

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

Comportamento cromossômico meiótico e mitótico de acarás-disco
(*Symphysodon aequifasciatus* e *Symphysodon discus*, Cichlidae,
Perciformes) da Amazônia Central

MARIA CLAUDIA GROSS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus-AM
2006

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

**Comportamento cromossômico meiótico e mitótico de acarás-disco
(*Symphysodon aequifasciatus* e *Symphysodon discus*, Cichlidae,
Perciformes) da Amazônia Central**

MARIA CLAUDIA GROSS

ORIENTADORA: Eliana Feldberg - INPA

CO-ORIENTADORA: Doralice Maria Cella – UNESP - Rio Claro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus-AM
2006



Eliana Feldberg

Orientadora



Doralice Maria Cella

Co-orientadora

FICHA CATALOGRÁFICA

Gross, Maria Claudia

Comportamento cromossômico meiótico e mitótico de acarás-disco (*Symphysodon aequifasciatus* e *Symphysodon discus*, Cichlidae, Perciformes) da Amazônia Central – 2006. 67 f.

Dissertação (mestrado)– INPA/UFAM, Manaus, 2006.

1- Peixes - Citogenética I. Título

CDD 19. ed. 597.50415

SINOPSE

São mostrados dados citogenéticos mitóticos e meióticos de *S. aequifasciatus* de Manacapuru (AM) e *S. discus* de Novo Airão (AM). Todos os indivíduos apresentaram $2n=60$ cromossomos, sendo 46 M-SM + 14 microcromossomos para *S. aequifasciatus* e 50 M-SM + 10 ST-A para *S. discus*. Porém, alguns indivíduos de *S. aequifasciatus* apresentaram constrições secundárias que não se coravam com Giemsa, parecendo haver uma variabilidade cariotípica. A heterocromatina constitutiva foi evidenciada como grandes blocos na região pericentromérica de quase todos os cromossomos das duas espécies, mas somente *S. aequifasciatus* apresentou seis pares cromossômicos inteiramente heterocromáticos. Ambas as espécies mostraram RONS múltiplas, sendo que *S. aequifasciatus* apresentou quatro pares e *S. discus* dois pares de cromossomos portadores de RON, entretanto sempre foram visualizadas uma ou duas marcações. Na meiose, *S. aequifasciatus* apresentou uma cadeia cromossômica singular, a qual não foi vista em *S. discus*.

Palavras-chave: Amazonas; Peixes; Citogenética; Meiose; Evolução cromossômica

Dedico esta dissertação aos meus pais,
Marilda e Lineu, meus exemplos de vida.

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes.”

Autor anônimo

A realização deste projeto foi possível devido:

Ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM), curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Ao laboratório de Genética de Peixes do INPA, coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA), onde a maior parte deste trabalho foi desenvolvido, com o financiamento proporcionado pelos Projetos de Pesquisas Institucionais (PPIs 2-2205 e 2-3750), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PNOFG 550703/01), CNPq/ PRONEX e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (PIPT/FAPEAM).

Ao laboratório de Citogenética da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, onde análises meióticas preliminares foram realizadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que concedeu a bolsa de estudo (processo 130862/2004-5) durante o período da realização deste trabalho.

Ao IBAMA pela concessão da licença de coleta e manipulação de material genético.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas, colegas e amigos que, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho.

À Dra. Eliana Feldberg, que além de ser uma excelente orientadora é uma mãe para todos os alunos do laboratório, por ter acreditado no meu trabalho, pelos ensinamentos, estímulo, apoio, atenção, conselhos e amizade, o que facilitou a realização deste trabalho.

À Dra. Doralice Maria Cella, que prontamente aceitou o desafio de me co-orientar em uma área diferente de sua linha de pesquisa, ajudando-me a desvendar os mistérios da meiose.

À Marielle Cristina Schneider, minha estrela-guia, que, mesmo estando longe, me ajudou em todas as etapas deste mestrado. Sem o seu auxílio na interpretação dos resultados, certamente este trabalho não teria sido realizado.

Aos membros da banca de qualificação e aos *referees* do plano, em especial ao Dr. Jorge Porto e ao Dr. Jansen Zuanon, pelas críticas e sugestões.

Aos colegas do laboratório de Genética de Peixes: Aldaléia, Leandra, Renildo, Eduardo, Carlos, Denise, Fabiana, Jota, Maria José, Fátima, Germano, Arlindo e Celeste pelos debates, críticas e sugestões acadêmicas, bem como pelas festas no laboratório.

Aos amigos do mestrado do INPA, cursos BADPI e GCBEV-2004, em especial Cylene, Luiza, Rodrigo, Renildo, Alda, Waleska e Daniel, pelos momentos de descontração e amizade. Sem eles, o caminho teria sido bem mais cansativo.

À Dra. Angela Varella e ao Dr. José Celso Malta, que salvaram a minha dissertação ao emprestar a máquina fotográfica para as últimas fotos.

A todos os meus amigos, que estão próximos ou distantes, os quais sempre torceram por mim.

Ao Marcelo, Mara, Roberto, Miguel, Ernani e demais colegas do laboratório de Citogenética Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos primeiros ensinamentos em citogenética, pela amizade e por sempre desejarem que eu prosperasse profissionalmente.

À Leandra e ao Igor, meus grandes amigos, por possibilitarem dias muito mais agradáveis no cotidiano manauara.

Ao profissional Carlos Henrique Schneider que muito me ajudou com críticas e sugestões na realização deste trabalho, e ao meu esposo Carlos Henrique, que sempre carinhosamente me incentivou e apoiou em todos os momentos.

A todos os meus familiares, especialmente à tia Leila e ao meu irmão João Henrique, que além de sempre me apoiarem em todas as decisões, também estiveram presentes nesta etapa, dando-me força e *smiles* para ir para casa.

Aos meus pais, Marilda e Lineu Gross que são o meu porto seguro. Sem o apoio, confiança e incentivo proporcionado por eles eu não teria crescido pessoal e profissionalmente.

A Deus, por ter me dado força para suportar a saudade de casa, dos amigos e dos familiares.

Resumo

Foram realizados estudos citogenéticos mitóticos e meióticos das espécies: *Symphysodon aequifasciatus* do rio Manacapuru- Manacapuru (AM) e *Symphysodon discus* do rio Negro- Novo Airão (AM). Todos os indivíduos apresentaram número diplóide igual a 60 cromossomos e não foram verificados cromossomos heteromórficos com características indicativas de cromossomos sexuais nas espécies analisadas. Em relação à fórmula cromossômica, *S. aequifasciatus* mostrou 46 M-SM + 14 microcromossomos e *S. discus* 50 M-SM + 10ST-A. Porém, alguns indivíduos de *S. aequifasciatus* exibiram constrições secundárias que não se coravam com Giemsa, parecendo haver uma variabilidade cariotípica. Quanto à heterocromatina constitutiva, ambas as espécies exibiram grandes blocos pericentroméricos em quase todos os cromossomos do complemento, porém, somente *S. aequifasciatus* apresentou seis pares cromossômicos inteiramente heterocromáticos. Com relação às regiões organizadoras de nucléolo, ambas as espécies evidenciaram RON múltiplas, contudo, sítios ribossomais foram detectados nos pares cromossômicos 4, 5, 11 e 21 em *S. aequifasciatus* e nos pares 17 e 23 em *S. discus*, porém nunca mais que dois sítios estiveram ativos. Na meiose, a diferença mais marcante encontrada entre as duas espécies foi durante o diplóteno/diacinese, visto que *S. aequifasciatus* apresentou, além de 20 bivalentes, uma cadeia envolvendo 20 cromossomos e *S. discus* apenas 30 bivalentes. Assim, $2n=60$ cromossomos em ambas as espécies e a presença de cadeia cromossômica na meiose de *S. aequifasciatus* podem ser explicados por uma origem poliplóide para as duas espécies do gênero *Symphysodon*, uma vez que o número ancestral para a família Cichlidae é $2n=48$ cromossomos, a maioria do tipo acrocêntrico. A cadeia cromossômica, encontrada apenas em *S. aequifasciatus*, pode indicar que esta se encontra em um período transiente, enquanto *S. discus* já teria terminado a sua diploidização, provavelmente por ser mais antiga que a primeira.

Abstract

Meiotic and mitotic cytogenetics studies were carried out on species: *Symphysodon aequifasciatus* collected from the Manacapuru River- Manacapuru (AM) and *Symphysodon discus* from the Negro River- Novo Airão (AM). All individuals showed a modal number of $2n=60$ chromosomes and there was no sex chromosomal heteromorphism in these species. Regarding the chromosomal formulae, *S. aequifasciatus* showed 46 M-SM + 14 microchromosomes and *S. discus* 50 M-SM + 10ST-A. However, some *S. aequifasciatus* individuals showed a Giemsa non-stained secondary constriction, looking like a chromosomal polymorphism. The constitutive heterochromatin was seen as large pericentromeric blocks on most chromosomes, of both species, however only *S. aequifasciatus* showed six wholly heterochromatic pairs. Multiple nucleolus organizing regions were identified in both species, *S. aequifasciatus* presented ribosomal sites on chromosomal pairs 4, 5, 11 and 21, and *S. discus* on the pairs 17 and 23, but never more than two sites showed to be active. In the meiosis, the greater difference observed between the two species was during diplotene/diacinesis, because *S. aequifasciatus* showed a chromosomal chain with 20 elements and 20 bivalents, while *S. discus* presented only 30 bivalents. Thus, $2n=60$ chromosomes, in both species, and a meiotic chromosomal chain, in *S. aequifasciatus*, can be accounted for the *Symphysodon* polyploidy origin, since the ancestral number to the Cichlidae family is $2n=48$ chromosomes, most of them of the acrocentric type. Moreover, the *S. aequifasciatus* chromosomal chain points that this species is probably found in a transience period, while *S. discus* finished its diploidization process, on account of it being the older species.

Sumário

I – INTRODUÇÃO	1
I.1 - Considerações gerais.....	1
I.2 – Acará-disco.....	5
I.2.1 Aspectos gerais.....	5
I.2.2 Aspectos citogenéticos dos acarás-disco	9
I.4 – Objetivos	14
I.4.1 Gerais.....	14
I.4.2 Específicos.....	14
II - MATERIAL E MÉTODOS	15
II.1 – Obtenção de exemplares para estudo	15
II.2 – Métodos citogenéticos	19
II.2.1 Indução de mitoses	19
II.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	19
II.2.3 Preparação das lâminas de cromossomos mitóticos	20
II.2.4 Obtenção de cromossomos meióticos de machos	20
II.2.5 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos nos cromossomos mitóticos e meióticos	21
II.2.6 Detecção da heterocromatina constitutiva nos cromossomos mitóticos e meióticos	22
II.2.7 Análises das preparações mitóticas e meióticas	22
III - RESULTADOS	24

III. 1 – Cromossomos mitóticos	24
III.1.1 <i>Symphysodon aequifasciatus</i>	24
III.1.2 <i>Symphysodon discus</i>	30
III.2 – Cromossomos meióticos	33
III.2.1 <i>Symphysodon aequifasciatus</i>	33
III.2.2 <i>Symphysodon discus</i>	38
IV – DISCUSSÃO.....	43
IV.1 - Variabilidade cariotípica no gênero <i>Symphysodon</i>	43
IV.2 - Singularidade meiótica em acarás-disco	48
IV.3 – Evolução de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> e <i>Symphysodon discus</i>	54
V – CONCLUSÃO	57
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 - Árvore filogenética da subfamília Cichlasomatinae.....	7
Figura 2 – Mapa de distribuição dos acarás-disco na bacia Amazônica.....	10
Figura 3 – Exemplos de <i>Symphysodon</i> spp.	17
Figura 4 - Mapa dos locais de coleta	18
Figura 5 – Cariótipos de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> de Manacapuru (AM).....	27
Figura 6 – Padrão das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) em <i>Symphysodon aequifasciatus</i> de Manacapuru (AM).....	28
Figura 7 – Variações na fórmula cromossômica de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> de Manacapuru (AM) e padrão de RONS.....	29
Figura 8 - Cariótipos de <i>Symphysodon discus</i> de Novo Airão (AM).....	31
Figura 9 – Regiões organizadoras de nucléolo de <i>Symphysodon discus</i> de Novo Airão (AM).....	32
Figura 10 – Células testiculares de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> em coloração convencional.....	35
Figura 11 - Células testiculares de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> submetidas à técnica de banda C	36
Figura 12 - Células testiculares de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> impregnadas pelo íon prata.....	37
Figura 13 - Células testiculares de <i>Symphysodon discus</i> em coloração convencional...	40
Figura 14 - Padrão de bandas C em células testiculares de <i>Symphysodon discus</i>	41
Figura 15 - Células testiculares de <i>Symphysodon discus</i> impregnadas pelo íon prata ..	42
Figura 16 – Cadeia cromossômica de <i>Symphysodon aequifasciatus</i> de Manacapuru ...	53

Tabela

Tabela 1 – Fórmulas cariotípicas no gênero <i>Symphysodon</i>	13
---------------------------------------------------------------------	----

I – INTRODUÇÃO

I.1 - Considerações gerais

A região Neotropical, região biogeográfica que se estende do sul do México ao extremo sul da América do Sul, abriga uma das ictiofaunas de água doce mais diversificadas do mundo (Lowe-McConnel, 1999) e, muitos estudos citogenéticos vêm sendo desenvolvidos nesta região visando auxiliar na compreensão desta diversidade.

A citogenética surgiu a partir da junção da citologia e da genética, no início do século XX, e atualmente compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (Guerra, 1988; Almeida-Toledo, 1998; Oliveira *et al.*, 2002). Duas vertentes são comumente associadas ao estudo citogenético de peixes neotropicais: a citotaxonomia e a citossistemática.

A citotaxonomia pode ser definida como a nomeação e designação de organismos a táxons, utilizando a citogenética como ferramenta, enquanto a citossistemática é o estudo das relações históricas evolutivas entre organismos, com base em suas similaridades e diferenças cromossômicas. Ambas as vertentes tiveram seu início a partir da segunda metade do século XX, quando foi verificado que características cromossômicas podiam individualizar algumas espécies animais. Tais estudos têm se mostrado importantes no caso dos peixes, complementando os estudos de identificação taxonômica clássica, a distribuição geográfica e de relação evolutiva entre grupos naturais, uma vez que muitos peixes possuem uma diferenciação cariotípica não refletida morfologicamente (Brown & Bertke, 1969; Ojima *et al.*, 1976; Futuyma, 1997; Almeida-Toledo, 1998; Oliveira *et al.*, 2002).

Vários autores, estudando cromossomos mitóticos de peixes neotropicais, têm detectado citótipos, ou tipos cariotípicos, diferentes, em uma mesma espécie e têm

sugerido que cada citótipo pode representar uma espécie distinta (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Nakayama *et al.*, 2001).

Na citogenética, além dos cromossomos mitóticos, o comportamento cromossômico meiótico também pode ser analisado. A meiose é um tipo especial de divisão celular que ocorre praticamente da mesma maneira em todos os eucariotos. Este processo é essencial para a reprodução sexuada, uma vez que produz gametas haplóides, a partir de células parentais diplóides, garantindo que o número de cromossomos permaneça igual ao dos genitores após a fecundação, além de permitir a recombinação dos genes. Para isso, duas divisões são necessárias: na primeira divisão, o complemento cromossômico, já replicado, é compactado e os cromossomos homólogos movem-se para os pólos celulares opostos de forma aleatória, enquanto que na segunda divisão, sem haver nova replicação, as cromátides irmãs separam-se aleatoriamente, resultando os gametas haplóides (Moens, 1987; John, 1990; Kleckner, 1996; Roeder, 1997).

