, 2005; 2006). Estudos de filogeografia sobre a fauna de vertebrados que habitam as florestas tropicais

também reforçam essa hipótese assegurando que a sua diversificação ocorreu muito antes do Pleistoceno (Moritz *et al.*, 2000). A teoria de que o Pleistoceno teria fornecido condições de refúgio para diversificação dos peixes neotropicais de água doce é pouco eficaz, e esse mecanismo geral não foi considerado válido para os peixes (Weitzman & Weitzman, 1982). Segundo Lundberg *et al.* (1998), a fauna de peixes na região neotropical já era essencialmente moderna há cerca de 10 milhões de anos, no Mioceno. Entretanto, mesmo que o Pleistoceno e os efeitos das últimas glaciações não tenham produzido uma explosão de especiação, ele pode ter ajudado a completar a especiação entre populações que já divergiram, ou iniciado a divergência entre populações que poderiam chegar à especiação no futuro (Ridley, 2006).

Durante o Pleistoceno cerca de 10.000 a 14.000 anos antes do presente, ocorreu a Transgressão Flandriana, refletida na América do Sul como a ascensão do nível do mar, sujeita a interrupções por diversos períodos curtos de estabilização (Kowsmann & Costa, 1979). Esses fatores relacionados com um clima árido ocasionaram nesta região uma fase erosiva com efeitos na mudança do curso das águas de alguns rios da porção leste, abandonando áreas de progradação e capturando algumas drenagens adjacentes. Este é o caso do rio Doce, um exemplo especial, que durante a sua fase de progradação mudou o seu curso e capturou alguns outros rios como o caso do Piracicaba, Suaçuí Grande e São Matheus (Petri & Fúlfaro 1985). As capturas sucessivas do rio Doce fizeram com que os antigos braços e paleocanais fossem gradativamente abandonados passando a concentrar-se em canais úmidos e bem definidos, cujas posições se aproximam daqueles ocupados pelos rios atuais, ocasionando a formação de inúmeras lagoas que hoje em dia compõem o sistema lacustre do médio rio Doce (Bandeira Jr, 1973). Neste sentido, na medida em que as lagoas iam sendo isoladas durante a mudança do curso do rio Doce acabavam também por isolar algumas populações de peixes que remanesciam nestas lagoas, estes fatores provavelmente deve ter acontecido com as populações de *Hoplias malabaricus*. As populações fundadoras de cada lagoa acabaram fixando, por deriva genética, um padrão fixo de heterocromatina, conforme foi caracterizado neste estudo.

A frequência e distribuição do citótipo A continua sem resposta. Dada sua baixa frequência (4,5%) na lagoa Carioca, estas traíras podem ter sido

eliminadas por um processo como o efeito Allee, no qual indivíduos de pequenas populações podem não se encontrar para o acasalamento, ou por concorrência com o citótipo B num ambiente em constantes alterações das relações tróficas ocasionadas pela presença de espécies exóticas como o tucunaré, a piranha, o apaiari, o bagre africano e o tamboatá entre outros. Um possível processo de substituição de traíras com diferentes citótipos foi indicado para traíras das planícies do Paraná (Prioli *et al.*, 2004). Dados preliminares de populações de traíras das bacias costeiras dos rios Itabapoana e Paraíba do Sul, situados ao sul da bacia do rio Doce apresentam o citótipo do tipo A (Dergam em prep.). Ao norte da bacia do rio Doce, os efeitos de capturas sucessivas deste rio há 14.000 a 10.000 anos poderiam sugerir a existência do citótipo B uma vez que o rio São Matheus conectou-se com o rio Doce durante sua fase de progradação. Nossos dados indicam que por enquanto, o citótipo B é característico da bacia do rio Doce.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O Citótipo A não foi encontrado em nenhuma das lagoas e a sua condição continua sem resposta.
- As populações que compõem as oito lagoas possuem um acentuado grau de polimorfismo de heterocromatina inter-populacional, o que sugeriu uma alta variação genética entre elas.
- O tempo decorrido desde a formação das lagoas do médio rio Doce há 14.000 anos não foi suficiente para que ocorra um processo de especiação cromossômica ou de alterações que sugiram algum grau de isolamento reprodutivo.
- O citótipo B foi caracterizado como típico da bacia do rio Doce.

