

**CLAUDINEIA BARBOSA DE LIMA**

**VARIAÇÃO CITOGENÉTICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) NO LIMITE  
DAS BACIAS DO ALTO PARAGUAI E AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732v  
2008

Lima, Claudineia Barbosa de, 1983-  
Variação citogenética em *Hoplias malabaricus* (Bloch,  
1794) no limite das bacias do Alto Paraguai e Amazônica  
/ Claudineia Barbosa de Lima. – Viçosa, MG, 2008.  
ix, 42f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lúcio Antonio de Oliveira Campos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Traíra (Peixe) - Citogenética. 2. Traíra (Peixe) -  
Biodiversidade - Paraguai, Rio, Bacia. 3. Traíra (Peixe) -  
Biodiversidade Amazonas, Rio, Bacia.  
4. *Hoplias malabaricus*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 597.48

**CLAUDINEIA BARBOSA DE LIMA**

**VARIAÇÃO CITOGENÉTICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) DAS  
BACIAS DO ALTO PARAGUAI E AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de abril de 2008.

---

Prof. Jorge Abdala Dergam  
(Co-Orientador)

---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Rubens Pazza

---

Prof<sup>a</sup>. Karla Yotoko

---

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Orientador)

À mulher de garra, forte, corajosa, guerreira que me ensinou a beleza e  
doçura da vida! E que os obstáculos são necessários para o amadurecimento  
da alma...

A você mãe.

“Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo  
uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”.

(Fernando Sabino)

## AGRADECIMENTOS

A quem posso recorrer a qualquer hora, para quem ouve meus choros, desabafos, sabe da minha alma, da minha dor e a da minha alegria... Meu Deus, te agradeço por essa conquista!

Os meus agradecimentos a quatro pessoas que tornaram esse sonho possível. Meu pai (Manoel), minha mãe (Amália), meu irmão (Claudinei) meu padrasto (Reginaldo). Muito obrigada pelo apoio, pelo amor incondicional, vital na minha permanência em Viçosa, mesmo de longe, vocês estiveram comigo. No auge do meu desespero, da minha solidão, vocês sempre me motivaram a ir até o fim. Essa é minha família!!! Não poderia ser diferente, pois o que nos une é o amor...

Ao meu sobrinho, Carlos Daniel pelo amor, graça e carinho.

Agradeço profundamente a Magali e César. Meu pedacinho de família, irmãos que eu escolhi. Pessoas que amo de graaaaaaça! MUITÍSSIMO obrigada por me acolherem, por compartilharem tantos momentos bons, por segurarem minha barra quando já não tinha força para isso.

Também preciso agradecer dois amigos que amo tanto. Sem dúvida foi providência Divina nosso encontro! Mandukinha e Vini (São Pedro), vocês são mais que amigos, são parceiros! Já fazem parte de minha vida. Mandukinha, um exemplo de honestidade, integridade, mansidão e inteligência. Quando eu crescer, quero ser igual a você! Vini, a arte em pessoa, frágil e forte, de um olhar pidonho, mas sempre tem algo bom a oferecer. Chorou comigo muitas vezes, rimos muito mais. Cheio de sabedoria, encanta onde passa. Adoro vocês!!! Vão comigo aonde eu vá!

Ao meu namorado Fred pelo amor, carinho e dedicação. Mesmo com alguns quilômetros de distância, se fez presente em pensamento, sempre me confortando e dando apoio nos perrengues até aqui. Muito obrigada, gatinho!

Aos amigos de laboratório, de festa e reclamações. Jacozinho Lindo, Lucioni Paquito, Gisele, Lilian, Hilton, Tiago, Margarete muito obrigada pela convivência. Vocês tornaram a rotina do Laboratório menos árdua. Aos que chegaram ao final, Michel com suas piadas, Diego e sua delicadeza nata, Geiza - competência em pessoa. A todos vocês, muito obrigada por participarem da minha vida!

Devo o meu muito obrigada a você Jorge. Pessoa que respeito. Nossa relação de amor e ódio me fez amadurecer muito, aprendi que quando coloca uma coisa na cabeça tem o dom de ser mais teimoso que eu. Ou você aprendeu isso comigo? E não adianta insistir para pagar o lanche da tarde, os genes turcos se expressam imediatamente! Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte do *Beagle* e por me orientar.

Ao Professor Lúcio, meu orientador. Professor mais humano que já conheci, de uma inteligência espetacular. Sempre se preocupado, se estou triste, se estou bem, como anda minha saúde... Mais que um professor, mais que um orientador, um amigo. MUITÍSSIMO obrigada por me aceitar como sua orientada. Experiência ímpar na minha vida!

O acaso nos uniu, mas o carinho nos tornou amigas. Sabrina e Joana, muito obrigada pela amizade e carinho.

Ao Anderson, Wagner, Patrícia e Daniel por terem sonhado, planejado e executado esse projeto comigo. Por aceitarem os desafios das coletar sem reclamar muito! Vocês foram peças fundamentais para que essa tese se tornasse real. São responsáveis por boa parte desse trabalho!

A Natália, colega de apartamento, pelo bom convívio e pela amizade.

Ao Professor Dejair, por disponibilizar o fotomicroscópio num momento tão importante.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante 22 meses e à Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado do Mato Grosso FAPEMAT pelo financiamento dos meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa pela estrutura fornecida, o espaço físico, os funcionários atenciosos e professores capacitados que transmitiram grandes ensinamentos que levarei pela vida toda.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho possibilitando a conclusão de mais esta etapa de minha vida. Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Claudineia Barbosa de Lima, segunda filha de Manoel Alves de Lima e Amália Barbosa de Lima, nasceu em Colíder, Mato Grosso, em 02 de fevereiro de 1983.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2000 na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “29 de Novembro”, em Tangará da Serra - MT. Em setembro de 2001 iniciou o curso de Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas na Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, campus de Tangará da Serra. Em maio de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em março de 2008.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 A bacia amazônica .....	2
1.2 A bacia do Paraná.....	2
1.3 O complexo de espécies <i>Hoplias malabaricus</i> .....	4
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVO .....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
4.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos metafásico .....	10
4.2 Técnica de Bandamento C .....	12
4.3 Bandamento de Ag - NORs .....	13
4.4 Bandamento com fluorocromos CMA <sub>3</sub> /DAPI.....	13
4.5 Captura de imagens .....	13
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
6. ARTIGO CIENTÍFICO .....	17
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	24
DISCUSSÃO .....	30
7. CONCLUSÕES GERAIS .....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## RESUMO

LIMA, Claudineia Barbosa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008.

### **Varição Citogenética em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) no limite das bacias do Alto Paraguai e da Amazônica.**

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Orientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Luiz Orlando de Oliveira

A ordem Characiformes representa um dos grupos dominantes de teleósteos na região Neotropical, com ampla distribuição geográfica. Um desses caraciformes, a traíra *Hoplias malabaricus*, apresenta aspectos sistemáticos não resolvidos. Esta espécie apresenta grande diversidade de padrões cariotípicos dentro e entre bacias hidrográficas, com variações na morfologia e número cromossômico, em alguns casos envolvendo sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. Foram comparadas populações de *H. malabaricus* das bacias do Alto Paraguai e amazônica, consideradas isoladas por aproximadamente 10 milhões de anos. Os espécimes foram coletados e submetidos a técnicas padrões de citogenética (coloração convencional, bandas C, NOR e CMA<sub>3</sub>). Na drenagem amazônica foram analisadas amostras de três afluentes do rio Juruena (rios Sangue, Papagaio e Arinos). No Sangue as traíras apresentaram  $2n=40$ , fórmula cromossômica  $18m + 16sm + 6st$  e número fundamental (NF) igual a 80; no Papagaio foram  $2n=42$ , fórmula cromossômica  $18m + 24sm$  e  $NF=84$  e no Arinos apresentaram  $2n=42$ , fórmula cromossômica  $20m + 22sm$  e  $NF=84$ . Na bacia do Paraguai, foram amostradas populações dos rios Paraguai, Sepotuba e córrego Joaquim do Boche, todas apresentaram  $2n=40$ ,  $20m + 20sm$  e  $NF=80$ . A morfologia do citótipo do rio Sangue foi considerada como nova no presente trabalho. Todas as populações apresentaram regiões heterocromáticas predominantemente centroméricas e alguns cromossomos com blocos heterocromáticos em regiões teloméricas associados com regiões organizadoras de nucléolos. O padrão de NORs se mostrou variável, mas todas as populações apresentaram NORs multiplas, demonstrando serem ricas em GC. A presença de citótipos semelhantes nas bacias do Paraguai e do Juruena sugere que a diversificação cariotípica precedeu a última vicariância entre estas drenagens, há 10 milhões de anos. Por outro lado, os citótipos em cada afluente do Juruena indicam que na bacia amazônica os processos de diferenciação cromossômica podem ter ocorrido de maneira mais intensa do que é observado nas bacias do sul brasileiro.

## ABSTRACT

LIMA, Claudineia Barbosa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2008.

### **Cytogenetic Variation in *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) in the boundaries of the Upper Paraguai and amazon basins.**

Advisor: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisors: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Luiz Orlando de Oliveira

The order Characiformes is one of the dominant teleost taxa in the neotropical region, where it is widely distributed. The systematics of one characiform, the trahira *Hoplias malabaricus*, is still unresolved. This species is characterized by high levels of karyotypical variation within and among basins, including differences in chromosome morphology and number, and in some cases, involving systems of multiple sex chromosomes. We compared cytogenetic data of populations *H. malabaricus* from the Upper Paraguay and amazon basins that have been isolated for at least 10 million years. Samples were collected and subject to standard cytogenetic techniques (Giemsa staining, C and NOR banding and CMA<sub>3</sub>). In the Amazon Basin samples from three tributaries of the Juruena River (Sangue, Papaguaio and Arinos rivers). In the Sangue river they were 2n=40, chromosomal formula 18 m + 16 sm + 6 st and fundamental number (NF) = 80; in the Papaguaio river trahiras had 2n=42, chromosomal formula 18 m + 24 sm e NF= 84 and in the Arinos river they were 2n=42, chromosome formula 20 m + 22 sm and NF= 84. In the Paraguai basin, samples were collected in the Paraguai, Sepotuba rivers and in the Joaquim do Boche spring. All were 2n=40, with 20m + 20sm and NF=80. Morphology of the Sangue rivers cytotypes were considered as new proposal in this work. All populations were characterized by mostly centromeric heterochromatic regions, whereas some chromosomes showed telomeric blocks of heterochromatin associated to nucleolar organizer regions. Pattern of NOR variation was highly variable, but all populations showed multiple NORs associated to GC-rich regions. The shared presence of 2n=40 and 2n=42 cytotypes in the Upper Paraguay and Juruena basins suggested that karyotypic diversification within *H. malabaricus* largely preceded the 10 million years vicariance. The occurrence of unique cytotypes in the three Juruena tributaries indicated that processes of chromosomal differentiation were more intense in the Amazon basin than in the southern Brazilian basins.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O conjunto de dados moleculares de peixes atuais (Beheregaray *et al.*, 2002; Lovejoy *et al.*, 2005; Montoya-Burgos *et al.*, 2002; Sivasundar *et al.*, 2001) e registros fósseis em diferentes bacias (Gayet e Meunier, 1998; Lundberg, 1998; Malabarba, 1998) apontam para o reconhecimento de que complexos eventos de isolamento (vicariância) e dispersão da ictiofauna na região neotropical ocorreram ao longo de um tempo geológico que pode se estender, no caso da família Erythrinidae, ao Cretáceo e à separação da África da América do Sul.

O cerne da evolução geomorfológica da América do Sul envolve o processo de formação dos Andes, resultado de um processo de compressão leste-oeste do continente e elementos mais estáveis como os escudos continentais e arcos estruturais. Desde o final do Mesozóico e durante grande parte do Cenozóico, a dinâmica das bacias e seus tributários acompanham o desenvolvimento de uma bacia antepaís ("*foreland basin*") flutuante que se desloca na direção leste, interposta entre os Andes e os escudos continentais. A bacia flutuante determina duas fases dos rios: na primeira, os rios como o paleo Orinoco-Amazonas (no sentido de Lundberg *et al.*, 1998) ou lagos correm ou se desenvolvem de forma paralela ao eixo da cordilheira e permitem transgressões marinhas na região do Caribe e o Atlântico Sul; posteriormente, com o enchimento da bacia antepaís com sedimentos, os rios direcionam-se de forma transversal ou oblíqua aos Andes.