Estudos meióticos foram empregados na citogenética de peixes neotropicais até o início da década de 80, mas eram utilizados principalmente para confirmar o número diplóide encontrado na espécie, por meio da análise de metáfases I e II, nas quais se esperava encontrar na metáfase I o número haplóide de bivalentes cromossômicos e na metáfase II o número haplóide de cromossomos da referida espécie. Entretanto, informações citogenéticas complementares, principalmente relacionadas a sistema cromossômico de determinação sexual, cromossomos supranumerários e rearranjos cromossômicos foram sendo obtidas através da análise de células meióticas. Como exemplos, podem ser mencionados os estudos meióticos realizados em duas espécies de peixes do gênero *Hoplias* (Characiformes) por Bertollo (1978) e Bertollo *et al.* (1978). Em *Hoplias lacerdae*, Bertollo *et al.* (1978) verificaram a ocorrência de uma meiose típica e regular, que confirmava o número cromossômico da espécie. Porém, em *Hoplias*

malabaricus provenientes da Represa do Lobo (SP), Bertollo (1978) detectou que a diferença do número diplóide entre machos e fêmeas era devido à ocorrência de um sistema cromossômico de determinação sexual múltiplo nesta espécie.

Adicionalmente, Pauls (1981) estudando cromossomos supranumerários em *Prochilodus scrofa* (Characiformes) observou, que estes cromossomos comportavam-se como univalentes na meiose I, podendo associar-se a outros cromossomos em alguns casos. Feldberg & Bertollo (1984) encontraram células somáticas de *Gymnogeophagus balzanii* (Perciformes) com $2n=48$ cromossomos, mas espermátócitos com um número haplóide variando de 24 a 26 cromossomos, sendo esta discordância creditada à presença de cromossomos supranumerários restritos às células germinativas.

Contudo, devido à maior complexidade de análise, decorrente do tamanho reduzido dos cromossomos, os estudos meióticos passaram a ser utilizados somente na elucidação de problemas específicos e se tornaram escassos nas análises citogenéticas gerais de peixes. Vinte anos depois dos primeiros estudos meióticos realizados em traíras, Bertollo & Mestriner (1998) voltaram a analisar a meiose e o complexo sinaptonêmico de *Hoplias malabaricus*, que apresentava um sistema sexual múltiplo ($2n=36+X_1X_1X_2X_2$ em fêmeas e $2n=36+X_1X_2Y$ em machos), para compreender o comportamento cromossômico. Por meio destas análises, confirmou-se que nos machos os autossomos emparelhavam-se perfeitamente e que os cromossomos sexuais formavam um trivalente na meiose I e tinham uma segregação regular na anáfase I e anáfase II.

O comportamento de cromossomos supranumerários na meiose também voltou a ser estudado em meados da década de 90. Dias (1995) analisando *Prochilodus lineatus* e *Astyanax scabripinnis* (ambos Characiformes), constatou que o único cromossomo supranumerário de *Astyanax scabripinnis* comportava-se como um univalente na meiose, enquanto os supranumerários (zero a sete cromossomos) de *Prochilodus*

lineatus associavam-se como bivalentes, trivalentes e tetravalentes, evidenciando uma possível homologia entre eles. Já, Portela-Castro *et al.* (2001) encontraram de um a dois cromossomos B, também conhecidos como supranumerários, em células somáticas de machos de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Characidae), porém nunca em fêmeas, e ao analisar o complexo sinaptonêmico, verificaram que durante a prófase I os cromossomos supranumerários apresentavam-se, na maioria das vezes, como pequenos bivalentes, o que poderia estar favorecendo a sua transmissão e manutenção durante a evolução cromossômica da espécie.

No início do século XXI, estudos meióticos começaram a ser aplicados como ferramenta na piscicultura neotropical. Santos *et al.* (2002) utilizaram o complexo sinaptonêmico para demonstrar que o peixe tambacu, híbrido artificial de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characiformes), possui uma meiose atípica, garantindo que a produção artificial destes híbridos não ocasionaria um processo de introgressão em relação às espécies parentais, não havendo assim o risco de extinção dessas espécies.

De um modo geral, a citogenética de peixes, além de ser a base para vários estudos genéticos, pode ser usada em vários outros estudos, dentre eles a detecção dos efeitos de mutágenos ambientais e a análise da variabilidade genética em populações. Porém, sua maior aplicabilidade, sem dúvida alguma, refere-se aos estudos evolutivos e filogenéticos, nos quais é considerada uma excelente ferramenta para ser utilizada em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e genética molecular, para se chegar mais próximo de uma real história evolutiva, com a vantagem das técnicas serem muito mais econômicas (Almeida-Toledo, 1998; Artoni *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002; Feldberg *et al.*, 2003; Ferraro *et al.*, 2004).

I.2 – Acará-disco

I.2.1 Aspectos gerais

A bacia Amazônica é formada pelo rio Amazonas e um incontável número de outros rios e pequenos igarapés, formando uma rede de cursos d'água representada por águas claras, pretas e brancas, tornando-a a maior bacia hidrográfica do mundo, com cerca de sete milhões de quilômetros quadrados (Sioli, 1990; Lowe-McConnel, 1999; Santos & Ferreira, 1999).

Este complexo sistema aquático favoreceu a especiação e forneceu as condições ideais para o desenvolvimento de uma das maiores ictiofaunas continentais, sendo estimada a presença de aproximadamente 3.000 espécies de peixes na bacia Amazônica (Santos & Ferreira, 1999). Deste total, cerca de 200 espécies são comercializadas como peixes ornamentais (IBAMA, portaria 62/1992), estando o acará-disco (*Symphysodon* spp.) como um dos peixes de maior destaque (Chao, 1993; 2001).

O gênero *Symphysodon* Heckel, 1840, conhecido como acará-disco, ou apenas disco, é endêmico da bacia Amazônica, pertence à ordem Perciformes, família Cichlidae, tribo Heroini. Esta tribo, além de *Symphysodon*, compreende os gêneros *Hoplarchus*, *Caquetaia*, *Cichlasoma*, *Hypseleacara*, *Heroina*, *Heros*, *Uaru*, *Mesonauta* e *Pterophyllum* (Kullander, 1998). Segundo dados moleculares e morfológicos, os gêneros *Heros*, *Uaru*, *Mesonauta*, *Symphysodon* e *Pterophyllum* estão intimamente relacionados (Kullander, 1998; Farias *et al.*, 2000) (Figura 1).

Além das características morfológicas peculiares dos ciclídeos, que são a presença de apenas um orifício nasal de cada lado do focinho, boca protátil, lábios grossos, raios anteriores das nadadeiras dorsal e anal e os primeiros raios da ventral transformados em espinhos e linha lateral interrompida, os acarás-disco possuem o corpo comprimido lateralmente, em forma discoidal e um padrão de barras verticais (Silva & Kotlar, 1980; Axelrod, 1995; Ferreira *et al.*, 1998).

Os discos apresentam em média, na idade adulta, 20 cm de comprimento e não possuem dimorfismo sexual evidente externamente. São onívoros, consumindo preferencialmente algas filamentosas, camarões e larvas de insetos. Sua maturação sexual ocorre entre um e dois anos de vida, dependendo do estado nutricional, e despendem grande cuidado parental com a prole. Habitam preferencialmente pequenos lagos e igarapés de águas calmas, claras ou escuras, repletos de galhos, troncos e raízes submersas (Silva & Kotlar, 1980; Axelrod, 1995; Ferreira *et al.*, 1998).

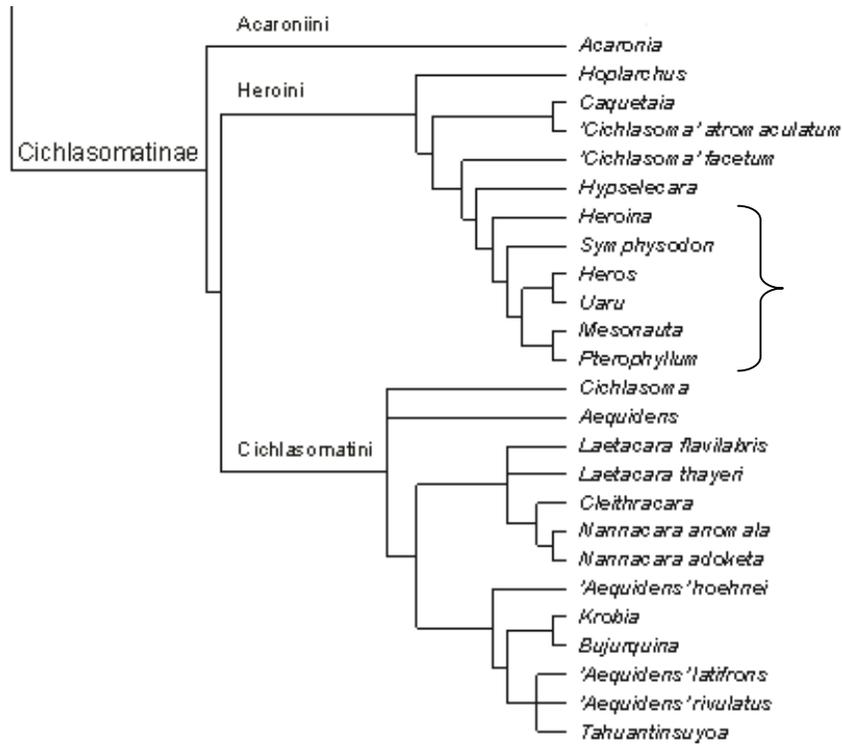


Figura 1 - Árvore filogenética da subfamília Cichlasomatinae
Elaborada por Kullander (1998), com base em caracteres morfológicos. Em destaque grupos mais relacionados ao gênero *Symphysodon*, tribo Heroini.

O gênero *Symphysodon* compreende duas espécies: *S. aequifasciatus* Pellegrin, 1904 e *S. discus* Heckel, 1840 (Kullander, 1996; 2003). Porém, alguns autores defendem a existência de subespécies, sendo três incluídas em *S. aequifasciatus* e duas em *S. discus* (Silva & Kotlar, 1980).

De um modo geral, a principal distinção entre as duas espécies baseia-se no padrão de barras verticais, enquanto as subespécies são caracterizadas por detalhes na coloração em vida, presença de listras pelo corpo e distribuição geográfica (Figura 2). Em *S. aequifasciatus*, as barras na região dos olhos e na base da nadadeira caudal são mais evidentes que as outras, apesar de apresentarem a mesma largura e a mesma coloração (Kullander, 1996). As três subespécies são caracterizadas da seguinte forma: *S. aequifasciatus aequifasciatus* (disco verde) apresenta coloração principal marrom avermelhado escuro, com listras claras e escuras atravessando longitudinalmente o corpo; *S. aequifasciatus haraldi* (disco azul) tem quase todo o corpo coberto por pequenas linhas onduladas azuis e *S. aequifasciatus axelrodi* (disco marrom) possui coloração marrom e nove barras verticais evidentes no corpo (Silva & Kotlar, 1980).

Symphysodon discus apresenta três barras verticais mais evidentes: na região dos olhos, na região mediana do corpo e na base da nadadeira caudal. Além disso, apresenta variação maior no número de escamas longitudinais, número menor de raios na nadadeira dorsal e número menor de vértebras abdominais (Kullander, 1996). As subespécies *S. discus discus* e *S. discus willischwartzii*, segundo Kullander (1996), não apresentam características que apoiem a sua distinção. Entretanto, Silva & Kotlar (1980) acreditam que somente *S. discus discus* tenha coloração principal vermelha e listras azuis onduladas irregularmente alternadas na horizontal.

Segundo Kullander (1996), *S. discus* e *S. aequifasciatus* nunca foram encontradas em simpatria, sendo *S. aequifasciatus* encontrado no rio Amazonas, rio Solimões e do baixo rio Putumayo-Iça até Belém e *S. discus* restrito ao rio Negro, rio

Abacaxis e baixo rio Trombetas. De acordo com Jansen Zuanon (comunicação pessoal, 2005) no baixo Trombetas são encontrados tanto *S. aequifasciatus* quanto *S. discus*. Segundo Axelrod (1978), as duas espécies podem se inter cruzar em cativeiro

Axelrod (1978) acredita que os inter cruzamentos entre as subespécies de *Symphysodon* permitem uma grande variedade de tonalidades e cores, enquanto que Goldstein (1973) e Kullander (1996) defendem a idéia de que as diferentes colorações são determinadas por influência do ambiente ou de hormônios, estando estas cores correlacionadas à adaptação do animal aos tipos específicos de água e habitat, não justificando uma separação em subespécies.

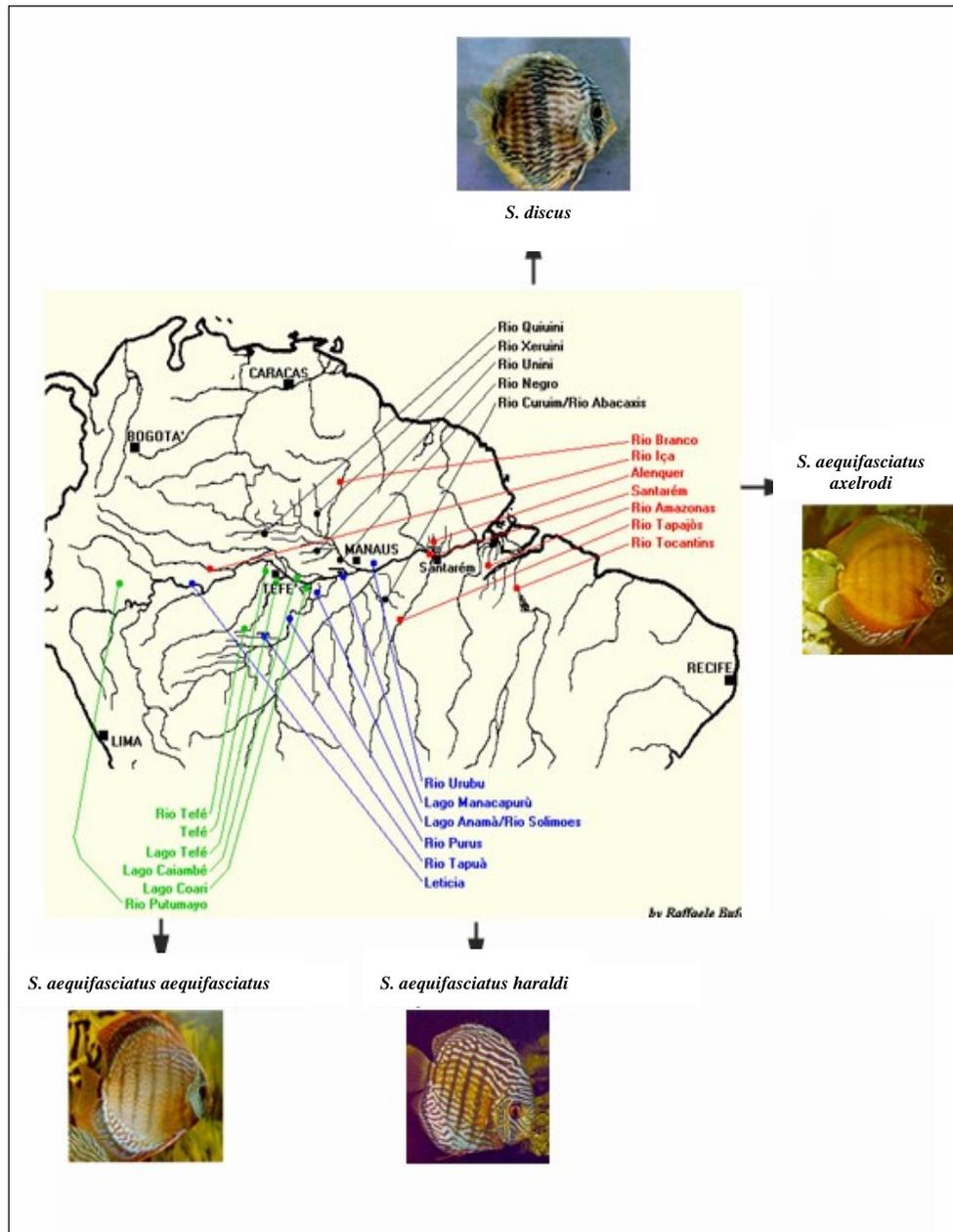


Figura 2 – Mapa de distribuição dos acarás-disco na bacia Amazônica (Fonte: www.ciklidi.com, acesso em 28/11/2005).