REFERÊNCIAS

- Ab 'Saber, A.N. 1977. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, **3**: 1-19.
- Ab' Saber, A.N. 1998. Megageomorfologia do Território Brasileiro. Pp 71-106 In: Cunha, S.B e Guerra, A. G. J. T. (Eds). **Geomorfologia do Brasil**. Rio de Janeiro, Bertrand.
- Almeida-Toledo, I.F. 1998. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. Pp. 583-588 In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M. e Lucena, C.A.S. (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Edipucrs.
- Alves, C.B.M. & Vieira, F.1996. Espécies exóticas de peixes e a sua ocorrência nas bacias hidrográficas de Minas Gerais. Pp-155. **Resumos do IX Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**. Associação Brasileira de Aqüicultura. Sete Lagoas, Minas Gerais.
- Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, **106**: 209-214.
- Bandeira Jr, A.N., Petri, S & Suguio, K. 1975. **Projeto Rio Doce, Relatório Final**. Convênio da Petrobrás. Universidade de São Paulo.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, **1**: 103-120.
- Bertollo, L.A.C. 1996. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia**, **61**:75-81.

Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. & Fontes, M.S. 1997. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with $2n=40$ chromosomes. **Brazil Journal of Genetics**, **20**: 237-242.

Bertollo, L. A. C., Born, G. G., Dergam, J. A., Fenocchio, A. S. & Moreira-Filho, O. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, **8**: 603-613.

Böhlke, J. E., Weitzman, S. H. & Menezes, N.A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica**, **8**: 657-677.

Born, G.G. **Estudo da Diversidade Cariotípica no Grupo *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) Cariótipo $2n=42$** . 2000. Tese de Doutorado. Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, **8**: 111-118.

Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. 2006. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Biology**, **66**: 205-21.

Britski, H. A. 1972. Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. Pp. 79-108. In: **Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. São Paulo.

Britski, H.A., Sato, Y. & Rosa, A.B.S. 1988. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias**. Pp 143. Brasília Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca.

Bryan, M.N. 1997. **Climate process**. Cambridge: Cambridge University Press. Pp 209.

Carvalho, R., Soares-Filho, W. S., Brasileiro-Vidal, A. C. & Guerra M. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetics Genome and Research**, **109**: 276-282.

Cruz, C.D. 2007. Aplicativo computacional em genética e estatística. **GENES**. Disponível em www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm

Da Rosa, R. 2006. **Estudos Citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Instituto Agrônomo do Paraná. Londrina.

Dergam, J.A. & Bertollo, L.A.C. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, **4**: 755-766.

Dergam, J. A. 1996. **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex**. Ph.D. Thesis. Colorado State University, USA.

Dergam, J.A., Suzuki, H.I. E Shibatta, O.A. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná rivers. **Genetics and Molecular Biology**, **21**:493-496.

Dergam, J.A. Paiva, S.R., Schaeffer, C.E., Godinho, A.L. & Vieira, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **25**: 379-387.

Dernburg, E.M., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshal, W.L., Philipis, J., Agard, D.A & Sedat, J.W. 1996. Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. **Cell**, **85**: 754-759.

Dias, A. L & Giuliano-Caetano, L. 2002. Citogenética de alguns grupos de peixes da bacia do rio Tibagi. Pp. 473 -531. In: Medri, M. E., Bianchini, E., Shibata, O. A., Pimenta, J.A. (eds). **Bacia do Rio Tibagi**. Fundação Araucária, Londrina, Paraná.

Espíndola, E.L.G., Branco, M.B.C., Fracácio, R., Guntzel, A.M., Moretto, E.M., Pereira, R.H.G., Rietzler, A.C., Rocha, O., Roggther., S., Smith, W.S & Tavares, S.K. 2003. Organismos Aquáticos. Pp, 201-238. In: **Fragmentação de Ecossistemas**. (vol. 6). Ministério do Meio Ambiente, Biodiversidade. Brasília.

Ferreira, R.H.R., Fonseca, C. G., Bertollo, L. A. C & Foresti, F. 1989. Cytogenetics of fishes from Parque Florestal do Rio Doce (MG). I. Preliminary study of "*Hoplias malabaricus*" (Pisces, Erythrinidae) from lagoa Carioca and lagoa dos Patos. **Revista Brasileira de Genética**, **12**: 219-226.

Galetti Jr, P.M., Foresti, F., Bertollo, L.A. C. & Moreira-Filho, O. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar-organizing region. **Caryologia**, **37**: 401-406.

Galetti Jr, P.M., Silva, E.B. E Carminaro, R.T. 1985. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, **8**: 479-484.

Galetti, Jr. & Foresti, F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationships in the phylogeny of the group. **Revista Brasileira de Genética**, **1**: 135-140.

Galetti Jr, P.M. & Rasch, E.M. 1993. NOR variability in diploid and triploid forms at the Amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A₃ staining. **Brazilian Journal of Genetics**, **16**: 927-938.