Estas mudanças permitiram a ocorrência de eventos de vicariância e dispersão e representam provavelmente a principal causa do elevado nível de biodiversidade da região neotropical. Altos níveis de biodiversidade podem também, ser um reflexo dos efeitos diferenciados das glaciações no Hemisfério Sul, onde não provocaram, aparentemente, o fator de extinção nos níveis evidentes no Hemisfério Norte (revisão em Lundberg *et al.*, 1998)

Ao longo dos últimos 90 milhões de anos (ma), três processos definem a hidrogeologia do continente Sul Americano:

- 1) a separação da África iniciada no Aptiano-Albiano ( $\cong$  112-105 ma) e completada no Turoniano ( $\cong$  90 ma) (revisão em Lundberg *et al.*, 1998),
- 2) o desenvolvimento dos Andes nas suas regiões oeste e norte e

3) o desenvolvimento do istmo do Panamá, o qual conectou as Américas do Sul e Central e separou os oceanos Pacífico do Atlântico.

### **1.1 A bacia amazônica**

A história da bacia amazônica é, sem dúvida, representativa da evolução hidrogeológica da região neotropical. Esta bacia é o sistema dominante de drenagem no continente, compreendendo 7.050.000 km<sup>2</sup>, abrangendo a região norte e central do Brasil e partes da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. Os afluentes mais importantes da margem direita derivam, na sua maioria, do escudo brasileiro, como o Tocantins-Araguaia, Xingu e Tapajós. Embora o rio Madeira também apresente nascentes nas regiões norte e noroeste do escudo brasileiro, o maior volume d'água deste rio provém dos Andes bolivianos e peruanos. Outros rios de origem andina são o Purus, Solimões, Juruá, Huallaga, Maranhão, Pastaza, Içá, Japurá e o Vaupés (tributário do rio Negro superior). Os rios Negro e Branco drenam basicamente o lado sudoeste do escudo das Guianas. Na margem esquerda, rios como o Uatumã, Trombetas, Paru e Jari, drenam a região sul do escudo das Guianas (Lundberg *et al.*, 1998).

No Cretáceo superior (Campaniano a Maastrichtiano médio), o Amazonas apresenta-se dividido em duas seções, a mais oriental drenando para o Atlântico e a vertente ocidental para o oeste (Lundberg *et al.*, 1998). Ambas vertentes estariam isoladas pelos arcos estruturais Purus e Monte Alegre (Lundberg *et al.*, 1998). No final do Maastrichtiano e Paleoceno inferior, as transgressões marinhas ao norte e sul da América do Sul foram reduzidas, acompanhadas por um aumento no rio primitivo paralelo aos Andes primordiais, o qual forma o paleo Orinoco-Amazonas. No final do Paleoceno inferior (61-60 Ma), novas transgressões marinhas determinam mais uma redução do paleo Orinoco-Amazonas.

O direcionamento do Amazonas ao Atlântico é relativamente recente, sendo estabelecida há 8 Ma, no Mioceno superior (Mertes *et al.*, 1996). O conjunto destes processos favoreceu o isolamento e a dispersão de peixes de água doce numa vasta região dos neotrópicos.

### **1.2 A bacia do Paraná**

A bacia do Paraná (considerando o sistema conjunto Paraná-Paraguai) é a segunda de maior porte no continente, drenando aproximadamente 4.000.000 km<sup>2</sup>

na Argentina, Bolívia, Brasil, Uruguai e Paraguai. O rio Paraguai drena a planície do Chaco e a extensa região do Pantanal, entre os Andes e o escudo brasileiro. O Paraguai e o Paraná encontram-se na Argentina, próximo à cidade de Corrientes. A foz do Paraná encontra-se com o rio Uruguai para formar o rio da Prata (Lundberg *et al.*, 1998)

As bacias do Paraná e do Amazonas apresentam uma longa e complexa história de conexões. No Cretáceo superior, um segmento da bacia do Paraná encontrava-se do lado oriental do maciço das Serras Pampeanas, enquanto um segmento de um grande rio encontrava-se entre este maciço e os Andes em formação. Parte deste rio primitivo envolveria um segmento dos componentes ocidentais da atual bacia do Paraná (Lundberg *et al.*, 1998).

No final do Maastrichtiano e Paleoceno inferior, a diminuição da transgressão marinha permitiu a existência de uma bacia do Paraná mais desenvolvida, com a captura de partes do sistema do paleo Orinoco-Amazonas, na região sudoeste do mesmo. No Eoceno médio e Oligoceno inferior, o divisor de águas entre as duas bacias sofreu uma mudança para o norte e o Paraná capturou cabeceiras do paleo Orinoco-Amazonas, quando as Serras Pampeanas perdem sua função de divisoras de água e o arco Michicola começa sua influência como divisor entre as duas bacias (Lundberg *et al.*, 1998). No Oligoceno superior - Mioceno inferior (30-20 Ma), o divisor de Chapare passa a representar o divisor moderno entre as duas bacias. No Mioceno superior, o limite definitivo entre as duas bacias é estabelecido. Numa primeira instância, o limite sul da bacia amazônica é marcado por sedimentos do mar Pebas, aproximadamente a 10 °S, no Estado do Acre, enquanto o limite norte do mar Paraná ocorre a 17 °S, em posição norte noroeste de Santa Cruz de la Sierra, na Bolívia. Com um processo posterior de sedimentação, o divisor das bacias é marcado pelo arco estrutural de Michicola e a conseqüente captura de cabeceira do Paraná por parte da bacia amazônica. Do Mioceno superior ao Recente (8 Ma–atualidade), os processos de sedimentação determinaram que o Paraná (e o Orinoco) corresse adjacentes e paralelos às bordas do escudo brasileiro e ao escudo das Guianas respectivamente. No litoral, os períodos interglaciais determinaram um aumento do nível do mar e a formação de um lago de 2.500 km de comprimento e uma largura máxima de 100 km, ao leste de Manaus. No Paraná, o

aumento do nível do mar pode ter também determinado a formação de lagos nas seções inferiores (Lundberg *et al.*, 1998).

A primeira captura do paleo Orinoco Amazonas determinou que o rio Paraná fluísse para o norte. O divisor moderno entre as bacias foi estabelecido há 30 Ma, mas a última captura de cabeceira entre as duas bacias ocorreu entre 11 e 10,8 Ma (Lundberg *et al.*, 1998).

### **1.3 O complexo de espécies *Hoplias malabaricus***

A traíra *H. malabaricus*, peixe caraciforme da família Erythrinidae, é uma das espécies nominais de mais ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde a Argentina (Província de Buenos Aires) até o Panamá (Berra, 1981). Suas características biológicas – sedentarismo, baixo metabolismo, incapacidade de realizar migrações rio acima e grande adaptabilidade, especialmente a ambientes de água parada – determinam que seja uma espécie muito estudada sob vários pontos de vista (Géry, 1977), como o fisiológico (Fernandes *et al.*, 1994) e, particularmente, o citogenético (Bertollo *et al.*, 2000), pois os diferentes citótipos aparentemente se comportam como boas espécies biológicas.

As características sedentárias fazem desta espécie um excelente modelo de estudo para determinar padrões máximos de diferenciação genética, particularmente com a associação de conjuntos de caracteres independentes, como marcadores moleculares basicamente genômicos como RAPD-PCR e uniparentais (DNA mitocondrial) (Dergam *et al.*, 2002) e marcadores citológicos como o cariótipo (número diplóide, padrões de bandamentos cromossômicos).

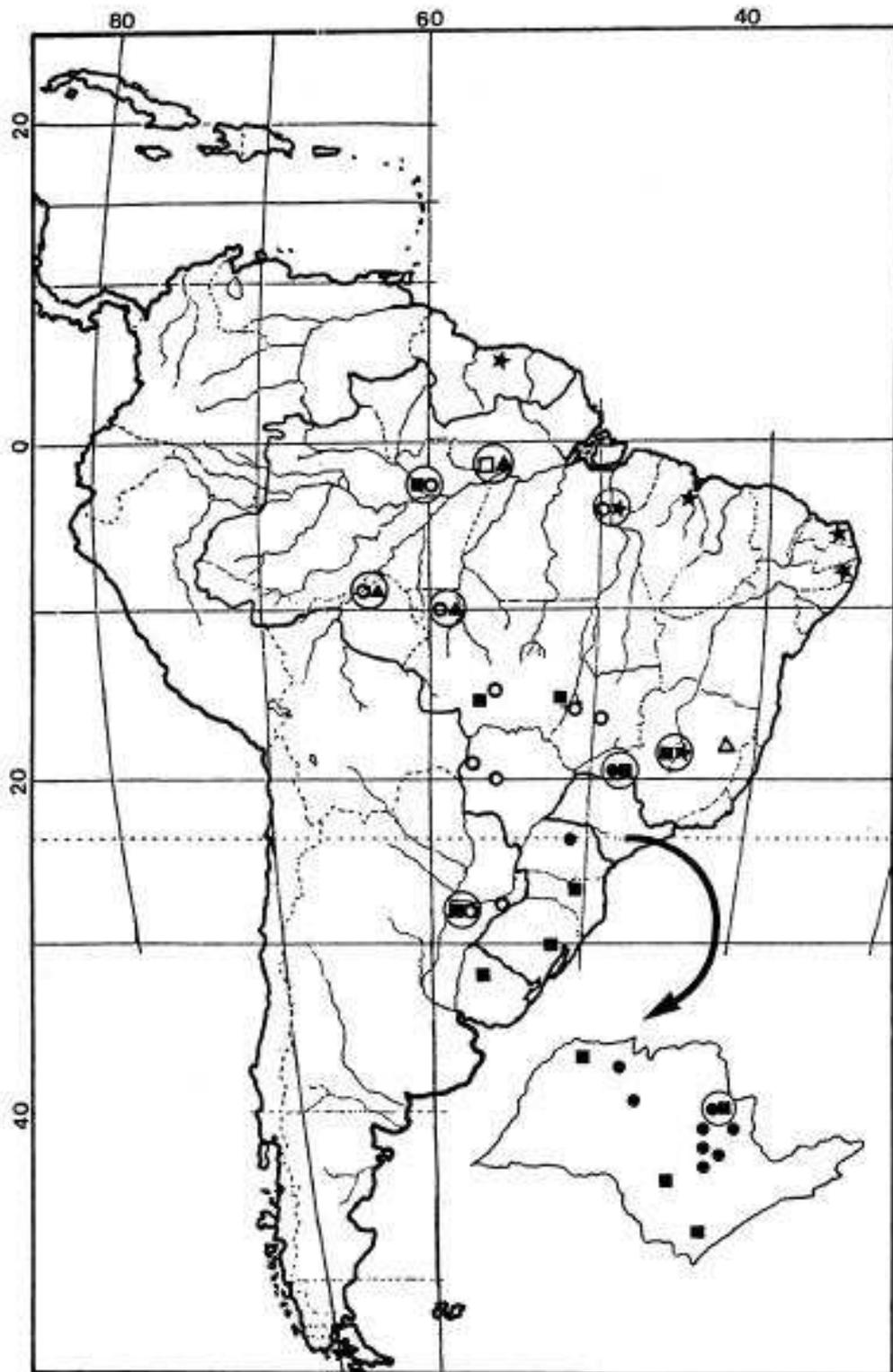
Dergam *et al.* (2002) demonstraram que a associação de dados cariotípicos com padrões de divergência genômica obtidos com marcadores com altas taxas de mutações moleculares (RAPD), permitem a delimitação de populações ou mesmo de espécies simpátricas. Tais hipóteses devem ser testadas com dados de divergência de seqüências de DNA, pois é a forma mais acurada de estabelecer relações filogenéticas entre espécies ou populações (Hillis *et al.*, 1996).

Apesar da ausência de dados morfológicos diagnósticos que permitam diferenciar as populações ou espécies de traíras, estudos cariotípicos e moleculares permitem determinar alguns padrões claramente indicativos da influência de fatores geológicos no processo de evolução do grupo. O mapa de Bertollo *et al.* (2000) sugere padrões gerais de distribuição de sete citótipos na América do Sul (Fig. 1).