I.2.2 Aspectos citogenéticos dos acarás-disco

Desde 1979, a quantidade de espécies de ciclídeos que tem seu número diplóide determinado vem aumentando, passando de cerca de 60 espécies para 135 em 2003, sendo 106 espécies do Novo Mundo (Feldberg *et al.*, 2003). Mas este número ainda é muito pequeno, considerando-se que aproximadamente 1450 espécies desta família são conhecidas (Kullander, 2003).

Apesar do número diplóide na família Cichlidae variar de 32 a 60 cromossomos, sua evolução cariotípica é mais conservada do que divergente, uma vez que mais de 60% das espécies apresentam $2n=48$, com a maioria dos cromossomos acrocêntricos (Thompson, 1979; Kornfield, 1984; Feldberg *et al.*, 2003).

O número diplóide igual a 48 cromossomos acrocêntricos é considerado como ancestral para a família Cichlidae e também para a ordem Perciformes (Brum & Galetti, 1997). Além disso, as regiões organizadoras de nucléolo presentes no maior par cromossômico e heterocromatina constitutiva evidenciada na região pericentromérica de todos os cromossomos são consideradas características ancestrais para os ciclídeos (Feldberg & Bertollo, 1985; Feldberg *et al.*, 2003).

O gênero *Symphysodon* é considerado, com base em dados morfológicos e moleculares, um dos mais derivados dentro da família Cichlidae (Kullander, 1998; Farias *et al.*, 2001). Citogeneticamente, também há evidências de que as espécies deste gênero possuem o cariótipo mais derivado dentre os ciclídeos já analisados, por apresentarem um número diplóide alto ($2n=60$ cromossomos) e a maioria dos cromossomos do tipo meta-submetacêntricos. Além disso, verifica-se uma grande variabilidade cariotípica inter e intra populacional quanto à morfologia cromossômica (Tabela 1). Porém, marcadores citogenéticos que permitam diferenciar as duas espécies ainda não foram descritos.

Os mecanismos evolutivos envolvidos no processo de especiação deste gênero também não foram esclarecidos. Mesquita (2002) sugere que o número diplóide igual a 60 cromossomos originou-se a partir de um cariótipo ancestral com $2n=48$ cromossomos, por meio de uma sucessão de rearranjos ao longo do tempo, como inversões pericêntricas, seguidas de fissões e novas inversões pericêntricas, os quais poderiam ter originado os cromossomos do tipo M-SM encontrados em *Symphysodon*. Porém, Thompson (1976) já havia proposto que este cariótipo havia sido originado a partir de uma poliploidização de um cariótipo ancestral com 48 cromossomos, ocorrendo em seguida redução no número cromossômico por meio de fusões e deleções.

A análise de cromossomos meióticos, que ainda não foi realizada para o gênero, pode ser importante para esclarecer os tipos de rearranjos cromossômicos que vêm ocorrendo na diversificação cariotípica de *S. aequifasciatus* e *S. discus*.

Deste modo, estudos citogenéticos mais pormenorizados (análise de cromossomos meióticos e análises de cromossomos mitóticos submetidos às técnicas de colorações seqüenciais) foram propostos no presente trabalho para uma melhor compreensão da diversidade e de possíveis eventos relacionados à especiação, particularmente no que se refere a *S. aequifasciatus* e *S. discus*.

Tabela 1 – Fórmulas cariotípicas no gênero *Symphysodon* (2n=60)

Características cariotípicas encontradas para *S. aequifasciatus* e *S. discus*, sendo: M-SM = meta-submetacêntrico; ST-A = subtelo-acrocêntrico; mi = microcromossomos; (*) indica que o primeiro cromossomo do complemento é significativamente maior que seu homólogo; (**) indica que um cromossomo não tem homólogo

Espécie	Fórmula cromossômica	Procedência	Referência
<i>S. aequifasciatus</i>	44 M-SM +16 ST-A	Não mencionada	Ohno & Atkin (1966)
<i>S. aequifasciatus</i>	58 M-SM + 2 ST-A	Aquarista	Thompson (1979)
<i>S. aequifasciatus</i>	42 M-SM + 18 mi	Aquarista	Salgado <i>et al.</i> (1996b)
<i>S. aequifasciatus</i>	38 M-SM* + 4 ST-A + 18 mi	Aquarista	Salgado <i>et al.</i> (1996b)
<i>S. aequifasciatus</i>	52 M-SM + 4 ST-A + 4 mi	Rio Manacapuru - AM	Mesquita (2002)
<i>S. aequifasciatus</i>	48 M-SM + 8 ST-A + 4 mi	Rio Tefé - AM	Mesquita (2002); Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)
<i>S. aequifasciatus</i>	50 M-SM* + 6 ST-A + 4 mi	Rio Tefé - AM	Mesquita (2002); Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)
<i>S. aequifasciatus</i>	49 M-SM** + 7 ST-A** + 4 mi	Rio Tefé - AM	Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)
<i>S. aequifasciatus</i>	50 M-SM + 6 ST-A + 4 mi	Rio Tefé - AM	Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)
<i>S. aequifasciatus</i>	56 M-SM + 4 ST-A	Igarapé Croata - PA	Nascimento (2005)
<i>S. discus</i>	42 M-SM + 18 mi	Aquarista	Salgado <i>et al.</i> (1996a)
<i>S. discus</i>	46 M-SM + 14 mi	Aquarista	Salgado <i>et al.</i> (1996a)
<i>S. discus</i>	50 M-SM + 10 ST-A	Igarapé Boi-Boi - AM	Mesquita (2002)
<i>S. discus</i>	54 M-SM + 6 ST-A	Igarapé Boi-Boi - AM	Mesquita (2002)
<i>S. discus</i>	50 M-SM + 6 ST-A + 4 mi	Rio Madeira - AM	Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)
<i>S. discus</i>	56 M-SM + 4 ST-A	Rio Madeira - AM	Rocha-Oliveira <i>et al.</i> (2004)

I.4 – Objetivos

I.4.1 Gerais

Analisar os cromossomos mitóticos e compreender o comportamento cromossômico meiótico de *Symphysodon aequifasciatus* e *Symphysodon discus*, procurando detectar marcadores citogenéticos espécie/específicos e inferir sobre possíveis processos de evolução cariotípica ocorridos nessas espécies.

I.4.2 Específicos

a) Determinar o cariótipo das espécies *S. aequifasciatus* e *S. discus* provenientes dos arredores de Manacapuru (AM) e Novo Airão (AM), respectivamente.

b) Caracterizar o comportamento dos cromossomos dessas duas espécies na meiose;

c) Estabelecer o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (banda C) e das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) nos cromossomos mitóticos e meióticos, os quais serão utilizados como parâmetros adicionais na caracterização dessas espécies;

d) Verificar se a variabilidade cariotípica está relacionada com distintos padrões de coloração dos acarás-disco da população de Manacapuru;

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 – Obtenção de exemplares para estudo

Foram estudados, citogeneticamente, 22 exemplares de *Symphysodon aequifasciatus* (Figura 3a,b,c), sendo 10 machos e 12 fêmeas e 18 de *Symphysodon discus* (Figura 3d), sendo 10 machos e oito fêmeas, provenientes do rio Manacapuru-Manacapuru- AM (3°17'59"S, 60°44'39"O) e rio Negro- Novo Airão- AM (2°37'17" S , 60°56'39"O), respectivamente (Figura 4).

Os peixes foram coletados com a devida permissão do IBAMA (autorização nº. 011/2005, BSB 02 de fevereiro de 2005), utilizando como apetrechos de pesca redinhas e puçás. Para tanto, galhadas foram montadas nos rios e ficaram submersas por uma semana, para que os peixes as colonizassem. Após este prazo, estas foram cercadas com redinha, os galhos foram retirados da água e efetuou-se o arrasto da rede, evitando que os peixes escapassem. Os peixes foram acondicionados em sacos plásticos contendo água e oxigênio, e foram transportados para o Laboratório de Genética de Peixes – CPBA – INPA (AM), onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção das preparações cromossômicas. Os indivíduos de *S. aequifasciatus* foram cuidadosamente separados pela sua coloração em amarelados com nove listras verticais bem evidentes (Figura 3a); amarelados com listras verticais menos evidentes, com presença de listras horizontais azuis ao longo do corpo e nadadeiras pélvicas, anal e dorsal avermelhadas (Figura 3b); coloração mais escura e com listras/ manchas azuis pelo corpo (Figura 3c). Os exemplares de *S. discus* apresentaram um único padrão de colorido: barras verticais evidentes na região dos olhos, região mediana do corpo e base da nadadeira caudal, com listras horizontais azuis (Figura 3d). Todos os indivíduos foram fotografados, identificados, fixados e depositados na Coleção Ictiológica do Laboratório de Citogenética – INPA, com testemunhos na Coleção de Peixes do INPA

(tombos INPA 25497 e INPA 25498). O material obtido foi analisado no Laboratório de Genética de Peixes do INPA (AM) e no Laboratório de Citogenética, da UNESP-Rio Claro (SP).

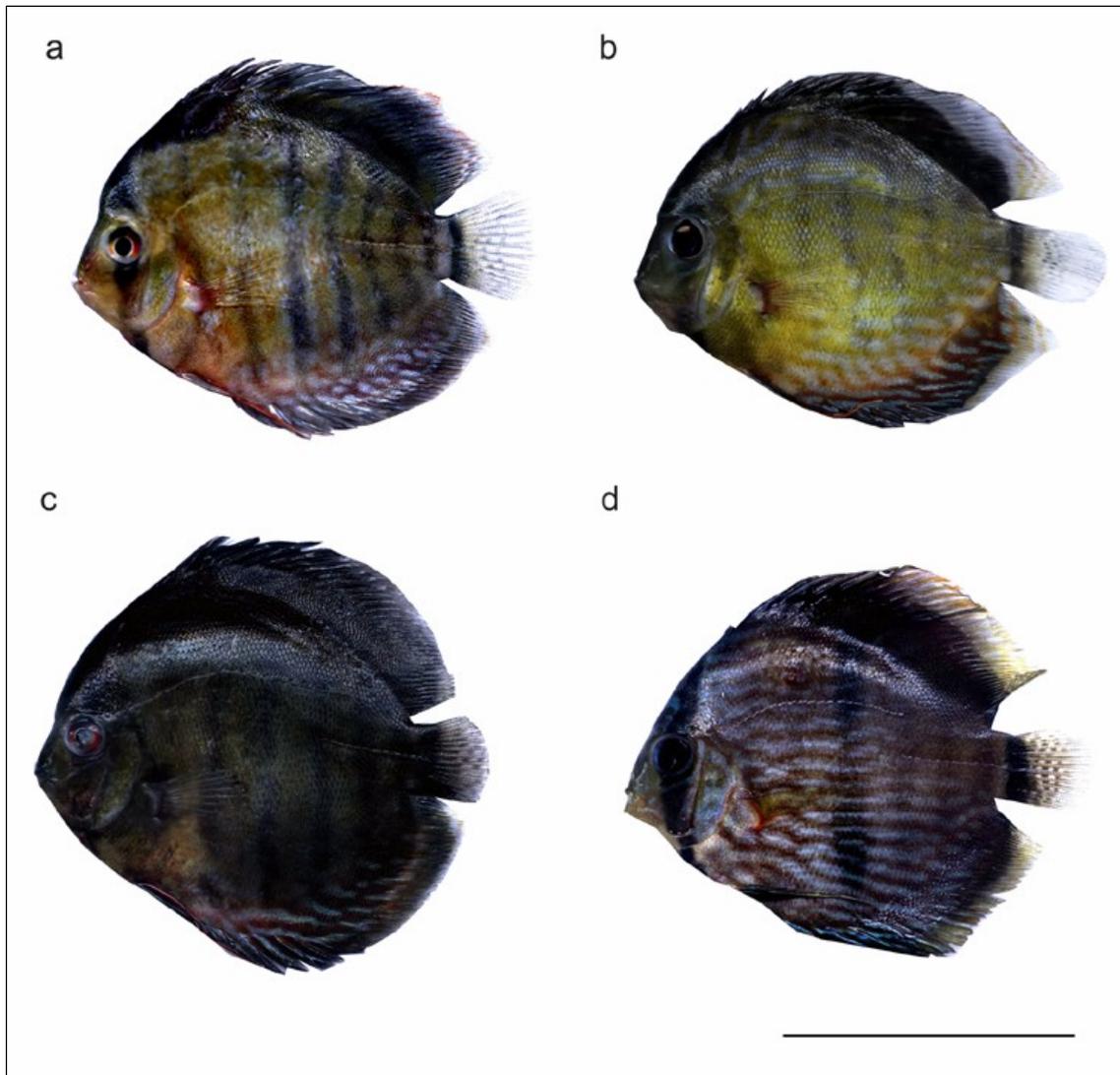


Figura 3 – Exemplos de *Symphysodon* spp.

- a) *S. aequifasciatus* amarelado, com nove listras verticais bem evidentes; b) *S. aequifasciatus* amarelado, com listras verticais menos evidentes, presença de listras horizontais azuis ao longo do corpo e nadadeiras avermelhadas; c) *S. aequifasciatus* com coloração mais escura e listras/ manchas azuis pelo corpo; d) *S. discus* com três barras verticais evidentes (Barra= 5cm).

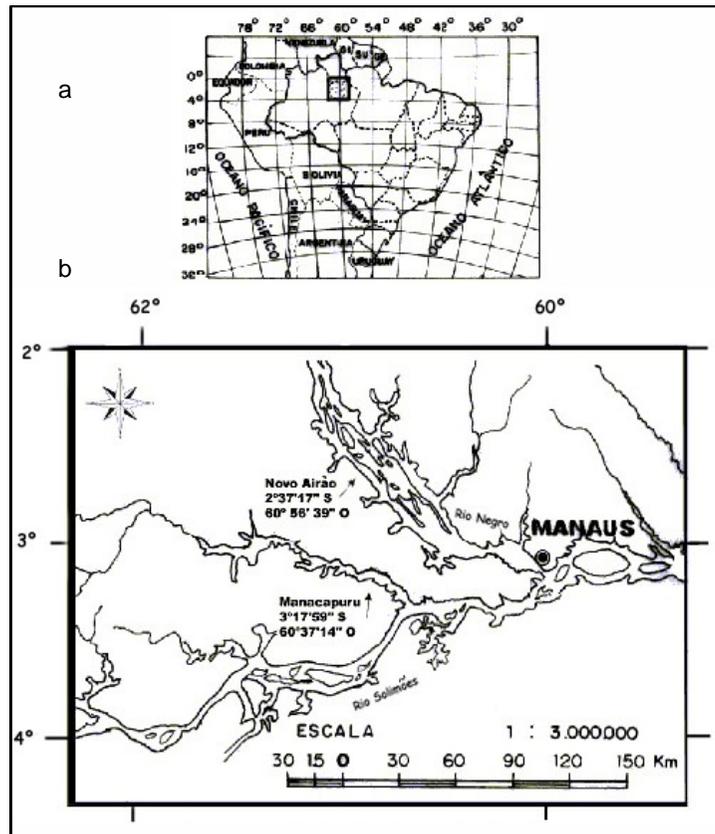


Figura 4 - Mapa dos locais de coleta

a) Mapa da América do Sul evidenciando o Brasil, estando em destaque a área onde foram efetuadas as coletas; b) Mapa da região amazônica central indicando os pontos de coleta de *Symphysodon aequifasciatus* (rio Manacapuru – Manacapuru - AM) e *Symphysodon discus* (rio Negro - Novo Airão-AM) (Fonte: Laboratório de Citogenética de Peixes – INPA)

II.2 – Métodos citogenéticos

II.2.1 Indução de mitoses

Para se obter um maior número de células em metáfase, foi utilizada a técnica para indução de mitoses, descrita por Oliveira (1987), a qual emprega injeção de solução de fermento biológico nos espécimes.