Galetti Jr., P.M. 1998. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology**, **65**: 53-56.

Godinho, A.L., M.T. Fonseca & Araújo, L.M. 1994, The ecology of predator fish introductions: the case of Rio Doce valley lakes. Pp 77-83. In: R.M. Pinto Coelho, A. Giani e Von Sperling, E. (Eds.). **Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies**. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Godinho, A. L & Godinho, H.P.1995. Monitoramento de peixes na Lagoa Dom Helvécio, Parque Florestal do Rio Doce. **Instituto Estadual de Florestas**. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Godinho, A.L., & Vieira, F., Peixes. 1998. Pp 94. In: **Biodiversidade em Minas Gerais - um atlas para sua conservação**. Fundação Biodiversitas, Minas Gerais.

Gold, J.R., Li, Y.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**, **37**: 563-575.

Guerra, M. **Introdução Á Citogenética Geral**. Editora Guanabara Rio de Janeiro, 1988.

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.

Irick, H. 1994. A new function for heterochromatin. **Chromosoma**, **103**:1-3

John, B. & Lewis, K.R. 1979. Pp 170. **Hierarquia Cromossômica**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

John, B. & King, M. 1985. The interrelationship between heterochromatin distribution and chiasma distribution. **Genetics**, **66**:183-194.

John, B. 1988. The biology of heterochromatin. In Verma, R.S, (ed.) **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. Cambridge University, New York, Press.

Kowsmain, R. O & De Ataíde Costa, M.P.A. 1979. Sedimentação Quaternária da Margem Continental Brasileira e das Áreas Oceânicas Adjacentes. **Relatório Final do Projeto Remac**. Petrobrás Centro de Pesquisas e Desenvolvimento. Rio de Janeiro.

Lamas, I. R. 1993. **Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Latini, A.O., Pereira, T. L., Latini, R.O., Glacomini, H. C., Lima Júnior, D.P., Oporto, L.T., Barros, D. F & Espírito Santo, H. M. V. 2005. Distribuição e efeito de peixes exóticos sobre a ictiofauna nativa dos lagos do Médio Rio Doce. Pp-417. In: Rocha, O., Espíndola, E.G.L.; Fenerich-Verani, N; Rietzler, A.C. (Org.). **Espécies Invasoras em Águas Doces - Estudos de Caso e Propostas de Manejo**. (1 ed.). São Carlos, São Paulo.

Latini, A.O & Petrere, M. 2004. Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fisheries Management Ecology**, **11**: 71-79.

Latini, A. O. 2005. **Inventário rápido e identificação de variáveis que limitam a dispersão de exóticos: um estudo sobre peixes no médio rio Doce (MG, Brasil)**. Tese de Doutorado em Ecologia. Universidade de Campinas. Campinas.

Lemos, P.M.M., Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. & Cestari, M.M. 2002. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçu river basin. (Paraná State, Brazil). **Caryologia**, **55**: 193-198.

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

Lopes, P.A., Alberdi, A.J., Dergam, A.J., Fenocchio, A. S. 1998. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in Aguapey River (province of Corrientes, Argentina). **Copeia**, **2**: 485-487.

Lowe-McConnell, R.H. 1987. Ecological studies on some lakes in the Amazon valley. **Amazoniana**, **1**: 91-115.

Lundberg, J.G., L.G. Marshall, J., Guerrero, B., Horton, M.C.S.L., Malabarba & F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South America rivers. Pp.13-48. 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.

Mandrioli, M., Manicardi, G.C., Machella, N., & Caputo, V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). **Genetica**, **110**: 73-78.

Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A. & Moreira-Filho, O. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, **109**: 161-168.

Meis, M.R.M. & Monteiro, A.M.F. 1979. Upper Quaternary "rampas", Rio Doce Valley: S.E. Brazilian plateau. **Zusammenfassun fur Geomorphologie**, **23**: 132-151.

Meis, M.R.M. & Moura, J.R.S. 1984. Upper quaternary sedimentation and hillslope evolution: SE Brazilian plateau. **American Journal Science**, **284**:241-254.

Mestriner, C.A., Bertollo, L.A.C. & Galetti Jr, P.M. 1995. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): Analysis of a sex system. **Chromosome Research**, **3**: 440-443.

Miller, R.R. 1961. Speciation rates in some freshwater fishes of western North America. Pp 537-560 In W. F. Blair. (eds). **Vertebrate Speciation**. Austin, University of Texas Press.