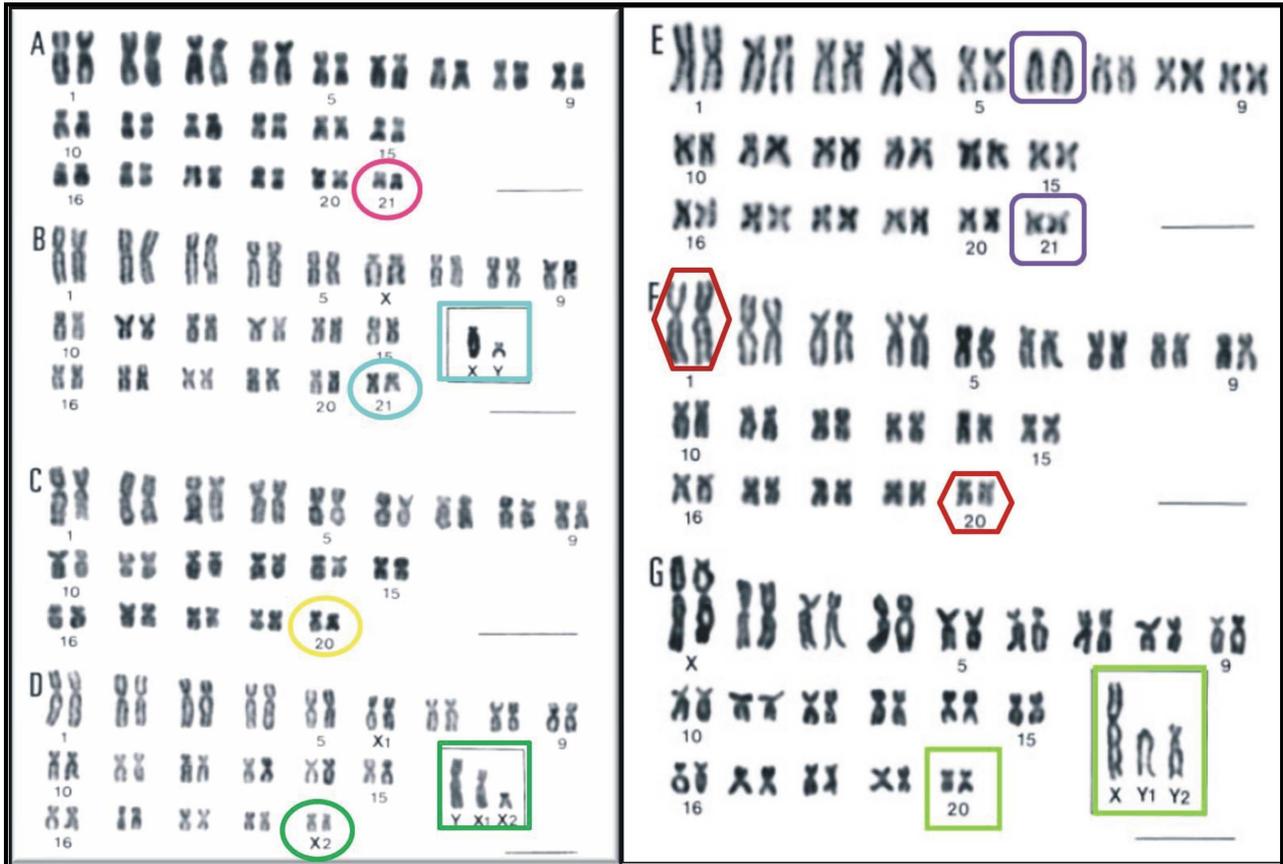
Dentro dos citótipos com  $2n=40$  (C, D, F e G), o que apresenta maior distribuição é o 40/C (Fig. 2), com os primeiros quatro pares cromossômicos de tamanho semelhante. Dentro deste citótipo encontram-se uma série de haplótipos, os mais basais, presentes nas populações da bacia do Paraná, outros de relações não resolvidas com seqüências de citocromo b, até diferenciação dos citótipos (Dergam, com. pess.)

Os citótipos 40/C e 42/A apresentam ampla simpatria nas bacias amazônica, do Paraguai. Na bacia amazônica também ocorre simpatria dos citótipos 40/C e o 40-41 no rio Madeira. Na bacia do Tocantins ocorre simpatria entre os citótipos 40/C e 40/F (Bertollo *et al.*, 2000).

A separação final das bacias do Paraguai e a Amazônica ocorreu de forma definitiva entre 11 e 10,8 Ma (Lundberg *et al.*, 1998), isolando população de vários citótipos, dentre eles, os 40/C e os 42/A, permitindo assim uma idade mínima para a separação destas duas linhagens.



**Figura 1.** Distribuição dos citótipos de *Hoplias malabaricus*. Citótipos A (quadrados sólidos), B (aberto triângulo), C (círculos abertos), D (círculos sólidos), E (quadrado aberto), F (estrelas sólidas) e G (triângulos sólidos) compreendendo 32 regiões distintas no Brasil, 2 na Argentina e 1 no Uruguai e 1 no Suriname. As amostras de São Paulo (SP) são mostradas em detalhes. Simpatria entre os distintos citótipos é indicado pelos grandes círculos abertos. (Fonte: Bertollo et al., 2000)



**Figura 2.** Cariótipos dos citótipos de *Hoplias malabaricus* com coloração convencional. Citótipos A, B, C, D, E, F e G. (Fonte: Bertollo *et al.*, 2000). Barra = 5µm.

Com base em dados de seqüências de amostras de DNA entre as bacias do rio Madeira e o Paraguai, Dergam *et al.* (no prelo) determinaram uma calibragem de relógio molecular de divergência mínima entre 0,34 e 0,36% por milhão de anos para o citocromo b, dentro do citótipo 40/C.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em comparação com outros grupos de vertebrados, pouco se conhece sobre a sistemática, evolução, ecologia, fisiologia, etologia, morfologia e genética de peixes. A falta de conhecimento está provavelmente relacionada ao elevado número de espécies, além de seu habitat que dificulta sua captura, observação e a determinação de seus parâmetros biológicos (Böhlke *et al.*, 1978). A ictiofauna continental neotropical é considerada a mais rica do mundo, possuindo cerca de 60 famílias e mais de 2500 espécies (Böhlke *et al.*, 1978).

No Brasil, boa parte desta biodiversidade se encontra na região de cerrado. De acordo com recentes publicações esta região é considerada uma das 25 áreas de maior biodiversidade ameaçada do planeta (Myers *et al.*, 2000). Sua biodiversidade é considerada a mais rica dentre as savanas do mundo. Porém, a crescente expansão das pastagens, cultivos, redes de infra-estrutura, áreas degradadas e uso do fogo estão entre as mais importantes alterações ecológicas que se processam no Brasil na atualidade e têm levado ao empobrecimento biológico deste bioma (Klink *et al.*, 2005). A erosão da biodiversidade é um dos efeitos diretos e imediatos causados por estas ações, enquanto sua recuperação representa ainda um desafio político-científico (Souza, 2001).

Diante dessa situação há necessidade de estudos que caracterizem padrões de diversidade genética de espécies de peixes, para que trabalhos de conservação e manejo possam ser efetuados com uma base científica e objetiva. Nesse sentido, a citogenética, associada às outras ciências, tem se mostrado um meio de custo eficiente para estreitar a compreensão do passado, do presente e das relações entre as espécies, uma vez que seus dados têm sido usados com sucesso para o entendimento da citotaxonomia, evolução e filogenia (Guerra, 1988; Mariano *et al.*, 1999 e Sumner, 2003).

### 3. OBJETIVO

Caracterizar a diversidade cariotípica de *H. malabaricus*, seu número diplóide e a morfologia cromossômica, distribuição e composição da heterocromatina e número e localização das regiões organizadoras de nucléolos, em populações amostradas no Alto Paraguai (rios Paraguai, Sepotuba e córrego Joaquim do Boche) à bacia amazônica (rios Sangue, Arinos e Papagaio).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Populações de *H. malabaricus* foram amostradas em três rios da bacia Amazônica: rio Sangue, rio Papagaio, rio Arinos e três rios da bacia do Paraguai: rio Paraguai, rio Sepotuba e córrego Joaquim do Boche.

Os indivíduos foram coletados com auxílio de anzol, redes e tarrafas, acondicionados em bombonas com água e oxigênio e conduzidos ao laboratório de Biologia Geral da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). No laboratório, foram colocados em aquários areados e receberam agentes mitogênicos, que foram injetados em duas doses com espaço de 24 horas, antes do processamento do espécime.

Os espécimes foram submetidos às técnicas de obtenção de cromossomos de acordo com Bertollo *et al.* (1978). As técnicas de Banda C foram feitas segundo Sumner (1972); a banda NOR foi obtida conforme Howell & Black (1980) e os padrões de fluorescência DAPI/CMA<sub>3</sub> seguiram de Schweizer (1980).

A morfologia cromossômica foi determinada com base na razão dos braços de Levan *et al.* (1964). Os cromossomos foram classificados como m (metacêntrico), sm (submetacêntrico), st (subtelocêntrico) e t (telocêntrico). O número fundamental (NF) foi determinado considerando m, sm, st com dois braços e t com um braço.

Depois de sacrificados os espécimes foram acondicionados em formol 10% por três dias e posteriormente transferidos para o álcool 70%. Os espécimes utilizados para as análises encontram-se no laboratório de Biologia Geral da Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Tangará da Serra.

### 4.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos metafásico

O método consiste em um tratamento químico, com colchicina, para evitar a polimerização do fuso mitótico. As células do rim cefálico são separadas mecanicamente com uso de seringa hipodérmica e, posteriormente, hipotonizadas. Processo este que proporciona um aumento considerável do volume celular, facilitando o rompimento de suas membranas quando a suspensão é gotejada na superfície de uma lâmina aquecida.

A fixação, passo final da preparação, impede o rompimento das células quando ainda em solução hipotônica, mantendo satisfatoriamente a integridade da

estrutura cromossômica e evitando distanciamento excessivo dos cromossomos em relação à placa metafásica.

A metodologia utilizada foi composta pelos seguintes passos:

- 1) Injetou-se intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução de colchicina (0,025%) na proporção de 1,0 mL/100g de peso do animal;
- 2) O peixe foi deixado em aquário aerado por cerca de quarenta minutos. Decorrido esse tempo, o animal foi sacrificado e retirado o rim cefálico.
- 3) O material foi lavado em solução hipotônica de KCl (0,075M)
- 4) Em seguida dissociado em 10 mL de solução hipotônica com pinças de dissecação. Esse processo foi completado aspirando e expirando suavemente o material, com o auxílio de uma seringa hipodérmica de vidro desprovida de agulha, o que facilita a separação dos blocos celulares;
- 5) A suspensão celular obtida foi colocada em estufa a 36-37 °C por 20 minutos;
- 6) O material foi ressuspendido cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrifuga. Nessa transferência, os pedaços de tecido ainda não desfeitos foram descartados;
- 7) Foi acrescentado cerca de 1mL de fixador (três partes de metanol para uma parte de ácido acético) celular recém preparado e, em seguida, o material foi ressuspendido e centrifugado durante 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante descartado.
- 8) Adicionou-se 6 a 8 mL do fixador celular, deixando-o escorrer através da parede do tubo. Ressuspendeu-se o material, com o auxílio de pipeta Pasteur e centrifugado durante 10 minutos a 1000 rpm descartando o sobrenadante.
- 9) O item 8 foi repetido por mais uma vez.
- 10) Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionada uma quantidade de fixador celular (cerca de 1,0 mL de fixador celular para cada 0,25 mL de “pellet”) e o material foi ressuspendido;

- 11) Pingou-se 2 a 3 gotas da suspensão com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina limpa, mantida na água a 70-80 °C, segundo Souza & Moreira-Filho (1994);
- 12) A lâmina foi soprada levemente para que o excesso escorresse e se evaporasse e secada diretamente ao ar;
- 13) O material foi corado com Giemsa (5%) diluído em tampão fosfato pH 6.8, durante 10 minutos e lavada em água corrente, secando-a ao ar.

#### **4.2 Técnica de Bandamento C**

A técnica é utilizada para evidenciar regiões heterocromáticas ao longo dos cromossomos. Esta técnica envolve a solubilização diferencial de fragmentos de DNA, principalmente da região eucromática dos cromossomos metafásicos, por três tratamentos diferenciais: o ácido (HCl) que tem como efeito a depurinação, o tratamento com base fraca – Ba(OH)<sub>2</sub> cujo efeito é a forte degradação de proteínas e um banho final com solução salina (2XSSC) quente, que provoca a quebra da cadeia do DNA entre a posição do carbono β da pentose e o grupamento fosfato. A configuração física da região heterocromática dificulta a perda de DNA e proteínas como ocorre de maneira drástica na região eucromática (Sumner, 1990). A Banda C tem auxiliado no pareamento de cromossomos homólogos e na avaliação de alterações cromossômicas que se estabelece em cada cariótipo (Guerra, 1988).

Para evidenciar as regiões heterocromáticas, procedeu-se ao protocolo de Sumner (1972) com algumas modificações. As lâminas foram expostas a uma solução de HCl 0,2N a 42 °C por 6 minutos. O passo seguinte correspondeu à exposição das lâminas a uma solução de hidróxido de bário 5% a 42 °C por 55 a 70 segundos e lavadas em HCl 0,2N. Em seguida foram transferidas para recipientes contendo uma solução salina 2XSSC a 60 °C por 60 minutos. Entre cada um dos passos citados foi realizada a lavagem das lâminas com água destilada deixando secar bem.

### **4.3 Bandamento de Ag - NORs**

A atividade nucleolar, bem como das regiões organizadoras de nucléolo, pode ser efetuada através da metodologia de coloração por  $\text{AgNO}_3$ . Tal método implica na precipitação da prata em proteínas envolvidas com a atividade transcricional do rDNA nucleolar, que são mais argentófilas que as demais.