A solução de fermento biológico foi preparada com uso de 0,3g de fermento biológico comercial, 0,3g de açúcar e 10ml de água destilada, tendo sido mantida em estufa (46°C) por um período de 15-20 minutos, e posteriormente injetada intraperitonealmente na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal.

Os peixes submetidos ao tratamento com solução de fermento biológico foram colocados em aquários bem aerados por 24 horas.

II.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção das preparações cromossômicas mitóticas, foi utilizada a porção anterior e/ou posterior do rim, que é o órgão hematopoiético dos peixes, segundo a técnica de “air drying” descrita por Bertollo *et al.* (1978), com algumas modificações.

Os acarás-disco foram anestesiados em água contendo gelo, sendo sacrificados em seguida. O rim foi retirado e lavado em pequenos recipientes de vidro contendo solução hipotônica de KCl a 0,075M, sendo transferido imediatamente para outro recipiente de vidro com cerca de 10ml da solução hipotônica, onde foi dissociado com pinças de dissecação e seringa desprovida de agulha, que serviu para aspirar e expirar suavemente a suspensão para melhor separação dos blocos celulares. Uma solução aquosa de colchicina a 0,0125% foi adicionada *in vitro*, na proporção de 0,5ml para 15ml de KCl. A suspensão celular obtida foi mantida em estufa a 37°C por 30 minutos. Após este tempo, o material foi ressuspenso cuidadosamente com o auxílio de uma seringa sem agulha e

transferido para um tubo de centrifuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur. O fixador Carnoy foi preparado na proporção 3:1 (metanol: ácido acético) e 0,3ml foram adicionados à suspensão celular, que foi centrifugada durante 10 minutos a 900 rpm, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. Novamente o material foi ressuspensionado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 8ml de fixador Carnoy foram adicionados e a suspensão foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 900 rpm, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e a eliminação do sobrenadante, 1,5ml de fixador foram adicionados e o material ressuspensionado com cuidado. Essa suspensão celular foi então estocada em tubo “eppendorf” e mantida em freezer para posterior utilização.

II.2.3 Preparação das lâminas de cromossomos mitóticos

Para a preparação das lâminas de cromossomos mitóticos, as mesmas foram lavadas, secas ao ar e posteriormente imersas em água destilada a 50°C, em banho-maria. Após cinco minutos, as lâminas foram retiradas da água de forma a manter uma película de água sobre a sua superfície, na qual foi gotejada a suspensão celular em diferentes regiões. As lâminas foram secas diretamente ao ar, coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 10 minutos, lavadas em água destilada, secas ao ar e analisadas ao microscópio óptico.

II.2.4 Obtenção de cromossomos meióticos de machos

Para a obtenção das preparações cromossômicas meióticas foram utilizadas gônadas masculinas, empregando-se a técnica descrita por Kligerman & Bloom (1977) adaptada para peixes por Bertollo *et al.* (1978), com algumas modificações.

Para caracterização das diferentes fases meióticas, as gônadas não foram tratadas com solução de colchicina. Após o sacrifício do peixe, os testículos foram

seccionados em fragmentos bem pequenos e colocados em solução hipotônica de KCl a 0,075M por 30 minutos. Logo após, o material foi transferido para uma cubeta contendo fixador Carnoy (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético) recém-preparado, por 20 minutos. Após este período o fixador foi descartado, sendo este processo de fixação repetido por mais duas vezes. Em seguida, o material foi guardado em refrigerador a 4°C, em tubos tipo “eppendorf”, com fixador Carnoy para ser processado posteriormente, ou então fragmentos foram retirados do fixador e secos em papel de filtro para a continuação da técnica. Após o fragmento gonadal estar seco, este foi colocado sobre uma lâmina limpa e macerado em 1ml de ácido acético 50%, com o auxílio de um bastão de vidro. A lâmina foi seca em uma placa aquecedora a 40°C, posteriormente corada com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 10 minutos, em seguida lavada em água de torneira e seca diretamente ao ar.

II.2.5 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos nos cromossomos mitóticos e meióticos

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), foi utilizada a técnica descrita por Howell & Black (1980), que consistiu em pingar sobre a preparação cromossômica 1ml de uma solução coloidal, obtida com 1g de gelatina comercial sem sabor, em 50ml de água acrescida de 0,5ml de ácido fórmico. Em seguida, foram adicionados sobre a solução coloidal 2ml de solução aquosa de AgNO₃ (nitrato de prata) a 50%, agitando levemente a lâmina, que foi coberta com uma lamínula. A lâmina foi colocada em câmara úmida, em banho-maria a 60°C, por um período de 3 a 8 minutos, até atingir uma coloração marrom dourada, sendo então lavada em água destilada, permitindo que a lamínula fosse retirada naturalmente pela própria água. As lâminas foram secas diretamente ao ar, coradas com Giemsa 5% em

tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 1 minuto, lavadas em água de torneira e secas novamente ao ar.

II.2.6 Detecção da heterocromatina constitutiva nos cromossomos mitóticos e meióticos

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica de banda C descrita por Sumner (1972), com algumas modificações.

As preparações cromossômicas foram tratadas durante 2 minutos com HCl 0,2N a 46°C, lavadas em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Posteriormente, as preparações cromossômicas mitóticas foram incubadas a 46°C, em solução de hidróxido de bário a 5%, filtrada e recém preparada, por 1 minuto e 30 segundos, e as meióticas por 4 minutos e 30 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo-se rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N (46°C), sendo posteriormente lavada em água destilada. Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trisódico 0,03M, pH 6,8), em banho-maria a 60°C, por um período de 15 minutos, sendo posteriormente secas ao ar, coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 20 minutos, lavadas em água de torneira e secas novamente ao ar.

II.2.7 Análises das preparações mitóticas e meióticas

As preparações mitóticas foram analisadas em microscópio óptico comum com objetiva de imersão e as células selecionadas foram fotografadas em microscópio Olympus BH-2, com adaptação do sistema PM-6 para fotografia. Os negativos foram obtidos em filme Agfa ajustado para ASA 25, com revelação processada em revelador Dektol (Kodak) diluído em água, na proporção de 4:1, em temperatura ambiente, por 7

minutos, e fixação em fixador Kodak durante 13 minutos. As imagens selecionadas foram posteriormente copiadas em papel Kodabrome Print RC F3 (Kodak).

A montagem dos cariótipos foi feita a partir de cromossomos metafásicos mitóticos, os quais foram recortados, tentativamente emparelhados, medidos e colocados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a proposta de Levan *et al.* (1964). Devido à dificuldade de emparelhamento cromossômico, o qual é peculiar nos ciclídeos, uma vez que estes apresentam tamanho e morfologia cromossômica similar, os cromossomos foram agrupados segundo Thompson (1979) e Mesquita (2002), sendo consideradas três categorias: meta-submetacêntricos, subtelo-acrocêntricos e microcromossomos.

Para interpretação da meiose, foram consideradas as seguintes fases: leptóteno/zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I e metáfase II, dando maior ênfase ao diplóteno, diacinese, metáfase I e metáfase II, as quais são, em geral, mais resolutivas na determinação de rearranjos cromossômicos (John, 1990). Estas fases foram analisadas e fotografadas, sendo os negativos obtidos da mesma forma que aqueles das metáfases mitóticas.

III - RESULTADOS

III. 1 – Cromossomos mitóticos

III.1.1 *Symphysodon aequifasciatus*

Dentre os 22 exemplares de *S. aequifasciatus* (10 machos e 12 fêmeas), coletados no rio Manacapuru, cinco indivíduos eram amarelados com nove listras verticais bem evidentes (Figura 3a), 14 indivíduos eram amarelados com listras verticais menos evidentes e presença de listras horizontais azuis ao longo do corpo, além de nadadeiras pélvicas, anal e dorsal avermelhada (Figura 3b) e três indivíduos apresentaram coloração mais escura e com listras/manchas azuis pelo corpo (Figura 3c).

Todos os indivíduos desta espécie apresentaram $2n=60$ cromossomos, sendo o cariótipo constituído por 23 pares de cromossomos meta-submetacêntricos e 7 pares de microcromossomos (Figura 5a). Foram considerados microcromossomos os últimos sete pares cromossômicos, que mostraram tamanho médio variando entre 0,5 e 1,5 μm , e cuja morfologia cromossômica não ficou evidente em todas as metáfases. Porém, na amostra analisada, verificou-se que os pares 4, 11 e 21 são heteromórficos entre os indivíduos e também entre as células de um mesmo indivíduo, podendo ser encontrado ambos os homólogos dos pares na condição M-SM ou ST-A, ou ainda, um cromossomo M-SM e outro ST-A. Entretanto, esta variabilidade cromossômica não está relacionada com a variabilidade de coloração dos espécimes e nem com o sexo. Heteromorfismo cromossômico sexual não foi detectado nesta espécie.

Com o emprego da técnica de obtenção de bandas C, todas as metáfases mitóticas analisadas evidenciaram a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento, com exceção dos pares 25 e 27 que não exibiram marcações ao longo do comprimento cromossômico (Figura

5b). Em alguns pares cromossômicos, esta heterocromatina constitutiva estende-se ao longo dos braços, como no caso do braço longo do par 4, do braço curto dos pares 8 a 14 e 16 a 22, e ambos os braços do par 15 e de quase todos os microcromossomos, os quais são inteiramente heterocromáticos. Quando os cromossomos dos pares 4, 11 e 21 apresentavam-se na condição ST-A em coloração convencional, após o bandamento C eles evidenciaram uma marcação pericentromérica e um braço adicional totalmente heterocromático, sendo no 4º par o braço longo e nos pares 11 e 21 os braços curtos, o que mostrou que estes cromossomos possuem, na realidade, uma morfologia M-SM.

A análise das preparações cromossômicas submetidas à coloração seqüencial Giemsa/impregnação pelo nitrato de prata possibilitou a identificação precisa dos cromossomos portadores das RONS bem como da localização destas regiões. Foi verificado que *S. aequifasciatus* possui um sistema de RONS múltiplas, isto é, existem sítios de RONS presentes em diversos pares cromossômicos do cariótipo. As RONS ocorrem no braço longo do par 4 e nos braços curtos dos pares 5, 11 e 21. Entretanto, entre as células de indivíduos diferentes, as RONS variaram quanto à sua localização no cromossomo, sendo que em algumas metáfases ocupavam somente a região terminal do braço cromossômico e em outras metáfases, estavam distribuídas ao longo de todo o braço curto ou longo. Apesar de *S. aequifasciatus* possuir quatro pares cromossômicos portadores de RONS, cada indivíduo apresentou no máximo duas RONS, sobre cromossomos homólogos ou não (Figura 6). Todas estas variações no padrão das RONS não estão relacionadas à diferença de coloração dos espécimes e nem com o sexo.

O emprego da técnica de coloração seqüencial Giemsa/ impregnação pelo íon prata permitiu elucidar a origem do heteromorfismo morfológico encontrado nos pares 4, 11 e 21 das metáfases mitóticas inicialmente submetidas somente à coloração convencional. O heteromorfismo presente nestes pares é aparente, sendo uma

conseqüência da condensação diferencial da cromatina que contém as RONS, a qual pode ser evidenciada pelo Giemsa, dependendo do seu grau de condensação (Figura 7). Corroborando esses dados, observou-se também que as RONS são coincidentes com as regiões banda C positivas no braço longo do par 4 e no braço curto dos pares 11 e 21.

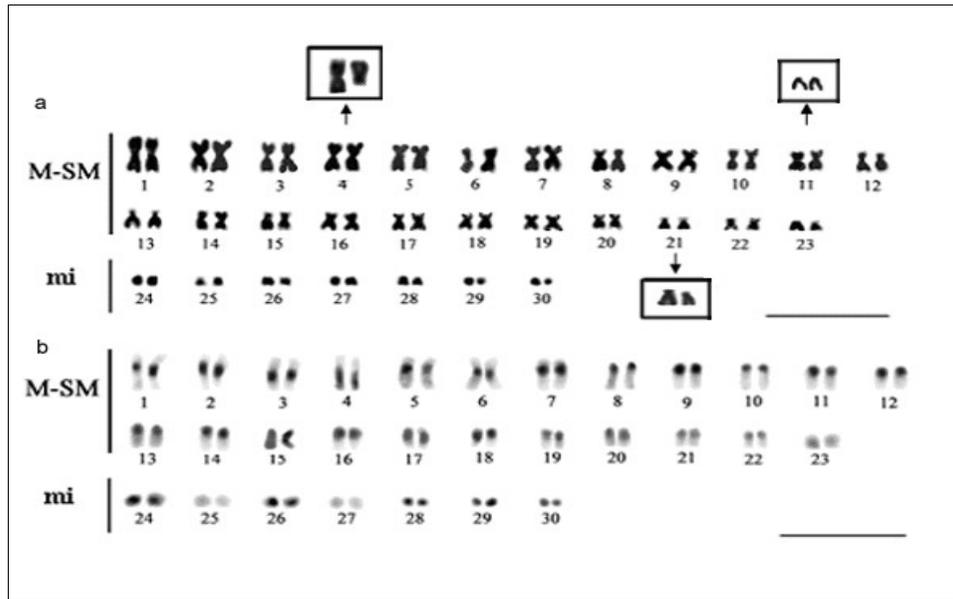


Figura 5 – Cariótipos de *Symphysodon aequifasciatus* de Manacapuru (AM)
 a) Coloração convencional com Giemsa, evidenciando $2n=60$ cromossomos, sendo 46M-SM + 14 microcromossomos. Em destaque os pares heteromórficos 4, 11 e 21, responsáveis pela variação na fórmula cromossômica dos indivíduos analisados; b) Padrão de banda C, mostrando marcações na região pericentromérica de quase todos os cromossomos, com exceção dos pares 25 e 27. O par 15 e a maioria dos microcromossomos são totalmente heterocromáticos (Barra= 10 μ m).

Sítios Ag-RON	Número de Indivíduos	
	♂	♀
 4	3	0
 4	1	2
 5	1	1
 11	0	1
 11	1	0
 21	4	6
 21	0	1
 5	0	1
 21		

Figura 6 – Padrão das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) em *Symphysodon aequifasciatus* de Manacapuru (AM)

Quadro evidenciando os cromossomos portadores das RONs (4, 5, 11 e 21) e suas variações intra populacionais quanto à atividade, detectadas em metáfases mitóticas somáticas impregnadas pelo íon prata (Barra= 10µm).

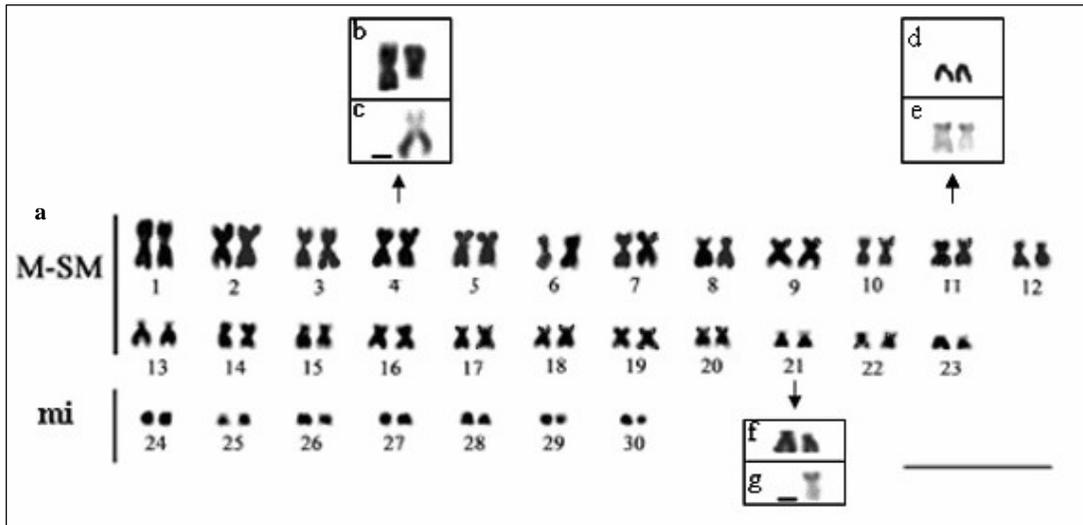


Figura 7 – Variações na fórmula cromossômica de *Symphysodon aequifasciatus* de Manacapuru (AM) e padrão de RONS

a) Cariótipo em coloração convencional, com 46M-SM + 14 microcromossomos; b) 4^o par heteromórfico; c) Região organizadora de nucléolo no braço longo de um dos cromossomos do 4^o par; d) 11^o par ST-A; e) Região organizadora de nucléolo nos braços curtos do par 11; f) 21^o par heteromórfico; g) Região organizadora de nucléolo no braço curto de um dos homólogos do par 21. Note que o braço longo do par 4 (b,c) e os braços curtos dos pares 11 (d,e) e 21 (f,g) não foram corados pelo Giemsa, por serem portadores de uma constrição secundária (Barra= 10µm).