MMA/SBF. 2000. **Avaliação e Ações Prioritárias Para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, Distrito Federal.

Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, **12**: 1855-1867.

Moreira-Filho, O., Bertollo L.A.C & Galetti JR, P.M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Cytologia**, **26**: 564-568.

Moreira-Filho, O. 1989. **A diversidade no complexo *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): análises citogenéticas e morfológicas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Morelli, S. 1981. **Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Morelli, S.1998. **Citogenética evolutiva em espécies do gênero *Hoplias*, grupo *lacerdae*. Macroestrutura cariotípica, heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. E Smith, T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Review of Ecology and Systematics**, 31:533–563.

Moyle, P. B. & Cech, J. J. 1988. **Fishes – an Introduction to Ichthyology.** New Jersey: Prentice-Hall.

Myers, G. S., 1938. Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. Pp. 339-364 An. **Reptile Smithsonian Institute.**

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World. New York.** Pp 600. John Wiley e Sons.

Nirchio, M & Oliveira, C. **Citogenética de Peces.** Pp 216. 2006 Universidade de Oriente. Cumaná, Venezuela.

Ojima, Y & Ueda, T. 1979. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. **Proceedings of the Japan Academy**, 54: 15 –20

Oyakawa, O.T. 2003. Family Erythrinidae (Trahiras). Pp.238-240 In: R. E. Reis, S.O. Kullander & C. J. Ferrari Jr. (eds) **Check List of the Freshwater Fishes of South an Central America**, Edipucrs, Porto Alegre.

Paganelli, H.H. 1980. **A diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Considerações taxonômicas e evolutivas.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

Pardue, M.L. & Hennig, W. 1990. Heterochromatin, junk or collectors item? **Chromosoma**, **100**: 3-7.

Pauls, E. & Bertollo, L.A.C. 1990. Distribution of a supranumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, **81**:117-123.

Pazza, R & Júlio Jr, H. F. 2003. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the Upper Paraná River. **Cytologia**, **68**: 159-163.

Pendás, A.M., Morán, P. & Garcia-Vásquez, G. 1993 Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **63**: 28-130.

Petri, S & Fúlfaro, V. J. 1983. Pp. 472-474. Quaternário, região do médio rio Doce In: **Geologia do Brasil**. Editora Edipusb, Minas Gerais.

Pflug, R. 1969. Quaternary lakes or Eastern Brazil. **Photogrametria**, **24**: 29-35.

Pompeu, P. S & Godinho, A. L. 2001. Mudança na dieta da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Erythrinidae, Characiformes) em lagoas da bacia do rio Doce devido à introdução de peixes piscívoros. **Revista Brasileira de Zoologia**, **18**: 1219-1225.

Prioli, A. J., Priol, S. M. A. P., Maniglia, T. C. Lucio, L C., Júlio Jr, H. F., Pazza, R., Carrer, H., Prioli, L. M. Molecular Markers and Genetic Variability of *Hoplias* aff. *malabaricus* - Populations from the Upper Paraná River Floodplain. In: Alberto J. Prioli; Sonia M.A.P. Prioli; Laudénir M. Prioli; Horácio F. Júlio Jr. (Org.). **The Upper Parana River Floodplain: Structure and Process**. Maringá - PR: Eduem, 2004, v., p. 122-126.

Ribeiro, A.C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, **4**: 225-246, 2006.

Rohlf, J.F. 1989. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Manual). **NTSYS-pc**. Exeter Publishers, New York.

Rull, V. 2005. Biotic diversification in the Guayana Highlands, a proposal. **Journal of Biogeography**, **32**: 921-927.

Rull, V. 2006. Quaternary speciation in the neotropics. **Molecular Ecology**, **15**: 4257-4259.

Rydley, M. 2006. Biogeografia Evolutiva. Pp.523. **Evolução 3ª Edição**. Artmed, Porto Alegre.

Salgado –Laboriau, M. L.1994. **História Ecológica da Terra**. Pp 307. São Paulo: Edgard Blücher.

Scavone, M. D. P., Bertollo, L. A. C. & Cavallini, M. M. 1994. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios**, **80**: 223-227.

Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **27**:190-193.

Smith, G.R.1981. Late Cenozoic freshwater fishes North America. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **12**: 163-193.

Schaefer, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricaridae). Pp.375-400. In: Malabarba, L.R., R.E., Reis, R.P., Vari, Z.M.S. Lucena e C.A.S. Lucena (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre.

Sivasundar, A., Bermingham, E. & ORTI. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, **10**:407-417.

Summer, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, **75**: 304-306.

Summer, A.T. 2003. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Science Ltd.