Para esta técnica foi utilizado o protocolo proposto por Howell & Black (1980) com modificações. Foi preparada uma mistura contendo quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata 50%, duas gotas de gelatina (em solução aquosa com 1% de ácido fórmico) e duas gotas de água. Esta mistura foi pingada sobre a lâmina, já devidamente gotejada com a suspensão celular, e espalhada sobre toda a extensão da lâmina com auxílio de uma lamínula. Em seguida, a lâmina foi incubada em câmara úmida e acondicionada em estufa a aproximadamente 60 °C. Após aproximadamente 2 minutos a lâmina foi monitorada até que esta atingisse uma coloração marrom caramelo. Em seguida a lâmina foi lavada sob água corrente para retirar a lamínula e o excesso da mistura.

### **4.4 Bandamento com fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DAPI**

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

### **4.5 Captura de imagens**

As metáfases foram analisadas em um microscópio Olympus CX41 e fotografadas em um microscópio Carl Zeiss, modelo 518N com uma objetiva de 100x, ligado a uma câmera digital Canon Power Shot A620.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHEREGARAY, L.B. SUNNUCKS, P. & BRISCOE, D.A. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odonthestes perugiae* complex. **Proc. R. Soc. Lond.** v. 269, p. 65-73, 2002.

BERRA, T. M. **An Atlas of Distribution of the Freshwater Fish Families in the World.** University of Nebraska Press: Lincoln, 1981.

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

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, p.103-120, 1978.

BOYCE, T.M., ZWICK, M. E. & AQUADRO, C. F. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, v. 123, p. 825-836, 1989.

CARVALHO, R., SOARES FILHO, W. S., BRASILEIRO-VIDAL, A. C. & GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic Genome Research**, v. 109, p. 276-282, 2005.

DERGAM, J. A., & BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins. **Brazilian Journal of Genetics** v. 13, p. 755-766, 1990.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R., SCHAEFFER, C. E., GODINHO, A. L. VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto - SP, v. 25, p. 379-387, 2002.

DERGAM, J.A. **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) Species Complex.** Dissertação de Doutorado. Colorado State University, Estados Unidos, 1996.

FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T., KALININ, A. L., MORON, S. E. Comparative study of gill dimensions of 3 erythrinid species in relation to their respiratory function. **Canadian Journal of Zoology**. v. 72, p. 160-165, 1994.

GAYET, M., & MEUNIER, F. J. Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. p. 85-110. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.** Malabarba, L. R. *et al.* (eds.). Edipucrs: Porto Alegre. Brasil, 1998.

GÉRY, J. Characoids of the world. **Tropical Fish Hobbyist Publications**, Inc., Neptune City, NJ, 1977.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. p. 139, 1988.

HILLIS D.M., MORITZ, C. & MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates: Sunderland, 1996.

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

KLINK, C. A., MIRANDA, H. S., GONZALES, M. I., VICENTINI, K. R. F. **O bioma cerrado**. Disponível em: <[http://www.icb.ufmg.br/~peld/port\\_site03.pdf](http://www.icb.ufmg.br/~peld/port_site03.pdf)> Acesso em: 15 mai. 2005.

LOPES, P. A., ALBERDI, A. J., DERGAM, J. A., FENOCCHIO, A. S., Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey River (Province of Corrientes, Argentina). **Copeia**, v. 1998, p. 485-487, 1998.

LOVEJOY, N. R., ALBERT, J. S., CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical Fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, 2005.

LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERRERO, J., HORTON, B., MALABARBA, M. C. S. L., WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a History of tropical South America rivers. p. 13-48. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Malabarba, L. R. *et al.* (eds.). Edipucrs: Porto Alegre, 1998.

MALABARBA, A., VARI, R. P., MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview. p. 1-11. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Malabarba, L. R., *et al.* (eds.). Edipucrs: Porto Alegre, 1998.

MARIANO, C. S. F., POMPOLO, S. G., DELABIE, J. H. C. Citogenética das espécies gêmeas e simpátricas *Pachycondyla vilosa* e *Pachycondyla sp.* (Ponerinae) **Naturalia**, v 24, p 215-217, 1999.

MERTES, L. A. K., DUNNE, T., MARTINELLI, L. A. Channel-floodplain geomorphology along the Solimoes-Amazon River, Brazil. **Geological Society of America Bulletin**, v. 108, p. 1089-1107, 1996.

MONTOYA-BOURGOS, J. I., WEBER, C., LE BAIL, P.-Y. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. **Revue Suisse de Zoologie**. v. 109, p. 369-382, 2002.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403. p. 853-858, 2000.

SCAVONE, M. D. P., BERTOLLO, L. A. C., CAVALLINI, M. M. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios.** v. 80 p. 223-227, 1994.

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

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

SOUZA, I. L. **rDNAs nucleares e bandamentos cromossômicos nos caracídeos *Salmininae* e *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes).** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.47, 2001,

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research,** v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and Function.** Blackwell Science, v. 287, p. 2003.

## 6. ARTIGO CIENTÍFICO

### **Variação Citogenética em *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) no limite das bacias do Alto Paraguai e amazônica.**

Claudineia B. Lima<sup>1</sup>, Jorge A. Dergam<sup>3</sup>, Anderson Fernandes<sup>2</sup>, Uedson P. Jacobina<sup>3</sup>, Wagner M. S. Sampaio & Lucio A. O. Campos<sup>1</sup>

1 – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000 Viçosa-MG, Brasil . Email: claubarlima@hotmail.com;

2- Departamento de Ciências Biológicas – Universidade do Estado de Mato Grosso, campus universitário de Tangará da Serra - MT

3- Departamento de Biologia Animal –Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000 Viçosa-MG.

### **INTRODUÇÃO**

Os Characiformes representam uma das ordens predominantes de teleósteos na região Neotropical e apresentam uma distribuição geográfica que se estende desde os Estados Unidos da América do Norte até a Patagônia. São caracterizados por um alto grau de diversidade morfológica, fisiológica e um grande número de características adaptativas (Lemos *et al.*, 2002). Este grupo de peixes apresenta características citogenéticas interessantes, tais como variação no número e na fórmula cromossômica, conseqüentemente no número fundamental, na determinação do sistema sexual, em polimorfismos estrutural e numérico das regiões organizadoras de núcleos e em padrões de bandamento C (Almeida-Toledo, 1998).

A família Erythrinidae é endêmica da região neotropical e uma representante dos grupos de ampla distribuição no continente. Compreende três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. O gênero *Hoplias* distingue-se dos demais pela presença de caninos no maxilar e nadadeira dorsal com 15 a 16 raios (Oyakawa, 2003). A espécie *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra ou trairão, possui hábitos sedentários, estando bem adaptada a ambientes lênticos de água doce, com baixa profundidade e com vegetação, onde se refugia e constrói ninhos, embora possa ser encontrada em rios de pequeno e grande porte (Sabino & Zuanon, 1998). Estas características tornam essa espécie um bom modelo de estudo geográfico, particularmente sob o ponto de vista citogenético.

Apesar de se tratar de uma única espécie nominal (Martins *et al.*, 2006) a taxonomia desse grupo não é muito esclarecida (Oyakawa, 1990). Dados

citogenéticos apontam que *H. malabaricus* apresenta uma diversidade de padrões cariotípicos inter e intrapopulacionais em diferentes bacias hidrográficas, no que diz respeito à morfologia e número cromossômico, além do sistema de cromossomo sexual (Tabela 1) (Bertollo *et al.*, 1979,1983; Ferreira *et al.*, 1989; Dergam & Bertollo 1990; Scavone *et al.*, 1994; Lopes e Fenocchio, 1994; Bertollo *et al.*, 1997a; 1997b; Lopes *et al.*, 1998; Bertollo & Mestriner 1998; Bertollo *et al.*, 2000). Com base nessas evidências, *H. malabaricus* tem sido considerada como um complexo de espécies (Bertollo *et al.*, 2000).

**Tabela 1.** Levantamento de dados citogenéticos de *H. malabaricus* do Brasil. (Modificado de Bertollo *et al.*, 2000)

Localidade	Citótipo	Fórmula (2n)	Sistema Sexual	Ref.
Manaus (AM) – igarapé Mindú	A	42m/sm	-	2,11
Poconé (MT) – rio Bento Gomes	A	42m/sm	-	2
Araguaiana (MT) – córrego Dois de Agosto	A	42m/sm	-	2,11
Reserva Ecológica do Jataí (SP) – rio Mogi-Guaçu	A	42m/sm	-	9
Três Marias (MG) – rio São Francisco	A	42m/sm	-	2
S. J. do Marinheiro (SP) – rio Grande	A	42m/sm	-	2,14
Conceição das Alagoas (MG) – rio Grande	A	42m/sm	-	10
Juquiá (SP) – rio Juquiá	A	42m/sm	-	12
Itatinga (SP) – : rio Paranapanema	A	42m/sm	-	2
Poço Preto (SC) – rio Iguaçu	A	42m/sm	-	2
Guaíba (RS) – rio Guaíba	A	42m/sm	-	2
Corrientes – Argentina – río Aguapey	A	42m/sm	-	3,4
Tacuarembó – Uruguai – río Negro	A	42m/sm	-	15
Palmeira (PR) – rio Iguaçu	A	42m/sm	-	18,19
Ponta Grossa (PR) – rio Tibagi	A	42m/sm	-	19
Ivaí (PR) – rio Ivaí	A	42m/sm	-	19
Ponta Grossa e Castro (PR) – rio Riveira	A	42m/sm	-	19
Pariquera – Açu (SP) – rio Riveira	A	42m/sm	-	19
Nova Prata do Iguaçu (PR) – rio Iguaçu	A	42m/sm	-	20
Parque Estadual Rio Doce (MG) Lagoa Carioca	A	42m/sm	-	21
Reserva Jurumirim - Avaré (SP)	A	42m/sm	-	11
Fazenda Guaporé – São Carlos (SP)	A	42m/sm	-	11
Rio Grande – Passos (MG)	A	42m/sm	-	11
Parque Estadual do Rio Doce (MG) – rio Doce	B	42m/sm/st	XX/XY	12,16,11
Parque Estadual Rio Doce (MG) Lagoa Carioca	B	42m/sm/st	XX/XY	21
Manaus (AM) – rio Negro	C	40m/sm	-	1,2
Tucuruí (PA) – rio Tocantins	C	40m/sm	-	1
Porto Velho (RO) – rio Madeira	C	40m/sm	-	1,2
Aripuanã (MT) – rio Aripuanã	C	40m/sm	-	1
Cuiabá (MT) – rio Cuiabá	C	40m/sm	-	1,2
Aragarças (GO) – rio Araguaia	C	40m/sm	-	2
Goiás Velho (GO)	C	40m/sm	-	1
Corumbá (MS) – rio Paraguai	C	40m/sm	-	1,2
Miranda (MS) – rio Miranda	C	40m/sm	-	1,2
Misiones – Argentina – río Paraná	C	40m/sm	-	3
Corrientes – Argentina – río Aguapey, río Riachuelo	C	40m/sm	-	4,5
Itirapina (SP) – represa do Lobo	D	40m/sm 39msm	X1X1X2X2 X1X2Y	2,6
São Carlos (SP) – ribeirão Monjolinho	D	40m/sm 39msm	X1X1X2X2 X1X2Y	2,7,8
Pirassununga (SP) – rio Mogi-Guaçu	D	40m/sm 39msm	X1X1X2X2 X1X2Y	2,8
Ipeúna (SP) – rio Passa-Cinco	D	40m/sm	X1X1X2X2	9

		39msm	X1X2Y	
Piracicaba (SP) – rio Piracicaba	D	40m/sm	X1X1X2X2	9
		39msm	X1X2Y	
Novo Horizonte (SP) – rio Três Pontes	D	40m/sm	X1X1X2X2	9
		39msm	X1X2Y	
Mirassolândia (SP) – ribeirão Barra Grande	D	40m/sm	X1X1X2X2	2
		39msm	X1X2Y	
Reserva Ecológica Jataí (SP) – rio Mogi-Guaçu	D	40m/sm	X1X1X2X2	9
		39msm	X1X2Y	
Conceição das Alagoas (MG) – rio Grande	D	40m/sm	X1X1X2X2	10
		39msm	X1X2Y	
Londrina (PR) – ribeirão Três Bocas	D	40m/sm	X1X1X2X2	2
		39m/sm	X1X2Y	
Porto Trombetas (PA) – rio Trombetas	E	42m/sm/a	-	2
Jequié (BA) – rio das Contas	F	40m/sm	-	17
Jacobina (BA) rio Itapicuru	F	40m/sm	-	17
Paramaribo – Suriname	F	40m/sm	-	1
Tucuruí (PA) – rio Tocantins	F	40m/sm	-	1
São Luiz (MA)	F	40m/sm	-	1
Natal (RN) – lagoa Redonda	F	40m/sm	-	1,2
Recife (PE)	F	40m/sm	-	1
Três Marias (MG) – rio São Francisco	F	40m/sm	-	1,7
Porto Trombetas (PA) – rio Trombetas	G	40m/sm	XX	2
		41m/sm/a	XY1Y2	
Porto Velho (RO) – rio Madeira	G	40m/sm	XX	2
		41m/sm/a	XY1Y2	
Aripuanã (MT) – rio Aripuanã	G	40m/sm	XX	2,6
		41m/sm/a	XY1Y2	