III.1.2 *Symphysodon discus*

Os 18 indivíduos de *S. discus* (10 machos e oito fêmeas), provenientes das proximidades de Novo Airão (AM), apresentaram o mesmo padrão de coloração: três linhas verticais mais evidentes e coloração de fundo marrom (Figura 3d).

O número diplóide encontrado para esta espécie também foi igual a 60 cromossomos, sendo 25 pares de cromossomos meta-submetacêntricos e 5 pares subteloacrocêntricos (Figura 8a). Apesar de seis pares apresentarem tamanho reduzido em relação aos demais cromossomos do complemento, a sua morfologia foi evidente em todas as metáfases, sendo estes, portanto, não considerados microcromossomos. Cromossomos com características diferenciais quanto ao tamanho e morfologia, que poderiam indicar cromossomos sexuais, não foram encontrados nos exemplares machos e fêmeas analisados.

A heterocromatina constitutiva foi evidenciada na região pericentromérica de quase todos os cromossomos do complemento, estando ausente nos pares 16, 17, 24, 25, 27, 28, 29 e 30. Em alguns cromossomos, os blocos heterocromáticos estendem-se às regiões proximais de ambos os braços, e em outros cromossomos, como aqueles dos pares 5, 7, 9, 10, 11, 13, 18, 19 e 20, a heterocromatina estende-se ao longo de todo o braço curto. Além disso, o 2º par cromossômico apresentou uma maior quantidade de heterocromatina pericentromérica, se comparado com os outros pares do complemento. Nenhum cromossomo apresentou-se inteiramente heterocromático (Figura 8b).

A coloração seqüencial Giemsa/impregnação pelo íon prata, evidencia que as RONS ocorrem na região terminal do braço curto dos pares 17 e 23 (Figura 9). Nesta espécie, também ocorrem RONS múltiplas, pois existe mais de um par cromossômico portador dessa região; contudo só foram visualizadas, no máximo, duas RONS, podendo estas serem detectadas em ambos os homólogos de um par cromossômico ou em cromossomos não homólogos.

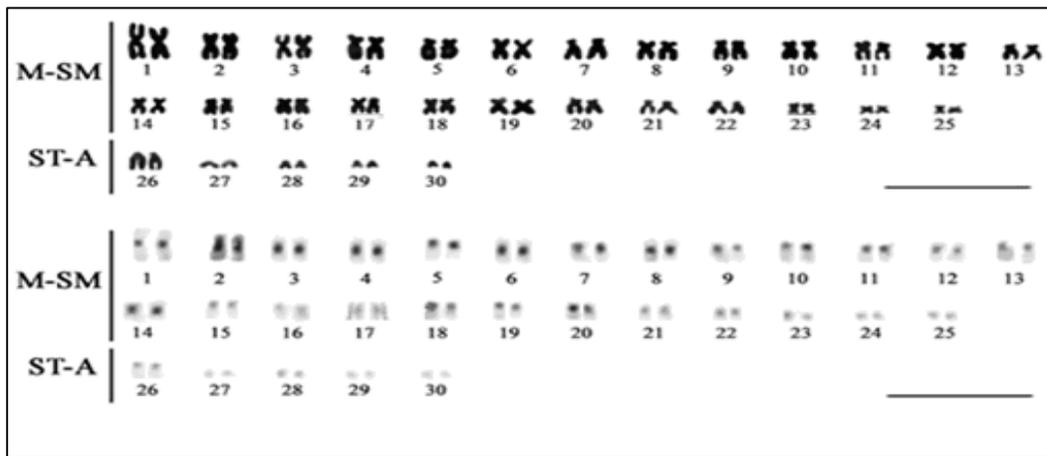


Figura 8 - Cariótipos de *Symphysodon discus* de Novo Airão (AM)
 a) Corado com Giemsa, evidenciando número diplóide igual a 60 cromossomos (50 M-SM + 10 ST-A); b) Padrão de banda C, mostrando marcações na região pericentromérica de quase todos os cromossomos. Note o bloco proeminente no par 2 (Barra= 10 μ m).

Sítios Ag-RON	Número de Indivíduos	
	♂	♀
 17	4	1
 17	1	2
 23	2	0
 23	0	1
 17 23	3	4

Figura 9 – Regiões organizadoras de nucléolo de *Symphysodon discus* de Novo Airão (AM)
 Quadro evidenciando os cromossomos portadores das RONS (17 e 23) e suas variações intra populacionais quanto a atividade, verificadas em metáfases mitóticas somáticas impregnadas pelo íon prata (Barra= 10µm).

III.2 – Cromossomos meióticos

III.2.1 *Symphysodon aequifasciatus*

As metáfases espermatogoniais de 10 indivíduos de *S. aequifasciatus* revelaram $2n=60$ cromossomos, concordando com o número diplóide encontrado em metáfases somáticas obtidas das células do rim (Figura 10a).

Não foi possível identificar nenhuma marcação heteropicnótica positiva em células testiculares interfásicas, bem como nas células profásicas I iniciais, que pudessem indicar a ocorrência de cromatina sexual (Figura 10b,c).

Durante o paquíteno, não foi possível estabelecer o número de bivalentes devido às sobreposições cromossômicas, ocasionadas pelo alto número de cromossomos da espécie o que dificulta o espalhamento dos mesmos (Figura 10d).

Todas as células diplotênicas apresentaram uma cadeia cromossômica multivalente em anel e 20 bivalentes; a maioria dos bivalentes exibiu dois quiasmas terminais (Figura 10e).

A fase de diacinese foi caracterizada pela presença de uma cadeia cromossômica linear (Figura 10f); entretanto, o número de elementos cromossômicos envolvidos na cadeia e daqueles representativos de bivalentes não pôde ser estabelecido, devido à terminalização precoce de emparelhamento e/ou quiasmas. Desta forma, a cadeia cromossômica linear mostrou um número variável de constituintes entre as células de um mesmo indivíduo e os demais cromossomos presentes nesta fase não puderam ser determinados com segurança se eram representativos de bivalentes ou univalentes. Porém, poucos bivalentes apresentaram tamanho muito reduzindo, o que pode estar indicando que a maioria dos microcromossomos encontra-se na cadeia.

A metáfase I caracterizou-se pela disposição em *zigue-zague* da cadeia cromossômica, indicando uma orientação alternada dos centrômeros homólogos (Figura

10g). A anáfase I deve ter apresentado uma segregação regular, visto que 30 cromossomos foram encontrados em todas as metáfases II (Figura 10h).

Nas metáfases espermatogoniais, a heterocromatina constitutiva foi evidenciada na porção pericentromérica de quase todos os cromossomos do complemento e, adicionalmente, ao longo dos braços de alguns cromossomos (Figura 11a). O padrão de bandas C obtido nestas células parece ser coincidente com aquele detectado nas células somáticas do rim.

No diplóteno, 20 marcações heterocromáticas foram encontradas nos elementos da cadeia cromossômica, confirmando que esta é formada por 20 cromossomos, não sendo, porém, possível a identificação precisa dos mesmos (Figura 11b). Além disso, blocos heterocromáticos também foram observados nos bivalentes e um bivalente totalmente heterocromático foi encontrado em todos os diplótenos analisados.

Nas células em diacinese, não se obteve bandas C resolutivas, devido ao alto grau de condensação cromossômica, impossibilitando a determinação correta do número de cromossomos na cadeia linear, de bivalentes e de univalentes (Figura 11c).

Células testiculares impregnadas por nitrato de prata evidenciaram marcações do material nucleolar nos núcleos interfásicos e nas células profásicas I (Figura 12). Os núcleos interfásicos mostraram um número variável de nucléolos marcados, tendo sido observado um número mínimo de um e um máximo de seis (Figura 12a). Na diacinese, até quatro RONS fortemente marcadas foram observadas, sendo uma localizada na cadeia cromossômica e as demais sobre bivalentes de tamanho grande (Figura 12b).

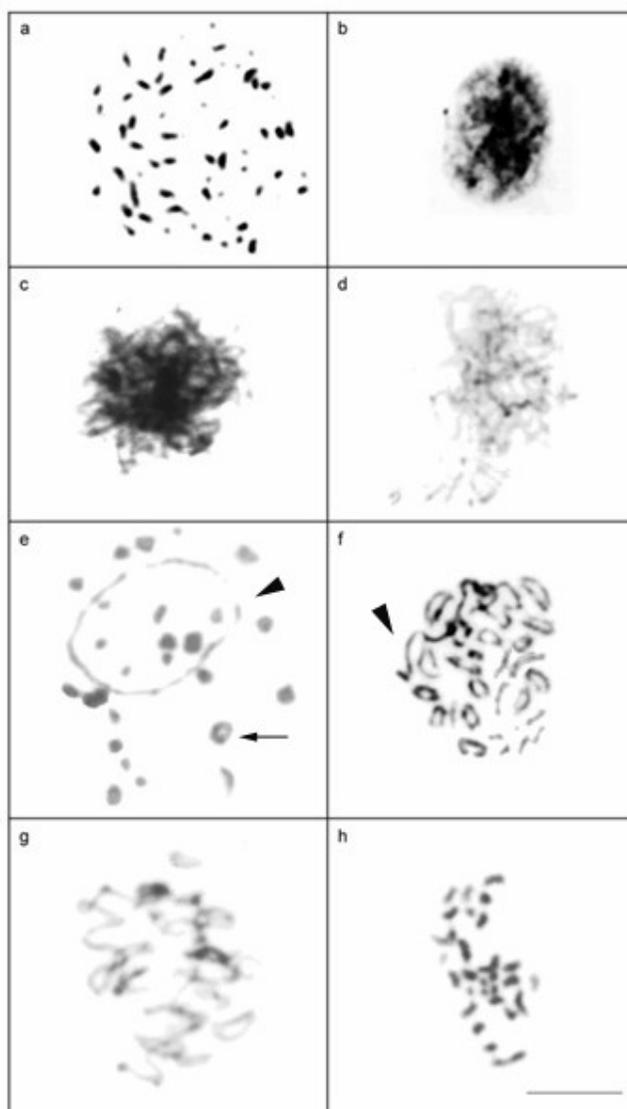


Figura 10 – Células testiculares de *Symphysodon aequifasciatus* em coloração convencional

a) Metáfase espermatogonial, evidenciando $2n=60$ cromossomos; b) Núcleo interfásico; c) Leptóteno; d) Paquíteno; e) Diplóteno, com uma cadeia cromossômica em anel (cabeça de seta) e 20 bivalentes (seta), sendo que alguns apresentam terminalização precoce de quiasma; f) Diacinese, com uma cadeia cromossômica linear (cabeça de seta) e diversos elementos cromossômicos; g) Metáfase I, evidenciando a orientação em *zigue-zague* dos cromossomos associados à cadeia; h) Metáfase II, com $n=30$ cromossomos (Barra= $10\mu\text{m}$).

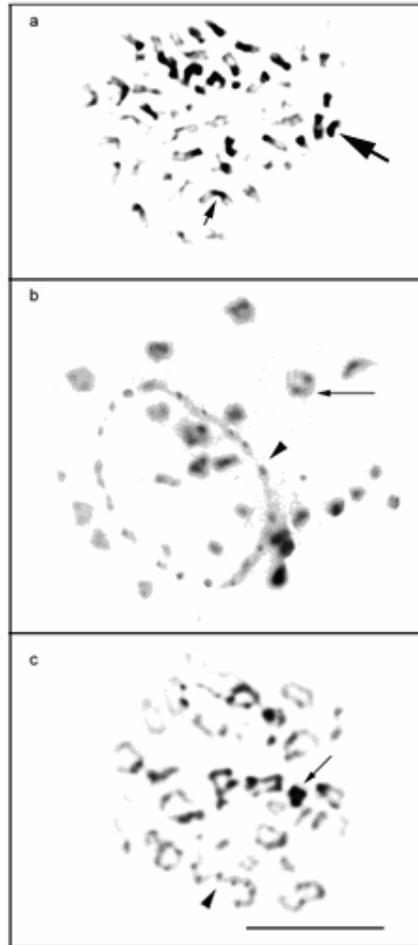


Figura 11 - Células testiculares de *Symphysodon aequifasciatus* submetidas à técnica de banda C

a) Metáfase espermatogonial, com $2n=60$ cromossomos, evidenciando heterocromatina constitutiva na região pericentromérica (seta pequena) da maioria dos cromossomos e ao longo dos braços (seta grande) de alguns cromossomos; b) Diplóteno, com 20 cromossomos na cadeia em anel e 20 bivalentes, mostrando marcações de heterocromatina na cadeia cromossômica (cabeça de seta) e nos bivalentes (seta); c) Diacinese, evidenciando marcações heterocromáticas nos elementos cromossômicos da cadeia (cabeça de seta) e um bivalente totalmente heterocromático (seta) (Barra= $10\mu\text{m}$).

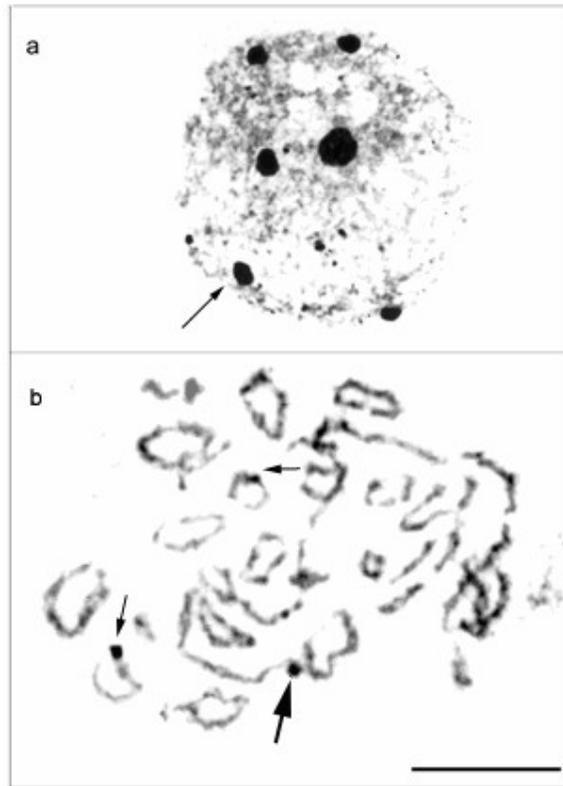


Figura 12 - Células testiculares de *Symphysodon aequifasciatus* impregnadas pelo íon prata
a) Núcleo interfásico, com seis nucléolos bem evidentes (seta); b) Diacinese, evidenciando RON na cadeia cromossômica (seta grande) e em dois bivalentes (setas pequenas) (Barra= 10 μ m).

III.2.2 *Symphysodon discus*

A análise das metáfases espermatogoniais de 10 indivíduos de *S. discus* evidenciou $2n=60$ cromossomos, predominantemente do tipo meta-submetacêntricos, corroborando o número diplóide e a morfologia cromossômica encontrados nas metáfases somáticas das células do rim (Figura 13a).