Sunaga, T & Verani, J. R. 1983. Preliminary report of comparative study on fish community of the Rio Doce Valley Lakes. Pp. 167-174. In: Saijo, Yatsuka and José Galizia Tundisi. (eds). **Limnological studies in Central Brazil**. Walter Research Institute, Nagoya University.

Sunaga, T. & Verani. T. 1989. Third report of comparative study on fish community of the rio Doce valley lakes. Pp 117-122. (3rd report). In: Yatsuka Saijo e José Galizia Tundisi. **Limnological Studies in Rio Doce Valley Lakes Brazil**. Verhandlungen International Verein Limnologie.

Toledo-Filho, S. A., Foresti, F. E Almeida-Toledo, L.F. 1998. Biotecnologia e genética aplicada à piscicultura. In: **Cadernos de Ictiogenética 3**. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Tundisi, J.G & Meis, M.R.M. 1985. Geomorphology and limnological processes at the middle rio Doce Valley Lakes. (2nd Report). Pp 11-15 In: Yatsuka Saijo e José Galizia Tundisi. **Limnological Studies in Rio Doce Valley Lakes Brazil**. Walter Research Institute, Nagoya University.

Vari, R.P & Malabarba, L.R. 1998. Pp 1-11. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre.

Vicari, M.R., Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Animal Cytogenetics and Comparative Mapping**, **101**: 24-28.

Vicari, M.R., Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, **28**: 103-110.

Vono, V. & Barbosa, F. A. R. 2001. Habitats and littoral zone fish community structure of two natural lakes in southeast Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, **61**:371-379.

Zavatini, J. A. & Neto, S. A. 2000. **Variabilidade e mudanças climáticas**. Pp. 259. Maringá: Eduem.

Wichmam, H.A., Payne, C.T., Ryder, A.D., Hamilton, M.J., Maltibie, M & Baker, R.J.1991. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implication to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**, **82**:369-377.

Weitzman, S.H. & Weitzman, M. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. Pp. 403-422. In: **Biological Diversification in the Tropics**. Prance, T.G. (ed). Columbia University Press.

White, M.J.D. 1973. Chromosomal Polymorphism in Natural Populations. pp. 231-284. In: **Animal Cytology and Evolution**. (3^o ed.). The University Press, Cambridge.

Wetzel, R. G. 1975. **Limnology**. Philadelphia:W.B. Saunders.

Anexo

Anexo 1. Matriz binária dos padrões de distribuição de heterocromatina e de CMA₃ nas populações de *Hoplias malabaricus*. 1 presença, 0 ausência e 9 dados ausentes. Obs: Bloco 1= Grande bloco no centrômero, Bloco 2= Grande bloco nos telômeros braço inferior.

	Heterocromatina	Carioca	Cristal	Curi	J. de Fora	Hortência	Lingüiça	Marola	Tiririca
Todos os pares	Centromérica	1	1	1	1	1	1	1	1
Par 4	Bitelomérica	1	0	1	1	1	0	1	1
Par 5	Bitelomérica	1	0	1	1	1	0	0	0
Par 6	Bitelomérica	0	1	0	0	0	1	0	1
Par 7	Bitelomérica	0	1	0	1	0	0	0	0
Par 8	Bitelomérica	0	1	1	1	1	0	1	1
Par 9	Bitelomérica	1	1	1	1	1	1	1	1
Par 10	Bitelomérica	1	1	1	0	1	1	1	1
Par 11	Bitelomérica	0	0	1	1	1	1	1	0
Par 12	Bitelomérica	1	0	0	0	1	0	0	0
Par 1	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	1	0
Par 2	Bloco 1 no centrômero	1	0	0	0	1	0	1	1
Par 3	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	1	1
Par 4	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	1	0
Par 14	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	1	0
Par 16	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	0	1
Par 17	Bloco 1 no centrômero	0	0	0	0	0	0	1	1
Par 14	Telomérica braço superior	0	0	1	1	0	0	0	0
Par 15	Telomérica braço Inferior	0	0	1	1	1	0	0	0
Par 17	Telomérica braço Inferior	0	0	0	1	0	0	0	1
Par 19	Telomérica braço Inferior	0	0	1	0	1	0	0	1
Par 20	Telomérica braço Inferior	1	1	1	1	1	0	1	1
Par 5	Bloco 2 nos telômeros braço inferior	0	0	0	0	0	0	1	0
Sexual	Bloco pequeno de heterocromatina	0	0	0	0	0	0	1	0
Cma3	Ausência de marcação no X	0	9	9	0	9	0	1	0