**Localidades estudadas:** AM: Amazonas; BA: Bahia; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PE: Pernambuco; PR: Paraná; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo. Referências: 1. Bertollo *et al.*, (1997a); 2. Bertollo *et al.*, (2000); 3. Lopes e Fenocchio (1994); 4. Lopes *et al.*, (1998); 5. Jorge (1995); 6. Bertollo *et al.*, (1983); 7. Dergam e Bertollo (1990); 8. Bertollo *et al.*, (1997b); 9. Scavone *et al.* (1994); 10. Dergam (1996); 11. Born & Bertollo (2001); 12. Bertollo *et al.* (1979); 13. Ferreira *et al.*, (1989); 14. Cavallini e Bertollo (não publicado); 15. Dergam (não publicado); 16. Born e Bertollo (2000); 17. Jacobina (não publicado); 18. Vicari *et al.*, 2003; 19. Vicari *et al.*, (2005); 20. Vicari *et al.*, 2006. 21. Born & Bertollo (2006),

Bertollo *et al.* (2000) baseados na macroestrutura cromossômica e no sistema sexual, reconheceram sete citótipos de *H. malabaricus*, sendo classificados como citótipos A, B, C, D, E, F, e G (Tabela 2). Os autores ainda propõem o agrupamento para esses citótipos em dois grupos maiores: o grupo I formado pelos citótipos A, B, C e D, e o grupo II composto pelos citótipos E, F e G, justificando a relação evolutiva

entre eles. Sugerem que o citótipo D seja derivado de um cariótipo semelhante ao citótipo C, que provavelmente se deu por uma translocação dando lugar a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos. Da mesma forma o citótipo B, que também possui um sistema sexual múltiplo, é provavelmente derivado do citótipo A.

**Tabela 2.** Dados citogenéticos dos citótipos de *Hoplias malabaricus*

Citótipo	2n Fórmula	Sistema Sexual	Distribuição
A	42m/sm	-	Norte a sul do Brasil, Uruguai, norte da Argentina
B	42m/sm/st	XX/XY	Restrito a sistemas de lagos no Vale do Rio Doce - MG
C	40m/sm	-	Norte do Brasil a nordeste da Argentina
D	40m/sm 39ms/m	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bacia do Alto Paraná
E	42m/sm/a	-	Porto Trombetas - Pará
F	40m/sm	-	Suriname até nordeste do Brasil
G	40m/sm 41m/sm/a	XX XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	Restrita a poucos locais da Amazônia

Fonte: Bertollo *et al.* (2000)

Dentro do grupo II, os citótipos F e G compartilham a presença de um cromossomo acrocêntrico, incomum para *H. malabaricus*. Assumindo a presença do sistema de cromossomo sexual múltiplo, o citótipo G teria derivado do citótipo E, onde o acrocêntrico estaria relacionado com rearranjos dando origem ao cromossomo metacêntrico maior, também observado no citótipo F.

Evidências baseadas em filogenia molecular e genética de populações apontam para diversificação pré-Pleistocênica de alguns peixes neotropicais (Lovejoy & De Araújo, 2000). Modelos para diversificação evolutiva e biogeográfica da ictiofauna devem considerar a história da paisagem da América do Sul e dos sistemas fluviais (Montoya-Burgos, 2003). Num primeiro momento, rios e lagos correriam paralelos à incipiente Cordilheira do Andes. Posteriormente, os corpos d'água direcionaram-se de forma transversal e oblíqua em direção ao oceano Atlântico (Lundberg *et al.*, 1998).

Mesmo barreiras terrestres relativamente pequenas são capazes de isolar populações de peixes dentro de uma mesma bacia (Vari, 1998). Isso torna esses organismos adequados para investigações sobre o passado geológico e modificações ambientais, uma vez que a dispersão dos peixes está intimamente ligada a conexões diretas entre as bacias (Lundberg, 1993; Bermingham & Martin, 1998).

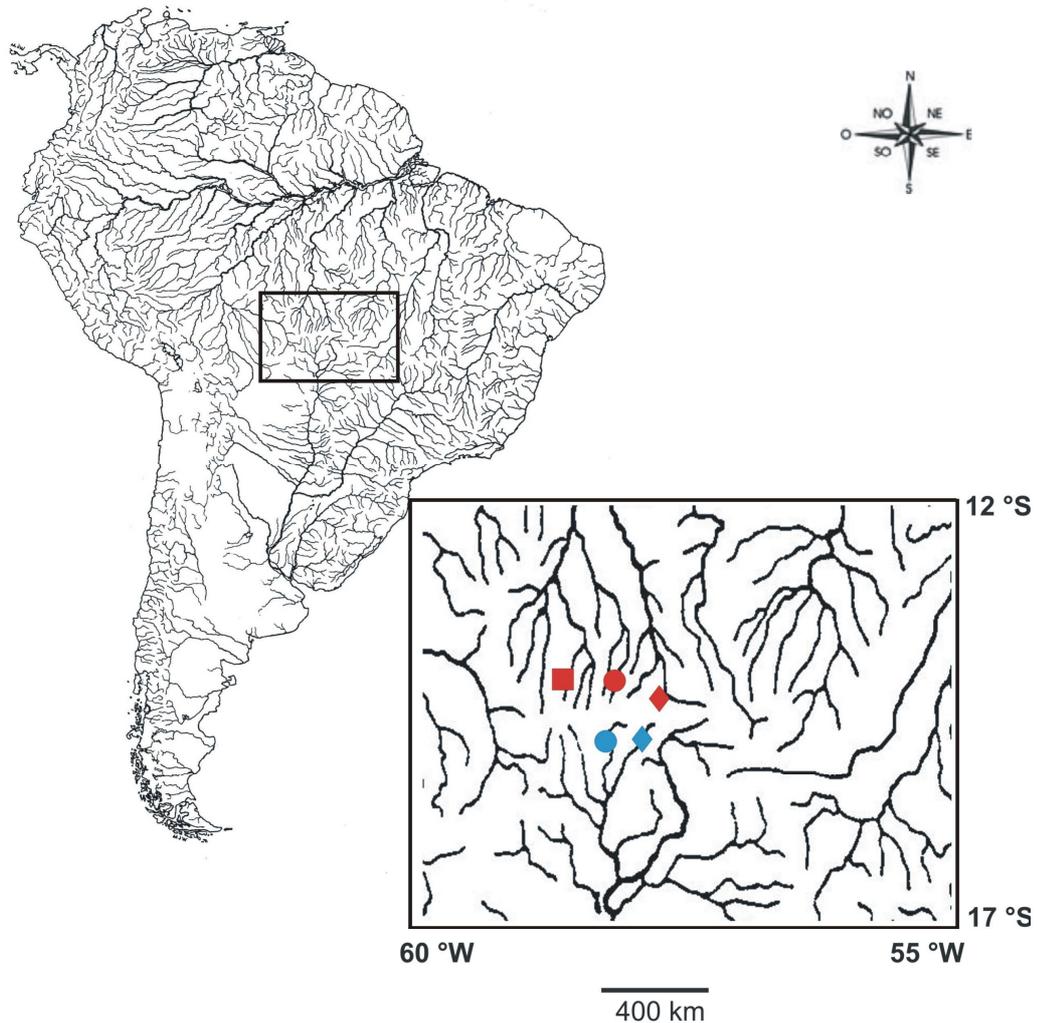
Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a diversidade cariotípica de *Hoplias malabaricus* de rios pertencentes à bacia amazônica e a do Paraguai no Estado do Mato Grosso, permitindo uma compreensão mais objetiva dos efeitos da geomorfologia nos caracteres citogenéticos deste complexo de espécies.

### MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de populações de *H. malabaricus* foram coletadas em três rios da bacia amazônica, sendo todos eles afluentes do Juruena, afluente da margem direita do rio Amazonas. Na bacia do Alto Paraguai, foram coletados no rio Sepotuba, no córrego Joaquim do Boche e na calha do rio Paraguai (Tabela 3). Os pontos de coleta, tanto da bacia amazônica quanto da bacia do Paraguai estão localizados no Estado do Mato Grosso (Fig. 1).

**Tabela 3.** Locais de coleta de *H. malabaricus*.

Localidade	Bacia	Coordenada Geográfica	Tamanho Amostral
rio Sangue (Campo Novo do Parecis)	bacia amazônica	13° 46' 27.75" S 57° 45' 04.93" O	4 machos e 6 fêmeas
rio Papagaio (Sapezal)	bacia amazônica	13° 33' 36.70" S 58° 24' 22.64" O	8 machos e 6 fêmeas
rio Arinos (Diamantino)	bacia amazônica	13° 36' 01.16" S 56° 25' 03.04" O	4 machos e 5 fêmeas
rio Sepotuba (Tangará da Serra)	bacia do Paraguai	14° 44' 09.51" S 57° 48' 51.91" O	15 machos e 8 fêmeas
rio Paraguai (Barra do Bugres)	bacia do Paraguai	15° 07' 58.66" S 57° 14' 05.74" O	6 machos e 3 fêmeas
córrego Joaquim do Boche (Tangará da Serra)	bacia do Paraguai	14° 38' 25.70" S 57° 32' 13.14" O	1 macho e 3 fêmea



**Figura 1.** Locais de coleta de *H. malabaricus*. Em vermelho os rios Papagaio (quadrado), Sangue (círculo) e rio Arinos (losângo) bacia do rio Amazonas. Em azul os rios Sepotuba e Córrego Joaquim do Boche (círculo) e Paraguai (losângo), bacia do rio Paraguai.

A obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos seguiu o protocolo proposto por Bertollo *et al.* (1978). Em seguida, foram aplicadas as técnicas de Banda C (Sumner, 1972) a fim de evidenciar as regiões heterocromáticas e impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980) para a identificação das regiões organizadoras de nucléolo NOR. Técnica de Fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DAPI para observação de regiões ricas em CG/AT, respectivamente, seguiu protocolo de Schweizer (1980). As metáfases foram analisadas em um microscópio Olympus CX41 e fotografadas em um microscópio Carl Zeiss, modelo 518N com uma objetiva de 100x, ligado a uma câmera digital Canon Power Shot A620. Fotos de trabalhos publicados foram digitalizadas e utilizadas para comparações com os dados obtidos. Para a determinação do número diplóide, foram analisadas aproximadamente vinte