Os núcleos interfásicos das células testiculares apresentaram cromatina uniformemente distribuída e corada (Figura 13b); os núcleos leptotênicos, zigotênicos e paquitênicos evidenciaram alguns blocos de cromatina mais intensamente corados, os quais provavelmente correspondem às regiões heterocromáticas (Figura 13c,d). Contudo, nenhum destes blocos mostrou características marcantes e que talvez pudessem ser relacionadas à cromatina sexual, como, por exemplo, presença constante na maioria das células, bem como configuração e tamanho similares em diferentes células.

No diplóteno, 30 bivalentes foram identificados, sendo que a maioria mostrou dois quiasmas terminais (Figura 13e). Nas células em diacinese, bivalentes típicos também foram encontrados; mas, alguns exibiram separação precoce (Figura 13f). Nas metáfases I, os bivalentes apresentaram-se tipicamente dispostos na região mediana da célula e regularmente orientados (Figura 13g). Células metafásicas II evidenciaram 30 cromossomos (Figura 13h), indicando a segregação regular de todos os cromossomos na anáfase I.

Nas células testiculares pequenos blocos de heterocromatina constitutiva ocorrem na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, nas metáfases espermatogoniais (Figura 14a), e da maioria dos bivalentes nas células diplotênicas e diacinéticas (Figura 14b,c).

As células testiculares interfásicas exibiram até quatro nucléolos fortemente impregnados pela prata (Figura 15a). Em algumas células profásicas I (Figura 15b), marcações das RONS foram observadas em um ou dois bivalentes, os quais devem corresponder aos pares 17 e 23, detectados como portadores de RONS nas células metafásicas do rim.

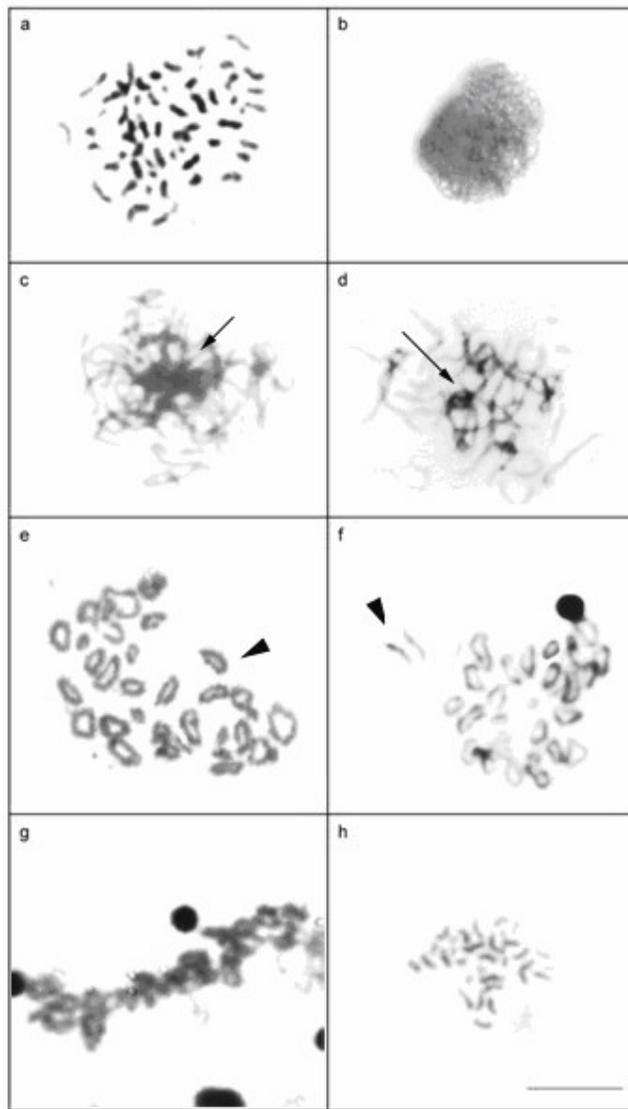


Figura 13 - Células testiculares de *Symphysodon discus* em coloração convencional
 a) Metáfase espermatogonial, com $2n=60$ cromossomos; b) Núcleo interfásico; c) Zigóteno, evidenciando a presença de um grande bloco intensamente corado (seta); d) Paquíteno, mostrando regiões cromatínicas heteropícnóticas positivas (seta); e) Diplóteno, com 30 bivalentes, mostrando que a maioria dos bivalentes possui dois quiasmas (cabeça de seta); f) Diacinese, exibindo a separação precoce dos elementos cromossômicos de um bivalente (cabeça de seta); g) Metáfase I, com bivalentes alinhados na placa equatorial; h) Metáfase II, com $n=30$ cromossomos (Barra= $10\mu\text{m}$).

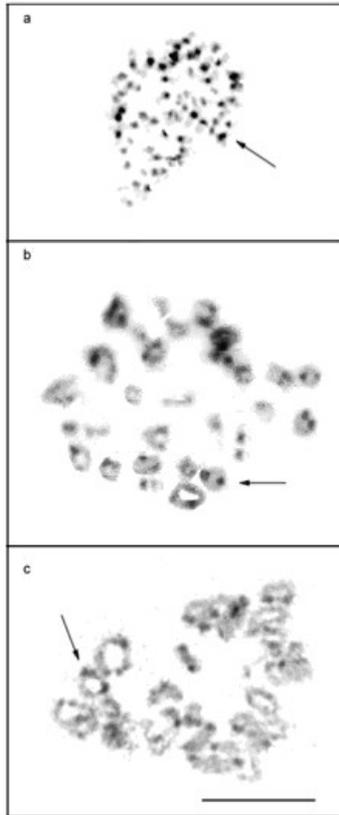


Figura 14 - Padrão de bandas C em células testiculares de *Symphysodon discus*
a) Metáfase espermatogonial, com $2n=60$ cromossomos, mostrando pequenos blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica da maioria dos cromossomos (seta); b-c) Diplóteno e diacinese, respectivamente, evidenciando bivalentes com marcações da heterocromatina na região pericentromérica (setas) (Barra= $10\mu\text{m}$).

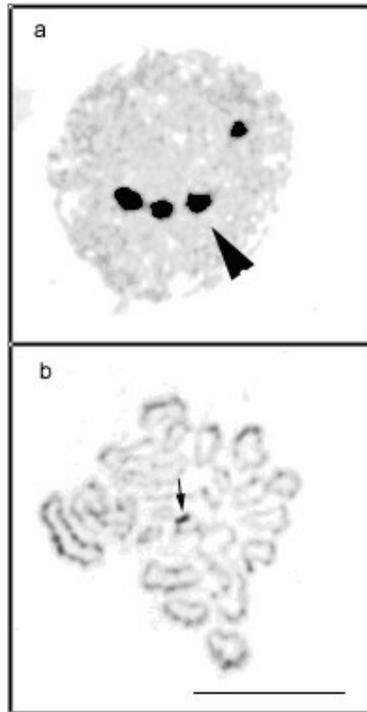


Figura 15 - Células testiculares de *Symphysodon discus* impregnadas pelo íon prata
a) Núcleo interfásico, exibindo quatro nucléolos fortemente marcados (cabeça de seta); b) Diacinese, mostrando marcação da RON em um bivalente de tamanho pequeno (seta) (Barra= 10 μ m).

IV – DISCUSSÃO

IV.1 - Variabilidade cariotípica no gênero *Symphysodon*

Desde os primeiros estudos sobre a citogenética do acará-disco, 10 fórmulas cariotípicas foram descritas para *S. aequifasciatus* e seis para *S. discus* (Tabela 1). Considerando os dados obtidos neste trabalho e as informações bibliográficas existentes para *S. aequifasciatus* e *S. discus*, pode-se propor que grande parte da variabilidade cariotípica encontrada nestas espécies é devido a quatro fatores:

1º) Presença de um possível complexo de espécies, que estariam relacionadas a diferentes sub-bacias hidrográficas da Amazônia. Farias (2003), ao analisar a região controle do DNA mitocondrial de acarás-disco de 15 regiões diferentes da bacia Amazônica, sugeriu a existência de um complexo de espécies intrinsecamente relacionado com as bacias às quais pertencem. Hrbek *et al.* (2005) ao efetuar a caracterização molecular de *Symphysodon* spp, utilizando dados de DNA mitocondrial e de DNA microssatélite, verificou três quebras filogeográficas na Amazônia, não concordando assim com a atual classificação das espécies, mas correspondendo à divisão entre acarás-disco verde (*S. aequifasciatus aequifasciatus*), azul (*S. aequifasciatus haraldi*) e marrom (*S. aequifasciatus axelrodi*). Talvez a existência deste complexo de espécies seja o motivo da ocorrência de diferentes fórmulas cromossômicas em *S. aequifasciatus*, coletados em diferentes localidades no Amazonas e no Pará, além daquelas fórmulas cromossômicas de exemplares cuja procedência não é bem conhecida (Tabela 1). Porém, não existem dados citogenéticos suficientes para sustentar esta hipótese, uma vez que não foram realizadas amostragens ao longo de toda a bacia Amazônica.

2º) Divergências conceituais em relação à presença de microcromossomos. Os primeiros estudos relacionados ao gênero *Symphysodon* sugeriram que *S. aequifasciatus*

apresentava um cariótipo simétrico, isto é, apenas macrocromossomos que decresciam gradualmente em tamanho (Ohno & Atkin, 1966). Por outro lado, Salgado *et al.* (1996a,b), Mesquita (2002) e Rocha-Oliveira *et al.* (2004) descreveram a presença de microcromossomos em *S. aequifasciatus* e *S. discus*, baseando-se no conceito de que um cromossomo pode ser considerado micro quando é muito pequeno, com tamanho variando entre 0,5 e 1,5 μm e sua caracterização morfológica é impossível (Denton, 1973; Tegelström & Rytman, 1981; Matthey, 1975 apud Fillon *et al.*, 1998). Porém, apesar dos pesquisadores que analisaram o gênero *Symphysodon* adotarem o mesmo conceito quanto à classificação de microcromossomo, a diferença de condensação dos cromossomos nas metáfases pode ter dificultado o consenso entre o número de microcromossomos em exemplares da mesma espécie e entre *S. aequifasciatus* e *S. discus* (Tabela 1);

3º) Subjetividade na medida cromossômica e padrão diferenciado de condensação dos cromossomos dos peixes ciclídeos. Thompson (1979) já havia percebido a dificuldade de organizar o cariótipo dos ciclídeos neotropicais e optou por considerar a ordem decrescente de tamanho dos cromossomos, agrupando-os apenas nas categorias M-SM e ST-A, visando diminuir os erros na descrição dos cariótipos. Mesmo considerando os critérios estabelecidos por Thompson (1979) os cariótipos das espécies de *Symphysodon* descritos por diversos pesquisadores, ainda mostravam divergência, devido à dificuldade de se realizar o emparelhamento e as medidas cromossômicas, uma vez que apresentam cromossomos muito pequenos. Esta dificuldade em realizar as medidas dos cromossomos poderia ser responsável pelo número diferente de cromossomos M-SM e ST-A nas espécies de *Symphysodon*, conforme mostra a Tabela 1. Mesquita (2002) sugeriu que a dificuldade em realizar o emparelhamento preciso entre os homólogos estaria relacionada à ocorrência de pequenos rearranjos

cromossômicos e a uma possível alteração na quantidade de heterocromatina constitutiva;

4º) Presença de regiões organizadoras de nucléolos múltiplas e suas constrições secundárias nem sempre identificáveis em coloração convencional. No presente trabalho, ao realizar a análise das preparações cromossômicas submetidas à coloração seqüencial Giemsa/impreganação pelo íon prata, constatou-se que todos os indivíduos de *S. aequifasciatus* da região de Manacapuru (AM) apresentaram 46 cromossomos M-SM e 14 microcromossomos (Figura 5a). Porém, esta fórmula somente foi obtida ao efetuar-se a medida dos cromossomos mitóticos submetidos à impregnação pelo íon prata, uma vez que apenas em coloração convencional com Giemsa, os braços cromossômicos portadores das constrições secundárias nem sempre eram visíveis, favorecendo a interpretação equivocada dos resultados. Assim, ao se analisar apenas cromossomos corados convencionalmente, alguns cromossomos portadores da RON apresentavam-se como ST-A, enquanto seus homólogos coravam-se com Giemsa e eram classificados como M-SM, parecendo haver um heteromorfismo (Figura 7). Este fato pode ter sido a causa da descrição das fórmulas cromossômicas III e IV, 49 M-SM + 7 ST-A + 4 micro, e também da fórmula I com 48 M-SM + 8 ST-A + 4 micro para *S. aequifasciatus* de Tefé (AM) (Rocha-Oliveira *et al.*, 2004). O presente estudo também corroboraria a existência de diferentes fórmulas para *S. aequifasciatus* de Manacapuru (AM) se as análises dos cromossomos fossem efetuadas somente com Giemsa.

Mesquita (2002), ao analisar *S. aequifasciatus* de Manacapuru (AM) e Tefé (AM) e *S. discus* do Igarapé Boi-boi, Barcelos (AM), descreveu que a primeira espécie apresentava RONS múltiplas (cromossomos dos pares 3, 5, 10, 11, 15, 21 e 22), mas nem todas ativas; enquanto a segunda espécie possuía RON simples, apesar de sugerir que os pares 18 e 24 eram os portadores desta região. Em contraste, Nascimento (2005) descreveu que *S. aequifasciatus* do Igarapé Croata (PA) apresentava RON

simples, mas não sugeriu quais eram os pares portadores desta região. Por meio da ampliação do estudo citogenético nestas espécies, foi possível verificar neste trabalho que ambas as espécies são portadoras de RONS múltiplas e que esta região é um excelente marcador espécie/específico, visto que em *S. aequifasciatus* as RONS estão presentes nos pares 4, 5, 11 e 21 (Figura 6), e em *S. discus* apenas nos pares 17 e 23 (Figura 9), embora nunca foram visualizadas mais que duas marcações em todos os indivíduos analisados.

A diferença no número de RONS de *S. aequifasciatus*, encontrada por diferentes autores, pode estar refletindo mais uma falha na análise do que uma real diferença, visto que estudos seqüenciais de coloração convencional e impregnação por nitrato de prata não foram descritos para todos os indivíduos nos estudos anteriores a este e, portanto, a identificação dos cromossomos portadores das RONS pode não ter sido efetuada com exatidão. Por outro lado, não é descartável a hipótese de que as regiões organizadoras de nucléolos, presentes nos pares 3, 10, 15 e 22, conforme descritos por Mesquita (2002), encontravam-se inativas, nos espécimes ora analisados, o que é comum em peixes (Feldberg & Bertollo, 1985; Feldberg *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2004).

Em *S. discus*, a diferença encontrada quanto aos cromossomos portadores da RON pode ser devida ao critério adotado para a distribuição dos cromossomos no cariótipo, visto que Mesquita (2002) organizou os cromossomos somente em ordem decrescente de tamanho, sem agrupá-los em M-SM e ST-A, diferindo da organização do cariótipo realizada no presente trabalho. Se os cariótipos de ambos os trabalhos fossem elaborados da mesma forma, os pares cromossômicos seriam os mesmos, o que deixa claro que em *S. discus* não existe variação no padrão de RON entre as populações de Novo Airão e Barcelos.

A heterocromatina constitutiva de *S. aequifasciatus* e *S. discus* sempre foi observada na região pericentromérica de quase todos os cromossomos mitóticos, além de blocos heterocromáticos nas regiões proximais de ambos os braços, ou mesmo ocupando braços cromossômicos inteiros, e muitas vezes intercalando as RONS (Figuras 5b, 8b). Estes dados corroboram os encontrados por Mesquita (2002), Rocha-Oliveira *et al.* (2004) e Nascimento (2005). Surpreendentemente, em *S. aequifasciatus* analisados no presente trabalho seis pares de cromossomos totalmente heterocromáticos foram observados em todas as metáfases mitóticas de machos e fêmeas. Todos estes dados reforçam a hipótese de Mesquita (2002), que sugere um processo de heterocromatinização gradual no gênero *Symphysodon*.