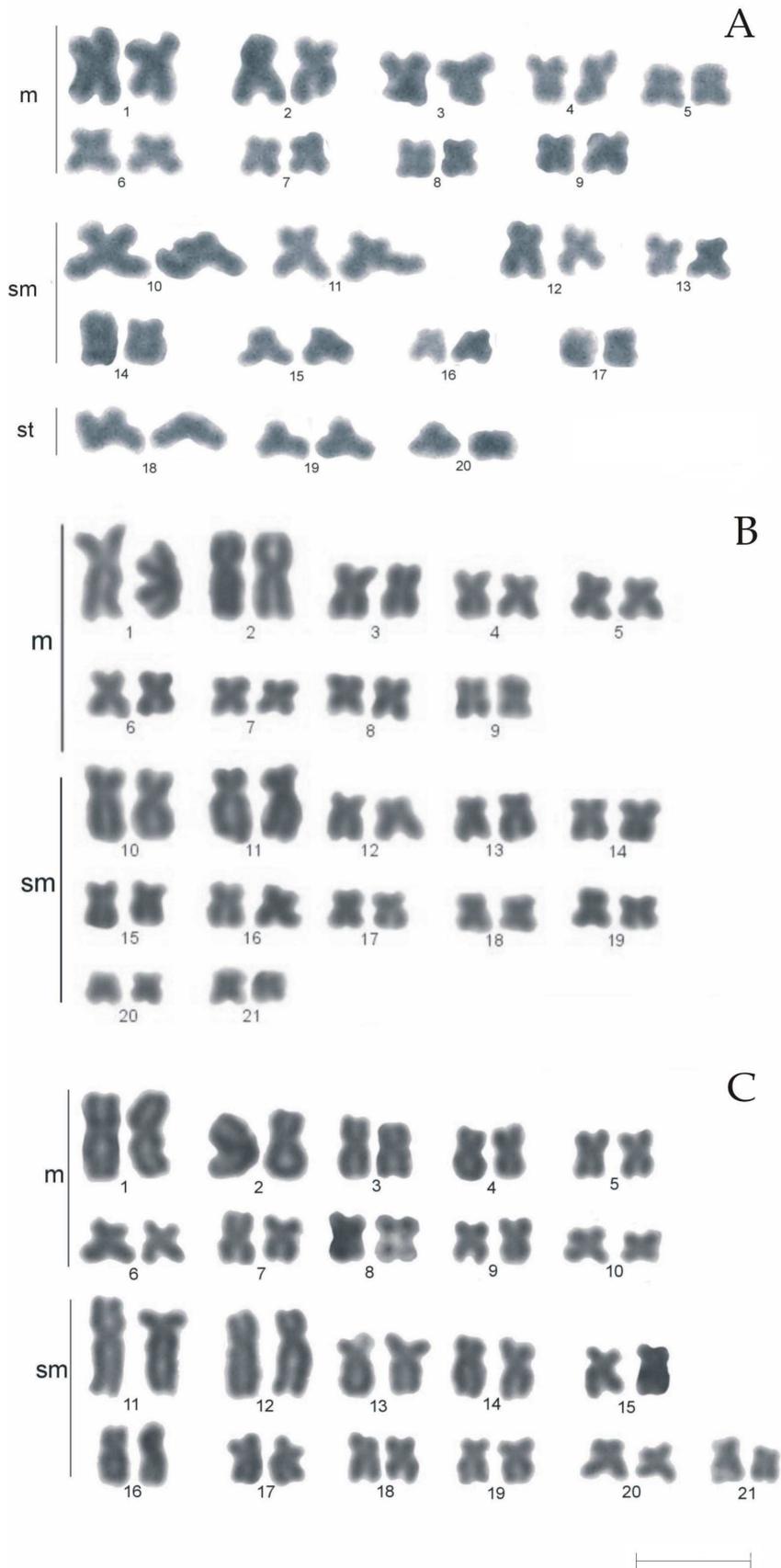
metáfases de cada indivíduo e as melhores foram selecionadas e usadas para a montagem do cariótipo. Os cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtlocêntrico (st), de acordo com a razão de seus braços (Levan *et al.*, 1964).

## RESULTADOS

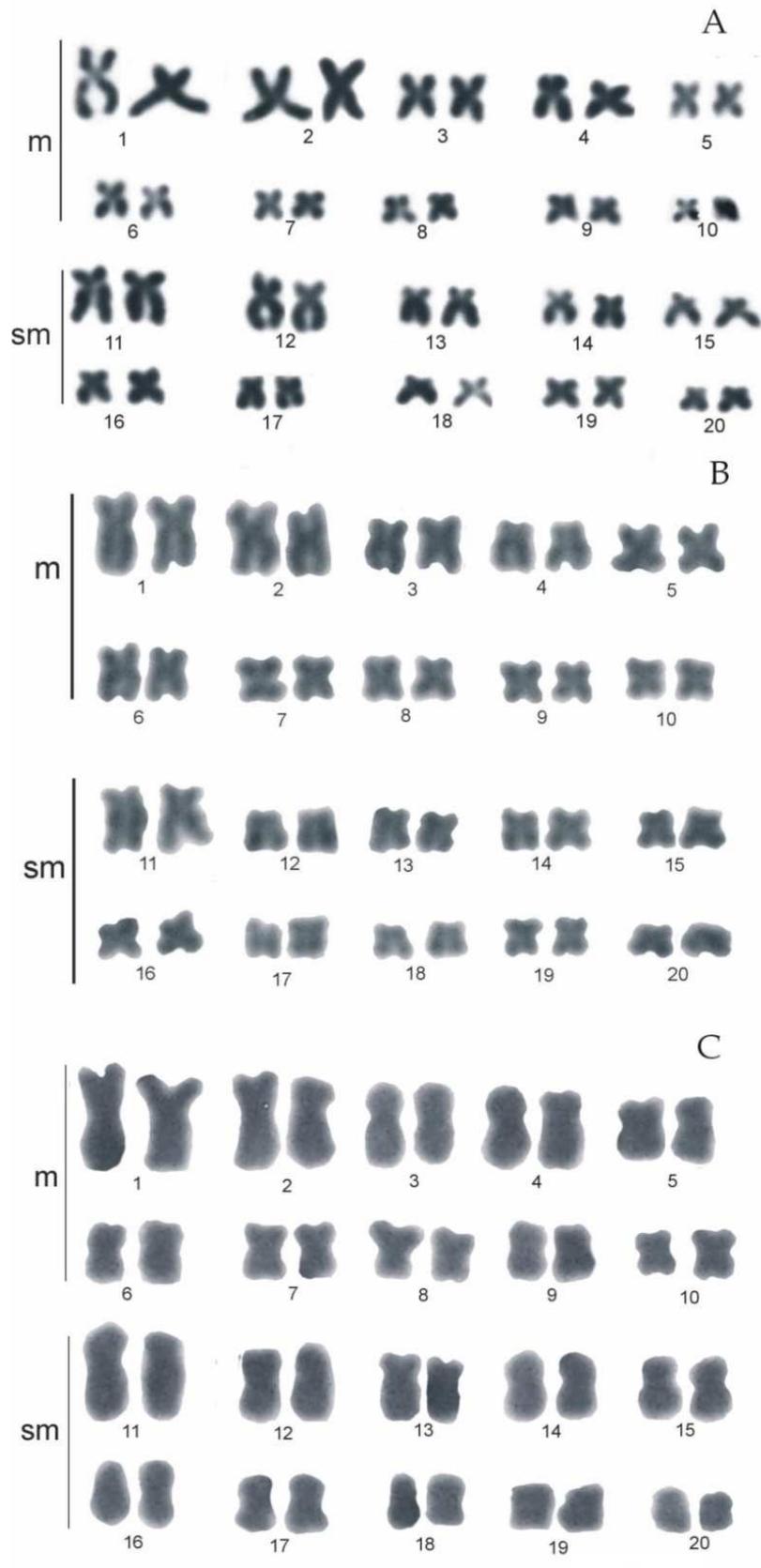
### Cariótipos

Foram analisados 69 espécimes de *H. malabaricus*, 33 deles em rios da bacia amazônica e 36 indivíduos da bacia do Paraguai. Utilizando coloração convencional, foram caracterizadas populações com número diplóide  $2n=40$  e  $2n=42$ , todas elas em alopatria. Na bacia amazônica, apenas os espécimes do rio do Sangue apresentaram  $2n=40$  em ambos os sexos. A fórmula cariotípica foi de  $18\ m + 16\ sm + 6\ st$  e o número fundamental (NF) igual a 80 (Fig. 2A). Os espécimes coletados no rio Papagaio apresentaram número diplóide de  $2n=42$  e fórmula cromossômica de  $18\ m + 24\ sm$  e NF igual 84. Foi possível observar que os pares 1, 2, 10 e 11 eram maiores que os demais do complemento (Fig. 2B). O número diplóide dos espécimes do rio Arinos também foi de  $2n=42$ , a fórmula cromossômica foi  $20\ m + 22\ sm$  e NF=84. Os primeiros pares submetacêntricos (11 e 12) também se destacaram por serem maiores que os demais do complemento (Fig. 2C).

Nos espécimes coletados nos rios da bacia do Paraguai não foi observada variação quanto ao número diplóide, morfologia cromossômica e número fundamental. Indivíduos de ambos os pontos de coleta. Todos eles apresentaram número diplóide de  $2n=40$  e fórmula cromossômica  $20\ m + 20\ sm$  e NF=80. Não se observou sistemas de cromossomos sexuais (Fig. 3A, 3B e 3C).



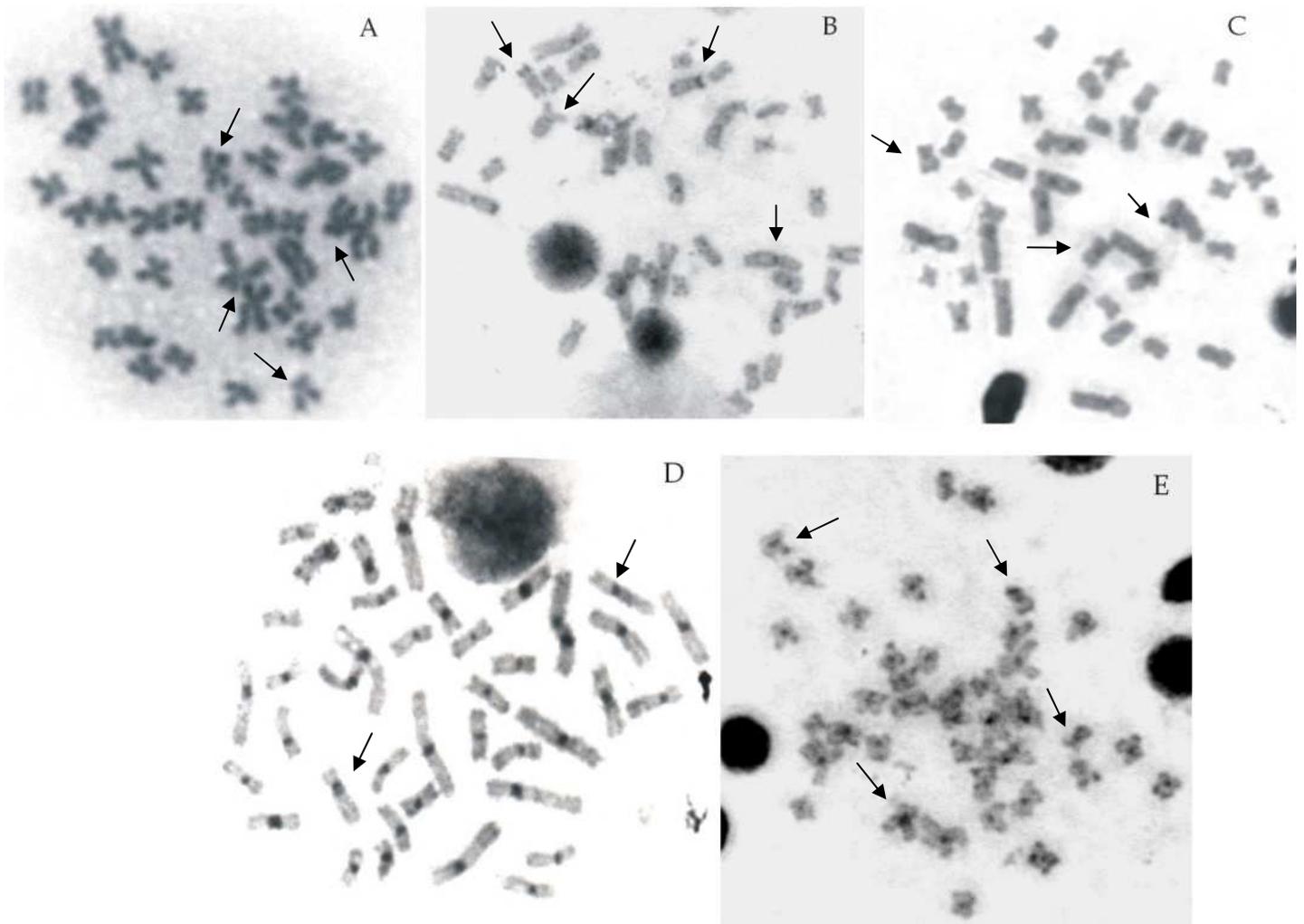
**Figura 2.** Cariótipos de *H. malabaricus* da bacia Amazônica. (A) rio do Sangue - Campo Novo do Parecis; (B) rio Papagaio - Sapezal; (C) rio Arinos Diamantino. Barra = 5 μm.



**Figura 3.** Cariótipos de *H. malabaricus* da bacia Paraguai. (A) rio Sepotuba - Tangará da Serra; (B) rio Paraguai -Barra do Bugre; (C) córrego Joaquim do Boche - Tangará da Serra. Barra = 5  $\mu$ m.

### Bandamento C e Técnica de Cromomicina 3

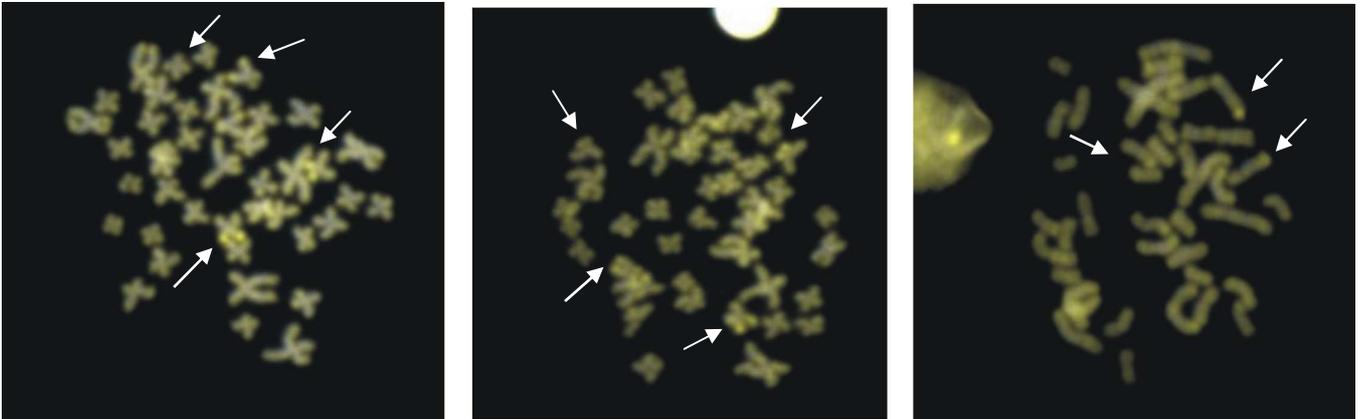
Todas as populações de *H. malabaricus* caracterizaram-se por apresentar regiões heterocromáticas predominantemente centroméricas e alguns cromossomos com blocos heterocromáticos em regiões teloméricas (Fig. 4).



**Figura 4.** Metáfase de bandamento C em *H. malabaricus*. (A) rio do Sangue; (B) rio Papagaio; (C) rio Arinos; (D) rio Sepotuba; (E) rio Paraguai. Setas indicam os blocos heterocromáticos.

Blocos de heretocromatina foram observados em associação com regiões organizadoras de nucléolos. Somente os espécimes do rio Papagaio foram submetidos ao tratamento de fluorescência. Após o tratamento de dupla coloração com fluorocromos base específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) marcando regiões ricas em GC e DAPI evidenciando regiões ricas em AT, observou-se marcações em

regiões teloméricas da maioria dos cromossomos e marcações positivas para as regiões organizadoras de nucléolos (Fig. 5).

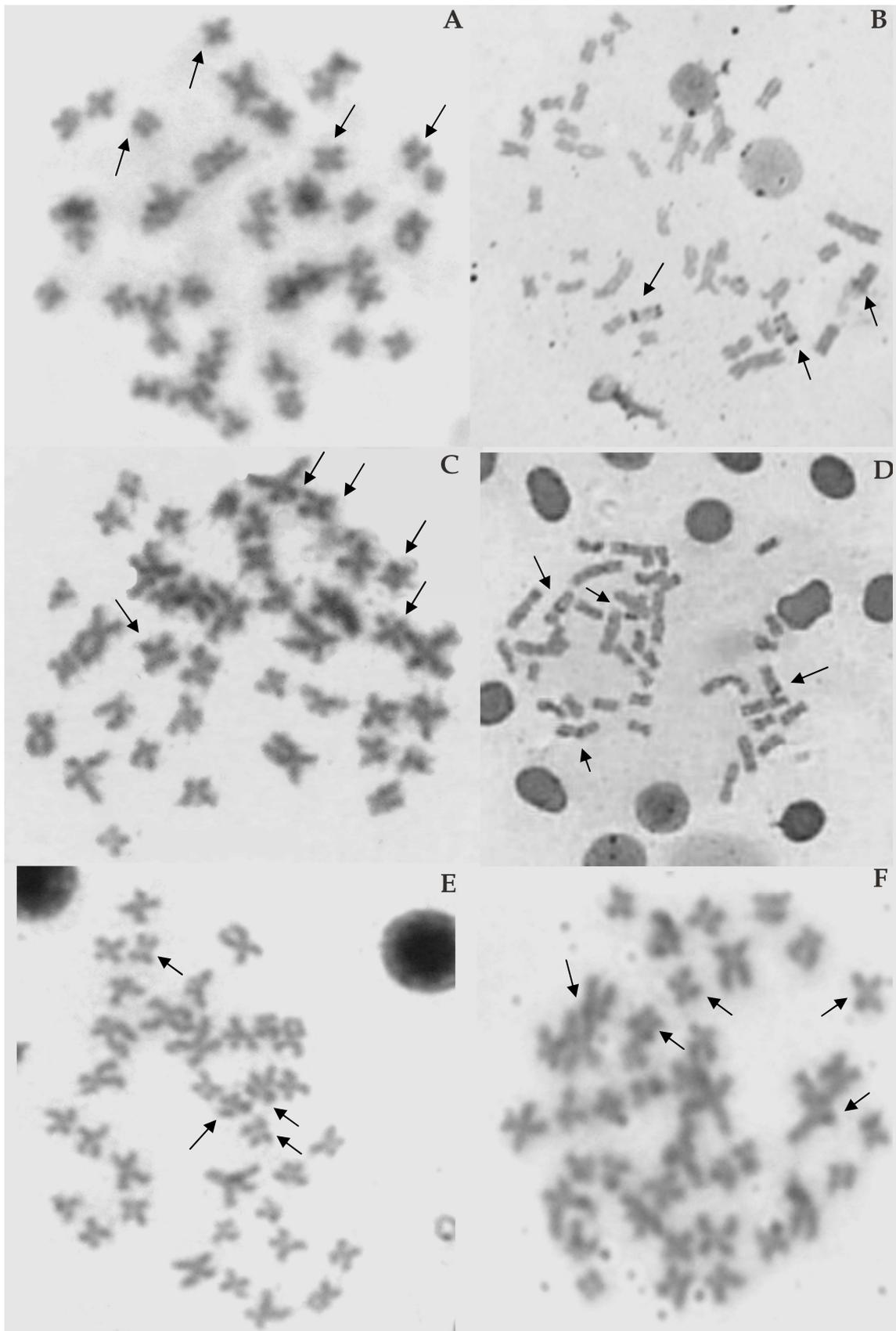


**Figura 5.** Técnica de CMA<sub>3</sub> em indivíduos da população do Rio Papagaio - bacia amazônica. As setas indicam as regiões ricas em GC.

### **Bandamento Ag-Nor**

Com a impregnação de nitrato de prata notou-se uma variação na quantidade de cromossomos com cistrons de rDNA. Todos os indivíduos analisados apresentaram NORs biteloméricas, onde ambos os braços de um mesmo cromossomo eram portadores de regiões organizadoras de nucléolo. As regiões organizadoras de nucléolos variam em número de três a cinco cromossomos.

O indivíduos do rio do Sangue e rio Arinos apresentaram NORs múltiplas em cromossomos metacêntricos menores e biteloméricas. Nos espécimes do rio Papagaio visualizou-se um par de cromossomos submetacêntricos portadores de NORs biteloméricas. O mesmo ocorreu com os indivíduos coletados nos rios pertencentes a bacia do Paraguai (Fig. 6).



**Figura 6.** Metáfase de bandamento NOR em *H. malabaricus*. (A) rio do Sangue; (B) rio Papagaio; (C) rio Arinos; (D) rio Sepotuba; (E) rio Paraguai; (F) córrego Joaquim do Boche. Setas indicam as regiões organizadoras de nucléolo.

## DISCUSSÃO

*Hoplias malabaricus* é uma das espécies mais estudada na América do Sul sob o ponto de vista citogenético com amostragens que abrangem 32 regiões distintas. Considerando os citótipos reconhecidos por Bertollo *et al.* (2000), os espécimes coletados nos rios Sepotuba, Paraguai e córrego Joaquim do Boche, pertencentes à bacia do Paraguai, têm características semelhantes ao citótipo 40/C, apresentando macroestrutura cariotípica estável em machos e fêmeas. Os dados obtidos nesse estudo também confirmam a distribuição biogeográfica esperada desse citótipo que já foi observado em rios das bacias do Tocantins-Araguaia, amazônica, Paraguai e Paraná (Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo *et al.*, 2000; Lopes & Fenocchio, 1994; Lopes *et al.*, 1998; Jorge, 1995). Especificamente no estado do Mato Grosso, esse citótipo foi observado no extremo norte do estado em Aripuanã e na região centro-sul, no rio Cuiabá (Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo *et al.*, 2000).

Em um estudo de citogeografia para eritrinídeos na região do médio Araguaia Mato-Grossense, Vitorino *et al.* (2007) notaram a ocorrência de duas populações de *H. malabaricus*  $2n=40$  e cariótipo composto de cromossomos meta e submetacêntricos e ainda, uma população de  $2n=40$  com mecanismo simples de determinação sexual XX/XY, observado apenas para população com  $2n=42$  citótipo B do Parque Estadual do Rio Doce.

Embora os espécimes analisados dos rios Arinos e Papagaio tenham o mesmo número diplóide ( $2n=42$ ), as amostras de cada rio diferem na sua fórmula cromossômica. A fórmula cariotípica do citótipo do rio Arinos é semelhante à do citótipo A indicado por Bertollo *et al.* (2000). Essa configuração ocorre também no igarapé Mindu na bacia amazônica e em Araguaiana na bacia do Tocantins. Na bacia do Alto Paraguai, este citótipo ocorre no rio Poconé. Também ocorre no rio Iguaçu na bacia do Baixo Paraná (Vicari, *et al.*, 2003; 2006) e na bacia do rio São Francisco em Três Marias (Bertollo *et al.*, 2000), caracterizando uma das mais amplas distribuições na região neotropical. O citótipo do rio Papagaio difere do citótipo na fórmula cariotípica  $18 m + 24 sm$ , resultado de um provável rearranjo cromossômico.

O citótipo do rio Sangue diferenciou-se dos coletados nos rios Papagaio e Arinos por apresentar número diplóide  $2n=40$ . Além das classes cromossômicas meta e submetacêntricas, também apresentaram cromossomos subtelo-cêntricos

perfazendo uma fórmula cariotípica de  $18m+16sm+6st$ . Comparando com os citótipos já descritos, essa população de *Hoplias malabaricus* não corresponde a nenhum citótipo citado por Bertollo *et al.* (2000). Os citótipos com número diplóide  $2n=40$  (C, F e G) diferem dos espécimes analisados, pois não tem cromossomos subtelocêntricos. Os citótipos C e F têm apenas cromossomos meta e submetacêntricos, enquanto o citótipo G tem um cromossomo do tipo telocêntrico e apresenta um sistema de cromossomo sexual múltiplo. A presença de cromossomos subtelocêntricos nos espécimes do rio Sangue pode ter sido originada por rearranjos cromossômicos, por isso infere-se que esses espécimes se tratam de um citótipo não descrito. Considerando os dois grupos cromossômicos maiores (I e II) para *H. malabaricus*, propostos por Bertollo e colaboradores (2000), esse citótipo do rio Sangue seria mais próximo, evolutivamente, do grupo I. Pois nesse grupo os cromossomos metacêntricos mantêm certa uniformidade no tamanho quando comparados com o grupo II, caracterizado pela presença de um par de cromossomos metacêntrico bem maior que os demais. Considerando a seqüência de letras proposta por Bertollo *et al.* (2000), este citótipo corresponde ao citótipo 40 H.

Sumner (2003) discutiu alguns papéis desempenhados pela heterocromatina constitutiva. Em alguns casos ela pode afetar no número de quiasmas e sua distribuição, pois a presença de blocos heterocromáticos inibe a formação de quiasmas ao seu redor. O autor ainda associou a heterocromatina ao o efeito de posição dado pelo silenciamento de genes e ao processo de segregação cromossômica. Além disso, existem algumas evidências de que a heterocromatina pode conter genes e outras seqüências funcionais de DNA que podem ter importantes funções, tais como, restabelecer a região telomérica dos cromossomos, de corpo de guarda para proteger a eucromatina contra agentes mutagênicos (Sumner, 2003).

A heterocromatina constitutiva é freqüentemente associada à evolução cariotípica de vários organismos, inclusive peixes (Almeida-Toledo, 1998). Na bacia do rio Doce, dados citogenéticos de populações de *H. malabaricus* em populações isoladas há 10.000 anos apresentam diferenças conspícuas no padrão de heterocromatina sem alterações da macroestrutura cariotípica, sugerindo diferenciação intraespecífica (Jacobina, 2008). O mesmo é observado em populações de *Astyanax bimaculatus* (Fava, 2008).