Uma vez que na família Cichlidae admite-se como caracteres basais o número diplóide igual a 48 cromossomos, em sua maioria acrocêntricos, blocos pequenos de heterocromatina localizados na região pericentromérica e um sistema de RON simples, localizada no maior par cromossômico do complemento (Feldberg *et al.*, 2003), o gênero *Symphysodon* pode ser considerado como um dos mais derivados dentro desta família, do ponto de vista cromossômico. Portanto, estes dados também corroboram sua posição nas árvores filogenéticas propostas por Kullander (1998) e Farias *et al.* (2001).

Além disso, os dados citogenéticos mitóticos (fórmula cromossômica, RONS e padrões de BC) concordam com os dados morfológicos quanto à existência de duas espécies dentro do gênero *Symphysodon*: *S. aequifasciatus* e *S. discus*. O estudo citogenético de espécimes de *S. aequifasciatus* apresentando três colorações distintas mostrou que esta variabilidade fenotípica de coloração entre os indivíduos da população de Manacapuru não está relacionada a diferenças cromossômicas, levando-se em conta que as análises realizadas em preparações cromossômicas submetidas à coloração convencional, bandamento C e impregnação pelo íon prata forneceram resultados similares em toda a amostra analisada.

IV.2 - Singularidade meiótica em acarás-disco

Apesar dos resultados meióticos poderem trazer informações adicionais sobre os eventos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica das espécies, não é comum encontrar na literatura dados sobre as fases meióticas em peixes, especialmente relacionados aos neotropicais. Alguns estudos já realizados em células meióticas destes organismos restringiram-se a apenas confirmar o número cromossômico diplóide. Por outro lado, análises quanto à presença de cromossomos sexuais em metáfase I e II, o comportamento de cromossomos supranumerários ou então do complexo sinaptonêmico também podem ser encontradas (Bertollo, 1978; Pauls, 1981; Feldberg & Bertollo, 1984; Dias, 1995; Bertollo & Mestriner, 1998; Santos *et al.*, 2002). Para as duas espécies do gênero *Symphysodon* a análise de todas as fases meióticas foi bastante informativa, tanto em coloração convencional quanto com impregnação por nitrato de prata e banda C, principalmente porque *S. aequifasciatus* apresentou, durante a prófase I, uma característica singular, ou seja, a presença de uma cadeia cromossômica.

Nos núcleos interfásicos de *S. aequifasciatus* e *S. discus* não foi possível evidenciar a ocorrência de estruturas diferenciadas ou com características de cromatina sexual (Figura 10b, 13b). Porém, os núcleos interfásicos testiculares de *S. aequifasciatus*, quando impregnados com o íon prata, evidenciaram até seis nucléolos bem visíveis (Figura 12a), enquanto em *S. discus* mostraram no máximo quatro nucléolos (Figura 15a). De acordo com Sumner (2003), todos os sítios das regiões organizadoras de nucléolo são potencialmente transcritos durante a intérfase. Desse modo, se todos os sítios estivessem ativos durante a intérfase, oito nucléolos deveriam ser impregnados pelo íon prata em *S. aequifasciatus*, e quatro em *S. discus*, visto que na primeira espécie quatro pares de cromossomos são portadores de RONS, enquanto que na segunda, apenas dois pares. Esta diferença entre o número de nucléolos

observados e aquele esperado nos núcleos interfásicos, em função do número de cromossomos portadores de RONS nas metáfases mitóticas, pode ser consequência do número de RONS ativas, o qual difere de acordo com as necessidades de cada tipo celular. Adicionalmente, estas variações podem ser explicadas por eventos de associação ou dissociação de material nucleolar, com proposto por Alberts *et al.* (1997).

Nos estágios iniciais da prófase I, organismos que possuem cromossomos sexuais diferenciados geralmente apresentam corpúsculos heteropicnóticos positivos (John, 1990). Entretanto, estes corpúsculos não foram evidenciados no leptóteno/zigóteno das duas espécies, reforçando os resultados obtidos na análise de células metafásicas mitóticas quanto à ausência de cromossomos sexuais diferenciados.

O paquíteno é um estágio marcante no processo meiótico, uma vez que é nesta fase que ocorre a permuta gênica, um dos eventos responsáveis pela variabilidade genética dos gametas (Clark & Wall, 1996). Porém, evidência de troca ocorrida entre cromátides homólogas durante o paquíteno só pode ser observada em microscópio óptico durante o diplóteno e a diacinese, quando os cromossomos homólogos começam a se repelir e os quiasmas ficam evidentes (White, 1973). Além destas duas fases, a metáfase I também é extremamente informativa, pois além do número de cromossomos e orientação dos centrômeros, podem evidenciar outras particularidades cromossômicas, como alterações numéricas e estruturais, terminalização de quiasmas e orientação dos bivalentes, entre outros (John, 1990).

A análise dos estágios finais da prófase I e metáfase I foi essencialmente importante na caracterização das espécies do gênero *Symphysodon*. A principal diferença encontrada entre as duas espécies do gênero foi vista no diplóteno, no qual *S. aequifasciatus* exibiu uma cadeia cromossômica em anel, composta por 20 cromossomos, e adicionalmente, 20 bivalentes (Figura 10e), enquanto *S. discus*

apresentou 30 bivalentes cromossômicos (Figuras 13e). O emprego da técnica de banda C nas células diplotênicas de *S. aequifasciatus* foi determinante para o estabelecimento do número de cromossomos envolvidos na cadeia cromossômica (Figura 11b).

Cadeia cromossômica, tal como a observada nas células diplotênicas e diacinéticas de *S. aequifasciatus*, é um fato inusitado para peixes, apesar de ser encontrada em algumas espécies de plantas, de invertebrados e de outros vertebrados (John & King, 1982; Lourenço *et al.*, 2000; Siqueira-Jr *et al.*, 2004; Carrel, 2004). Além disso, parece não existir relatos sobre a ocorrência de uma cadeia cromossômica que envolva tantos cromossomos, principalmente nos vertebrados. Várias explicações têm sido propostas para esclarecer a origem desta configuração meiótica multivalente, de acordo com o observado para cada organismo.

A associação terminal de cromossomos não homólogos na meiose I tem sido descrita como responsável pelo aparecimento de cadeia cromossômica em muitos organismos. Em alguns casos, como no invertebrado *Heteropternis obscurella*, esta associação envolve interações entre grandes regiões terminais banda-C positivas, de cromossomos não homólogos (John & King, 1982). Esta poderia ser uma das explicações para a origem da cadeia cromossômica observada em *S. aequifasciatus*. Contudo, tal caso parece não se enquadrar para essa espécie, visto que para haver a associação entre regiões heterocromáticas, pelo menos 20 cromossomos teriam que possuir pelo menos as regiões terminais, de ambas as regiões teloméricas com heterocromatina e, na presente amostra, apenas 12 cromossomos exibiram braços totalmente heterocromáticos (Figura 5b).

No mamífero ornitorrinco, cadeias cromossômicas envolvendo os cromossomos sexuais $X_1 Y_1 X_2 Y_2 X_3 Y_3 X_4 Y_4 X_5 Y_5$ foram evidenciadas apenas em machos, na primeira divisão meiótica, sendo este sistema de determinação sexual formado,

provavelmente, por meio de rearranjos entre cromossomos sexuais ancestrais e autossomos (Carrel, 2004). Porém, este modelo também não se enquadra para *S. aequifasciatus*, uma vez que não existe nenhum indício de cromossomos sexuais diferenciados nesta espécie.

Em alguns anuros, como *Physalaemus petersi* e *Eleutherodactylus binotatus*, a configuração multivalente observada durante a meiose I é resultante de heterozigidade para múltiplas translocações recíprocas (Lourenço *et al.*, 2000; Siqueira-Jr *et al.*, 2004), sendo esta uma possibilidade provável para explicar a origem da cadeia cromossômica multivalente encontrada em *S. aequifasciatus*. Para tal, pequenos segmentos de um cromossomo teriam sido transferidos para outro cromossomo não homólogo, repetidamente e de forma seriada, pois a fusão inteira de cromossomos acrocêntricos geraria pares cromossômicos heteromórficos ou um número ímpar de pares, originando a cadeia cromossômica formada por 20 elementos (Figura 16a,b). Entretanto, existe ainda a possibilidade da cadeia multivalente de *S. aequifasciatus* ser em parte formada por associação de regiões heterocromáticas e em parte por translocações recíprocas heterólogas e seriadas, porém, nenhum organismo parece ter se utilizado deste artefato até o momento.

Com o emprego da técnica de obtenção de banda C foi possível inferir que os cromossomos do 15º par, os quais são totalmente heterocromáticos, não fazem parte da cadeia cromossômica, uma vez que foi observado células mitóticas com um bivalente de tamanho médio inteiramente heterocromático (Figura 11c). Por outro lado, células em diacinese impregnadas pelo nitrato de prata evidenciaram que pelo menos um dos cromossomos nucleolares está envolvido na formação da cadeia multivalente, pois uma marcação com prata foi visualizada na cadeia cromossômica (Figura 12b).

Segundo Eichenlaub-Ritter & Winking (1990), as configurações meióticas multivalentes formadas a partir de fusões, fissões e translocações recíprocas,

evidenciadas em heterozigotos, podem causar uma segregação irregular e a não disjunção de cromossomos e/ou de cromátides irmãs durante as anáfases meióticas. Por outro lado, Mirol & Bidau (1994) sugerem que, às vezes, a cadeia cromossômica multivalente não influencia negativamente a fertilidade.

Na metáfase II, tanto *S. aequifasciatus* como *S. discus* evidenciaram n=30 cromossomos, indicando que a segregação dos cromossomos homólogos deve ocorrer normalmente (Figuras 10h; 13h). Assim, *S. aequifasciatus* parece apresentar sempre uma orientação alternada dos centrômeros homólogos, o que pode indicar, a priori, que a presença da cadeia cromossômica não estaria afetando a gametogênese desta espécie, na população de Manacapuru.

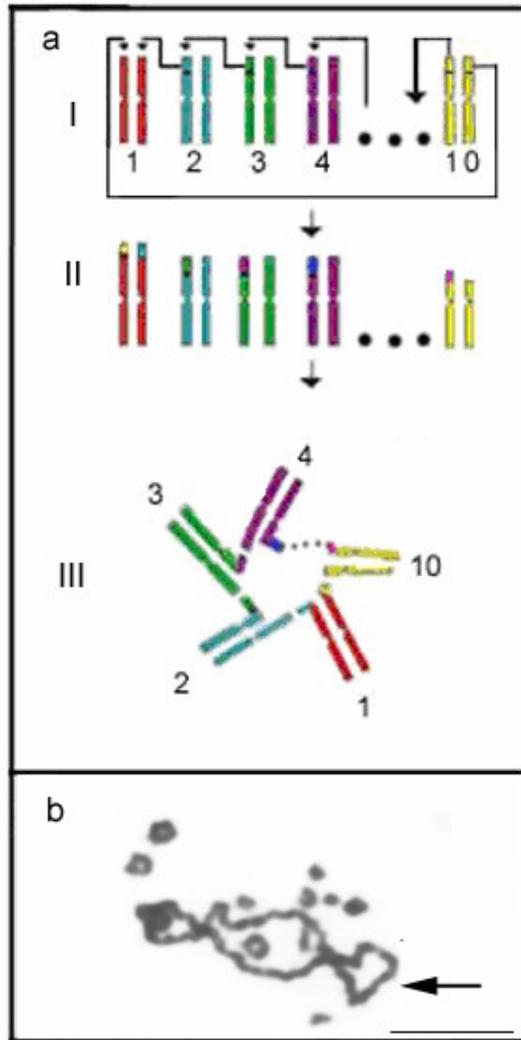


Figura 16 – Cadeia cromossômica de *Symphysodon aequifasciatus* de Manacapuru
 a) Representação esquemática de uma das possibilidades de formação de cadeia cromossômica na meiose: I) Translocações múltiplas e seriadas, envolvendo alguns pares cromossômicos; II) Elementos cromossômicos resultantes das translocações; III) Cadeia cromossômica multivalente em anel formada durante o diplóteno pelos cromossomos translocados e emparelhados; b) Célula em diacinese, incompleta, evidenciando a associação terminal dos cromossomos (seta) (Barra= 10µm).

IV.3 – Evolução de *Symphysodon aequifasciatus* e *Symphysodon discus*

O cariótipo de *S. aequifasciatus* e *S. discus* se destaca dentro da família Cichlidae pelo grande número de cromossomos, pela presença de cromossomos meta-submetacêntricos, pelo padrão de bandas C e pelas RONS múltiplas. Com isso, muitas questões surgem sobre a origem deste cariótipo diferenciado num grupo de peixes considerado por muitos autores como conservado (Thompson, 1979; Kornfield, 1984). Dentre os estudos para entender o aumento do número de cromossomos estão aqueles que relacionam o conteúdo de DNA com a evolução dos peixes. Estudos de densitometria realizados por Ohno & Atkin (1966) revelaram que *Symphysodon aequifasciatus* apresenta 1,5pg de conteúdo haplóide de DNA, o que representa um valor elevado para o grupo, uma vez que Hinegardner & Rosen (1972), analisando 16 espécies de ciclídeos por meio de fluorometria, propõem que os valores para esta família são relativamente homogêneos, com um mínimo de 1 e o máximo de 1,4pg de conteúdo haplóide de DNA. Ojima & Yamamoto (1990), ao efetuarem análises de citometria, encontraram para *S. aequifasciatus* 1,25pg de conteúdo haplóide. Estas diferenças de valores provavelmente se dão devido às diferentes técnicas que foram empregadas e nenhuma conclusão pode ser obtida por meio destes dados.

Ohno *et al.* (1968) propuseram que a duplicação gênica e genômica tiveram grande importância na evolução de todos os eucariotos e desde então, vários trabalhos têm comprovado a ocorrência destes eventos e proposto que poliploidia pode ter sido uma estratégia importante na evolução dos peixes (Comber & Smith, 2004). De fato, a contestação de que a poliploidia não poderia ser tolerada pela maioria dos animais, devido ao seu modo de reprodução sexuada, vem sendo questionada uma vez que existem evidências de muitos animais poliplóides (Mable, 2004).

Até o momento, espécies de peixes poliplóides já foram encontradas nas ordens Lepidosireniformes, Acipenseriformes, Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes,

Salmoniformes, Atheriniformes, Semionotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes, sendo que esta última tem apenas a espécie *Stizostedion vitreum* como representante poliplóide (Leggatt & Ywama, 2003; Comber & Smith, 2004). Além disso, segundo estes autores, a alopoliploidia, ou seja, a poliploidia originada pela hibridização de espécies, é o mecanismo predominante entre os peixes.

Apesar de ser um grupo com grande número de espécies, até o momento não existem relatos de poliploidia espontânea comprovada nos ciclídeos (Perciformes). Porém, na piscicultura, a poliploidia já é induzida em espécies desta família por meio de choques térmicos, abaixando-se ou elevando-se a temperatura da água, com o objetivo de obter peixes de maior tamanho (Valenti, 1975; Greenwood, 1991).

De acordo com Farias (2000), a diversificação das principais linhagens de ciclídeos Neotropicais, ocorreu no final do Cretáceo, sendo estimado que os geofagíneos se diversificaram há 82 milhões de anos e os ciclasomíneos-heroíneos há 84 milhões, sendo que a tribo dos heroíneos, à qual pertence o acará-disco, diversificou-se há aproximadamente 60 milhões de anos, durante o período Terciário da era Cenozóica. Nesta época, ou seja, durante o final do Cretáceo (era Mesozóica) e durante toda a era Cenozóica, a bacia Amazônica esteve sujeita a fortes mudanças, como alterações geológicas, retração e expansão do nível do mar, e trocas climáticas ocasionadas por períodos glaciais e interglaciais (Lundberg *et al*, 1998), as quais poderiam ter facilitado o desenvolvimento de poliploidia no gênero *Symphysodon*.

Visto que até agora são conhecidas somente as famílias Catostomidae (Cypriniformes) e Salmonidae (Salmoniformes) como completamente poliplóides ou de origem poliplóide, pode-se dizer que este evento ocorreu de forma independente dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros (Leggatt & Ywama, 2003; Comber & Smith, 2004). Este fato sugere que, se o gênero *Symphysodon* realmente for poliplóide, não

existe a obrigatoriedade da poliploidia ocorrer em outras espécies de peixes da Amazônia.

A origem poliplóide para *S. aequifasciatus* e *S. discus* poderia explicar o número diplóide igual a 60 cromossomos, com a maioria dos cromossomos do tipo M-SM. Na realidade, Thompson (1976) já havia sugerido uma poliploidização, seguida pela redução no número cromossômico por meio de fusões e deleções, a partir de um cariótipo com $2n=48$ cromossomos, a maioria do tipo acrocêntrico.

Da mesma forma, a poliploidia auxiliaria a esclarecer a cadeia cromossômica ainda encontrada em *S. aequifasciatus*. Estudos em plantas têm demonstrado que a poliploidia representa um período transiente, sendo o genoma mais tolerante a trocas e recombinações durante esta etapa, o que pode ter como consequência uma rápida evolução (Soltis & Soltis, 1999). Assim, as translocações múltiplas e seriadas encontradas em *S. aequifasciatus* podem ter ocorrido como uma consequência da poliploidia, e ainda podem ser vistas porque o seu processo de diploidização não está completo, evento este que já pode ter sido completado em *S. discus*, uma vez que em sua meiose não é vista a cadeia cromossômica, mas apenas bivalentes, apesar da espécie também apresentar $2n=60$ cromossomos.

Estes dados sugerem que *S. discus* possui cariótipo mais diferenciado e com diploidização estabelecida em relação aquele de *S. aequifasciatus*, uma vez que a sua meiose não exibiu a cadeia cromossômica. Além disso, esta espécie apresentou menor número de regiões organizadoras de nucléolo e também menor quantidade de heterocromatina constitutiva, os quais são caracteres considerados primitivos na família Cichlidae (Feldberg *et al.*, 2003).

V – CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho permitiram confirmar que as espécies do gênero *Symphysodon* apresentam número diplóide igual a 60 cromossomos. *Symphysodon aequifasciatus* (Manacapuru-AM) apresentou fórmula cromossômica igual a 46 M-SM + 14 microcromossomos, que somente pode ser determinada quando análises foram feitas em preparações cromossômicas coradas com técnicas seqüenciais de coloração convencional/impregnação pelo íon prata, visto que os braços cromossômicos portadores das constrições secundárias nem sempre se coravam convencionalmente, fazendo com que diferentes fórmulas cromossômicas fossem descritas. Já *S. discus* apresentou a fórmula cromossômica igual a 50 M-SM + 10 ST-A.

Além das características cariotípicas diferenciais, a heterocromatina constitutiva e as regiões organizadoras de nucléolo mostraram-se excelentes marcadores espécie/específicos ou populacionais. Porém, a variabilidade da RON não pode ser relacionada às diferentes colorações de *S. aequifasciatus* da população de Manacapuru.

A variabilidade cromossômica intra específica que era, até o momento, creditada para *S. aequifasciatus* e *S. discus* pode ser, em parte, consequência de divergências conceituais, subjetividade na medida cromossômica, padrões diferenciados de condensação de cromossomos e braços cromossômicos com constrições secundárias que não se coravam com Giemsa em algumas metáfases mitóticas ou então pode estar relacionada às diferentes bacias hidrológicas às quais elas pertencem, porém não foi possível chegar a uma conclusão definitiva por abordarmos somente populações de Manacapuru e Novo Airão.

O estudo de cromossomos meióticos também foi fundamental para caracterizar as duas espécies de *Symphysodon*, de Manacapuru e de Novo Airão, e inferir sobre processos de evolução cromossômica. A diferença mais evidente entre estas duas espécies foi observada no diplóteno, no qual *S. aequifasciatus* (Manacapuru) exibiu uma

cadeia cromossômica multivalente em anel, que deve ter sido originada a partir de translocações múltiplas seriadas, enquanto *S. discus* (Novo Airão) apresentou apenas bivalentes, sugerindo que este já terminou sua diploidização e *S. aequifasciatus* ainda está num período transiente.

Portanto, acredita-se que *S. aequifasciatus* de Manacapuru diferenciou-se cromossomicamente num período mais recente que *S. discus* de Novo Airão, uma vez que apresenta maior quantidade de heterocromatina constitutiva, maior número de regiões organizadoras de nucléolo e uma cadeia cromossômica durante a prófase I.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, J.D. 1997. *Biologia molecular da célula*. 3ed. Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, Brasil. 1294 pp.
- Almeida-Toledo, L.F. 1998. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 583-588.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.C.B. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos e perspectivas. *Publicatio UEPPG*, 6 (1): 43-60.
- Axelrod, H.R. 1978. *All about Discus*. T.F.H. Publications, Neptune City, USA. 128pp.
- Axelrod, H.R. 1995. *Dr. Axelrod's mini-atlas of freshwater aquarium fishes mini-edition*. T.F.H. Publications, Neptune City, USA. p. 98-111.
- Bertollo, L.A.C. 1978. *Estudos citogenéticos no gênero "Hoplias" Gill, 1903 (Pisces, Erytrinae)*. Tese, Universidade Federal de São Paulo/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil. 162 pp.
- Bertollo, L.A.C.; Mestriner, C.A. 1998. The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome Research*, 6: 141-147.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Brown, W.V.; Bertke, E.M. 1969. Cytogenetics and cytotaxonomy. *In*: Brown, W.V.; Bertke, E.M. (Eds). *Textbook of cytology*. Mosby Company, Saint Louis, USA. p. 475-509.
- Brum, M.J.I.; Galetti Jr, P.M. 1997. Teleostei ground plan karyotype. *Journal Comparative Biology*, 2: 91-102.
- Carrel, L. 2004. Chromosome chain makes a link. *Nature*, 432: 817-818.

- Chao, N.L. 1993. Conservations of rio Negro ornamental fishes. *Tropical Fish Hobbyist*, 41(5):99-114.
- Chao, N.L. 2001. The fishery, diversity and conservation of ornamental fishes in the rio Negro Basin, Brazil- a review of Project Piaba (1989-99). *In: Chao, N.L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, M. (Eds). Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro Basin, Amazonia, Brazil- Project Piaba.* Editora da Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil. p. 161-204.
- Clark, M.S.; Wall, W.J. 1996. *Chromosomes: the complex code.* Chapman & Hall, New York, USA. 345 pp.
- Comber, S.C.L.; Smith, C. 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biological Journal Linnean Society*, 82:431-442.
- Denton, T.E. 1973. *Fish chromosome methodology.* Charles C. Thomas Publisher, USA. 466 pp.
- Dias, A. L. 1995. *Estudo do complexo sinaptonêmico em peixes, "Prochilodus lineatus" (Prochilodontidae) e "Astyanax scabripinnis" (Characidae): análise da sinapse dos cromossomos supranumerários.* Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil. 102 pp.
- Eichenlaub-Ritter, U.; Winking, H. 1990. Nondisjunction, disturbances in spindle structure, ad characteristics of chromosomes alignment in maturing oocytes of mice heterozygous for Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 54: 47-54.
- Farias, I.P. 2000. *Filogenia Molecular de Peixes da Família Cichlidae (Pisces, Perciformes).* Tese, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil. 170 pp.
- Farias, I.P. 2003. Filogeografia e genética das populações do peixe ornamental acará-disco (*Symphysodon* spp., Cichlidae, Perciformes). *Anais do 1º Encontro de Genética da Região Norte*, Manaus, Brasil. p. 40.

- Farias, I.P.; Ortí, G.; Meyer, A. 2000. Total evidence: molecules, morphology and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)*, 288: 76-92.
- Farias, I.P.; Ortí, G.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Meyer, A. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 89-103.
- Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 1984. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces: Cichlidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 4: 639-645.
- Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 1985. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlids fishes (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38(3-4): 319-324.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Revista Brasileira de Genética*, 15 (2): 369-383.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds). *Fish adaptation*. Science Publishers, Enfield, USA. p. 285-308.
- Ferraro, M.V. M.; Fenocchio, A.S.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, C.O.; Cestari, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluate using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1): 103-107.
- Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas - região de Santarém, PA*. IBAMA, Brasília, Brasil. 176 pp.

- Fillon, V.; Morisson, M.; Zoorob, R.; Auffray, C.; Douaire, M.; Gellin, J.; Vignal, A. 1998. Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two colors fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research*, 6: 307-313.
- Futuyma, D.J. 1997. *Biologia evolutiva*. 2ed. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, São Paulo, Brasil. 632 pp.
- Goldstein, R.J. 1973. *Cichlids of the world*. T.F.H. Publication, Neptune City, USA. 382 pp.
- Greenwood, P.H. 1991. Speciation. *In*: Keenleyside, G.H.A (Ed.). *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, New York. p. 86-102.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Matiello, M.C.A.; Leite, M.L.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. 2004. Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 27(4): 529-535.
- Guerra, M. S. 1988. *Introdução à citogenética geral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 142 pp.
- Hrbek, T; Amado, M.V.; Farias, I.P. 2005. Molecular characterization of the discus (*Symphysodon* spp., Cichlidae, Perciformes) using combined mtDNA and microsatellite DNA data. *Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética*. Águas de Lindóia, Brasil. p. 419
- Hinegardner, R.; Rosen, D.E.R. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *The American Naturalist*, 106: 621-644.
- 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.
- IBAMA, portaria nº. 62-N, de 10 de junho de 1992. *Legislação para espécies de peixes ornamentais nativas e exóticas*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 de junho de 1992.

- John, B. 1990. *Meiosis*. Cambridge University Press, New York, USA. 396 pp.
- John, B.; King, M. 1982. Meiotic effects of supernumerary heterochromatin in *Heteropternis obscurella*. *Chromosoma*, 85:39-65.
- Kleckner, N. 1996. Meiosis: How could it work? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 8167-8174.
- Kligerman, A.D.; Bloom, S.E. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 34:266-269.
- Kornfield, I.L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. In: Turner, B.J. (Ed) *Evolutionary genetics of fishes*. Plenum Press, New York, USA. p. 591-610.
- Kullander, S.O. 1996. Eine weitere übersicht der diskusfische, gattung *Symphysodon* Heckel. *Datz Sonderheft, Diskus*. p. 10-19.
- Kullander, S.O. 1998. A phylogeny and classification of the South America Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 461-498.
- Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae. In: Reis, R.R.; Kullander, S.O.; Ferraris. C.J. (Eds). *Check list of the freshwater of South and Central America*. Editora da Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 605-654.
- Leggatt, R.A.; Ywama, G.K. 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13: 237-246.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.; Cardoso, A.J. 2000. A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 131- 133.

- Lowe-McConnel, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 535 pp.
- Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L.; Wesselingh, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. p. 13-68.
- Mable, B.K. 2004. Why polyploidy is rarer in animals than in plants: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 453-466.
- Mesquita, D.R. 2002. *Análise da variabilidade cromossômica do peixe ornamental Acará Disco ("Symphysodon discus" Heckel, 1980; "S. aequifasciatus" Pellegrin, 1904; Cichlidae) do Amazonas*. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil. 75 pp.
- Mirol, P.M.; Bidau, C.J. 1994. Non-random patterns of non-disjunctional orientation in trivalents of multiple Robertsonian heterozygotes of *Dichroplus pratensis* (Acrididae). *Genetica*, 92: 155-164.
- Moens, P.B. 1987. Introduction to meiosis. *In*: Moens, P.B. (Ed). *Meiosis*. Academic Press, Orlando, Flórida. p. 1-17.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14 (2): 331-357.
- Nakayama, C.; Jégu, M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia*, 3: 866-869.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R. ; Feldberg, E. 2002. A comparative cytogenetic study of five species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetica*, 114: 231-236.

- Nascimento, A.L. 2005. *Estudos citogenéticos em peixes das subfamílias Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae (Perciformes, Cichlidae) do Pará*. Dissertação, Universidade Federal do Pará, Amazonas, Brasil. 75 pp.
- Ohno, S.; Atkin, N.B. 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. *Chromosoma*, 18: 455-466.
- Ohno, S.; Wolf, U.; Atkin, N.B. 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas*, 59: 169-187.
- Ojima, Y.; Ueno, K.; Hayashi, M. 1976. A review of the chromosome numbers in fishes. *La Kromosomo*, 2: 19-47.
- Ojima, Y.; Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo II*, 57: 1871-1888.
- Oliveira, C. 1987. *Estudos citogenéticos no gênero "Corydoras" (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae)*. Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 154 pp.
- Oliveira, C.; Wright, J.M.; Foresti, F. 2002. Chromosome structure in fishes. *In: Sobti, R.C.; Obe, G.; Athwal, R.W. (Eds). Some aspects of chromosome structure and functions*. Narosa Publishing House, New Delhi, India. p. 103-108.
- Pauls, E. 1981. *Evidências de um sistema de cromossomos supranumerários em "Prochilodus scrofa" Steindachner, 1881 (Pisces – Prochilodontidae)*. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil. 190 pp.
- Portela-Castro, A.L.B.; Júlio-Júnior, H.F.; Nishiyama, P.B. 2001. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 114: 277-283.
- Rocha-Oliveira, F.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2004. Análise cromossômica do acará-disco (*Symphysodon* spp., Cichlidae, Perciformes) dos lagos Bouana (rio Tefé) e

- Acari (rio Madeira), Amazonas. *Anais do XIII Jornada Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA*, Manaus, Brasil. p. 76.
- Roeder, G.S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development*, 11: 2600-2621.
- Salgado, S.M.; Falcão, J.N.; Feldberg, E.; Porto, J.I.R. 1996a. Ocorrência de microcromossomos em *Symphysodon discus* (Perciformes, Labroidei), da bacia amazônica central. *Anais do VI Simposio de Citogenética e Evolução Aplicada a Peixes Neotropicais*, Manaus, Brasil. p. 88.
- Salgado, S.M.; Falcão, J.N.; Feldberg, E.; Porto, J.I.R. 1996b. Ocorrência de citótipos diferentes em *Symphysodon aequifasciatus* (Perciformes, Cichlidae) da bacia amazônica. *Anais do VI Simpósio Citogenética e Evolução Aplicada a Peixes Neotropicais*, Manaus, Brasil. p. 89.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H.(Ed). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP, São Paulo, Brasil. p. 345-373.
- Santos, V.H.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Toledo-Filho, S.A.; Bernardino, G. 2002. Synaptonemal complex analysis in the fish species *Piaractus mesopotamicus* and *Colossoma macropomum*, and in their interspecific hybrid. *Caryologia*, 55(1): 73-79.
- Silva, T.; Kotlar, B. 1980. *Discus*. T.F.H. Publications Inc., Neptune City, USA. 96 pp.
- Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes, Petrópolis, Brasil. 73 pp.
- Siqueira-Jr, S.; Ananias, F. Recco-Pimentel, S. 2004. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 27 (3): 363-372.

- Soltis, D.E.; Soltis, P.S. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 348-352.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 74: 304-306.
- Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing, Malden, USA. 287 pp.
- Tegelström, H.; Rytman, H. 1981. Chromosomes in birds: evolutionary implications of macro and microchromosome number and lengths. *Hereditas*, 94: 225-233.
- Thompson, K.W. 1976. *Some aspects of chromosomal evolution of the Cichlidae (Teleostei: Perciformes) with emphasis on neotropical forms*. Ph.D. Dissertation. University of Texas at Austin Thompson, Austin, Texas. 132 pp.
- Thompson, K.W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*, 679-691.
- Valenti, R.J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *Journal of Fish Biology*, 7: 519-528.
- White, M.J.D. 1973. *Animal cytology and evolution*. 3ed. Cambridge University Press, New York, USA. 961 pp.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.