A distribuição dos blocos heterocromáticos principalmente na região centromérica de todos os cromossomos e em regiões teloméricas de alguns cromossomos dos espécimes analisados concordam com dados já observados em *Hoplias malabaricus* por outros autores (Bertollo *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 2002; Born & Bertollo 2000; Born & Bertollo 2006; Vicari *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2005; Vicari *et al.*, 2003; Jacobina 2008). Ainda é possível observar que esses blocos de heterocromatina são pequenos nos espécimes coletados tanto nos rios Arinos, Papagaio e Sangue da bacia amazônica quanto nos rios Paraguai e córrego Joaquim do Boche da bacia do Paraguai. Porém na população do rio Sepotuba evidenciou blocos heterocromáticos mais conspícuos que as demais populações analisadas. Estudos realizados por Vicari *et al.* (2003) com populações de *H. malabaricus* do rio Iguaçu, permitiram identificar polimorfismos de tamanho dos blocos heterocromáticos no par cromossômico 16 (submetacêntrico) localizados perto da região centromérica, apresentando um tamanho normal (r=reduzida) ou tamanho maior (d=duplicada). Os autores classificaram três fenótipos distintos dentro da população. O fenótipo rr mostrou uma frequência 70,6%, seguido pelo fenótipo rd e dd, que foram encontrados em 23,5% e 5,95% nas amostras, respectivamente. Logo, blocos heterocromáticos grandes são menos frequentes para a espécie. Considerando todos esses achados, conclui-se que as diferenças de blocos heterocromáticos entre as populações estudadas são diferenciações populacionais intraespecíficas.

Ag-NORs não visualizam propriamente o rDNA e sim um complexo de proteínas ácidas residuais associadas com o centro fibrilar dos nucléolos e pré-RNA nascente, como a nucleolina envolvida na clivagem do pré-RNA (Jordan, 1987; Sumner, 2003). A impregnação por prata é utilizada para investigar a expressão do rDNA, possibilitando a visualização somente de NORs ativadas no último ciclo celular (Sumner, 2003), o que torna o número e a localização dos sítios de regiões organizadoras de nucléolos variável, podendo apresentar polimorfismo entre indivíduos da mesma espécie e dentro do mesmo indivíduo.

As Ag-NORs aparecem bastante variáveis nos peixes. Entre os grupos neotropicais, por exemplo, existem famílias mostrando apenas um par de regiões organizadoras de nucléolos, NORs múltiplas ou ambas as situações (Almeida-Toledo & Foresti, 1985; Porto *et al.*, 1992; Bertollo, 1996; Galetti Jr., 1998; Ferro *et al.*, 2001). A família Cichlidae tem o número de NORs altamente conservado, sendo

que todas as espécies caracterizadas citogeneticamente apresentam um único par de cromossomo portador de NOR (Feldberg *et al.*, 2003). Em estudos realizados com populações *Astyanax scabripinnis*, Souza (1996) constatou que o número de cromossomos que carregavam cluster de NOR impregnados por prata variou de 1 a 6 cromossomos. Ferro *et al.* (2001) ao analisarem quatro populações de *A. scabripinnis* em Campos do Jordão (bacia do rio Sapucaí-Guaçu) observaram que o principal par cromossômico portador de NOR era o par 10 do complemento (submetacêntrico) com marcação constante no braço curto do cromossomo.

Em *Hoplias malabaricus* as NORs freqüentemente são múltiplas com números variando entre três a sete. Esse padrão é comumente reportado para a família Erythrinidae, onde o máximo de 10 cromossomos marcados por nitrato de prata foi observado em populações analisadas até então (Bertollo, 1996). Outra característica que tem se observado com freqüência é a NOR bitelomérica, onde ambos os braços do mesmo cromossomo possuem cistrons de rDNA (Bertollo, 1996). Essas características quanto às regiões organizadoras de nucléolos foram observadas em estudos realizados com populações das bacias do São Francisco e Alto Paraná (Dergam & Bertollo, 1990), Río Aguapey, na Argentina (Lopes *et al.*, 1998), rio Doce (Born & Bertollo, 2000; Jacobina, 2008) e várias populações da bacia do rio Iguaçu (Lemos *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2003; 2005; 2006). Na maioria das populações analisadas notam-se blocos heterocromáticos associados às regiões organizadoras de nucléolos. Em espécies dos gêneros *Leporinus*, *Triportheus* e *Hoplias* esse tipo de associação pode ser vista em cromossomos sexuais (Molina *et al.*, 1998; Artoni *et al.*, 1999; Born & Bertollo, 2000; Artoni & Bertollo, 2000).

Quando os espécimes do rio Papagaio foram submetidos à dupla coloração de fluorescência CMA<sub>3</sub>/DAPI, observou-se que as regiões ricas em GC coincidem com as NORs, também é possível notar fluorescência em regiões teloméricas de outros cromossomos. Em peixes (Pendás *et al.*, 1993; Galetti, 1998; Almeida-Toledo, 1998) e anfíbios (Schmid, 1982), as NORs normalmente são positivas para fluorocromos de base específica - CG (Vicari *et al.*, 2003). Entretanto, sabe-se que nem todas as regiões marcadas por cromomicina correspondem ao locus de rDNA (Martinez *et al.*, 1991; Artoni *et al.*, 1999), algumas regiões heterocromáticas respondem positivamente ao tratamento com fluorocromo específico-GC, principalmente quando associadas às NORs (Molina, 1995). No caso dos espécimes do rio Papagaio a associação dos blocos heterocromáticos com as NORs e

marcações positivas para regiões ricas em GC (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>), sugerem que os genes de rDNA estejam intercalados com bandas de heterocromatina (Pendás *et al.*, 1993). Essa correlação foi observada em populações de *Astyanax scabripinnis* (Souza & Moreira-Filho, 1995; Souza *et al.*, 2001), em populações de salmonídeos (Sánchez *et al.*, 1990; Lozano *et al.*, 1991; Pendás *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1998) e também ocorre em *H. malabaricus* (Vicari *et al.*, 2003; 2005; 2006; Jacobina, 2008; entre outros).

A região Neotropical exhibe um padrão biogeográfico complexo e várias hipóteses baseadas em diferentes processos têm sido propostas para explicar a origem da riqueza de espécies tropicais e padrões de distribuição na América do sul (Hubert & Renno, 2007). Nos neotrópicos, rompimentos dos sistemas de drenagem por formação de novas bacias hidrográficas promoveram vicariância, divergência alopatrica e, assim, diversificação biótica (Lundberg *et al.*, 1998). Os rios das Américas Central e do Sul possuem a fauna de peixes de água doce mais diversa do mundo, com aproximadamente 6000 espécies das 13000 espécies previstas (Reis *et al.*, 2003).

Grande parte da diversificação da ictiofauna neotropical e de outros organismos aquáticos teve lugar na alteração das dinâmicas de rios e bacias hidrográficas na América do Sul durante o Cretáceo tardio Cenozóico, com a separação da África da América do Sul e a formação do Atlântico sul, tornando-se agente e produto do cenário da evolução. Desde então, o continente apresenta um processo de compressão, do qual os Andes são o resultado mais evidente (Lundberg *et al.*, 1998).

Estudos de biogeografia filogenética de peixes de água doce iniciados na década de 80 (Weitzman & Weitzman, 1982; Vari, 1988, 1989a,b; Vari & Weitzman, 1990) apoiaram a idéia de que uma diversificação importante dessa ictiofauna aconteceu no Pleistoceno, contrapondo a hipótese refúgio como a principal explicação de padrões biogeográficos para níveis taxonômicos superiores. Compreensões recentes das perspectivas paleontológicas confirmaram que a fauna era essencialmente moderna durante o Mioceno tardio (25-2,5 Milhões de anos -Ma) e o estabelecimento das principais drenagens Neotrópicas, como Amazona, Paraná e Orinoco, ocorreram durante os últimos 10 Ma. A elevação andina forneceu novos habitats aquáticos altitudes, enquanto que períodos de subsidência da bacia do antepaís permitiram a formação de extensos ambientes de lagos (Lundberg *et al.*,

1998). A princípio rios e lagos estavam dispostos de forma paralela à Cordilheira do Andes e após sua elevação, os corpos d'água direcionaram-se de forma transversal e oblíqua em direção ao oceano Atlântico.

A formação do divisor Andino e de outras drenagens, mudanças nos cursos de rios, incursões e regressões de águas marinhas provavelmente acarretaram em muitos eventos vicariantes que justifica a diversificação da ictiofauna Neotropical tanto em nível morfológico quanto em nível citogenético. Nossos dados confirmam que a diversificação cariotípica do complexo *H. malabaricus* ocorreu muito antes do isolamento das bacias amazônica e do Paraguai, há 10 milhões de anos.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- Os espécimes de *H. malabaricus* coletados nos rios Papagaio e Arinos apresentaram número cromossômico de  $2n=42$ , com macroestrutura composta por cromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos;
- As populações do rio Papagaio e Arinos diferiram na fórmula cariotípica, onde os espécimes do rio Arinos apresentaram 20 cromossomos metacêntricos e 22 submetacêntricos ( $20m+22sm$ ), enquanto espécimes do rio Papagaio apresentaram 18 metacêntricos e 24 submetacêntricos, mas mantiveram o mesmo número fundamental de 84;
- A população do rio Sangue se mostrou diferente das demais populações da bacia amazônica, pois apresentou número cromossômico de  $2n=40$  composto de três classes cromossômicas: 18 metacêntricos + 16 submetacêntricos + 3 subtelo-cêntricos e número fundamental igual a 80;
- A população do rio Sangue pode ser considerada um novo citótipo, visto que se diferencia dos demais citótipos mencionados por Bertollo *et al.* (2000);
- A população da bacia do rio Paraguai se mostrou conservada quanto ao número diplóide e morfologia cromossômica, apresentando  $2n=40$  para todas as populações analisadas.
- A distribuição dos blocos heterocromáticos pode ser observada nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e teloméricas de alguns, coincidindo com regiões organizadoras de nucléolos (Banda C<sup>+</sup>);
- As regiões organizadoras de nucléolos variaram em número (de três a cinco), mas sua localização se manteve nas regiões teloméricas de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. O padrão de NORs múltiplas foi observado tanto para as populações da bacia amazônica quanto para as da bacia do Paraguai, mas somente as populações da bacia amazônica apresentaram NORs biteloméricas.
- As regiões organizadoras de nucléolos se mostraram ricas em GC quando submetidas ao fluorocromo base-específico CMA<sub>3</sub>, o fluorocromo DAPI serviu como contra-corante, não marcando nenhuma região rica em AT;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TOLEDO L. F. Cytogenetic markers in Neotropical fishes. In: MALABARBA, L. R., REIS, R. E., VARI R. P., LUCENA, Z. M. S., LUCENA, C. A. (eds): **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 583–588, 1998.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. & FORESTI, F. As Regiões Organizadoras de Nucléolo em Peixes. **Ciência e Cultura**, v. 37, p. 448-453, 1985.
- ARTONI, R. F., MOLINA, W.F., BERTOLLO, L. A. C. & Galetti Jr, P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**. v. 22, p. 39-44, 1999.
- ARTONI, R. F., VICARI, M. R. & BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes Neotropicals: Métodos, resultados e perspectivas. **Publicatio Uepg**. Ponta Grossa, v. 06, p. 43-60, 2000.
- BERMINGHAM, E. & MARTIN, A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 499–517, 1998.
- BERTOLLO, L. A. C. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia**. v. 61, p. 75-81, 1996.
- BERTOLLO, L. A. C., BORN, G. G., DERGAM, J. A., FENOCCHIO, A. S. & MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**. V. 8, p. 603-613, 2000.
- BERTOLLO, L. A. C., FONTES, M. S., FENOCCHIO, A. S. & CANO J. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Research**. v. 5, p. 493-499, 1997<sup>a</sup>.
- BERTOLLO, L. A. C. & MESTRINER, C. A. THE X1X2Y SEX CHROMOSOME SYSTEM IN THE FISH HOPLIAS MALABARICUS. II. MEIOTIC ANALYSES. **Chromosome Research**, v. 6, p. 141-147, 1998.
- BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA-FILHO, O. & FONTES, M. S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n = 40 chromosomes. **Brazil Journal Genetics**. v. 20, p. 237-242, 1997<sup>b</sup>.
- BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetics**, v. 1, p. 103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**. v. 48, p. 1-12, 1983.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetics**, v. 2. P. 17-37, 1979.

BÖHLKE, J. E., WEITZMAN, S. H. & MENEZES, N. A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica**. v. 8, p. 657-677, 1978.

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

BORN, G. G. & BERTOLLO L. A. C. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with 2n=42 chromosomes. **Genetica**. v.110, p. 1-9, 2001.

BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Biology: São Carlos**. v. 66, p. 205-210, 2006.

DERGAM, J. A. & BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 13, p. 755-766, 1990.

DERGAM, J. A., PAIVA, S. R., SCHAEFFER, C. E., GODINHO, A. L. & VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 25, p. 379-387, 2002.

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

FELDBERG, E., PORTO, J. I. R. & BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: **Fish Adaptation**. Val, A. L. & B.G. Kapoor. (Eds.). New Dehli & New York: IBH & Oxford, 287-310, 2003.

FERRO, D. A., DE MARCO, NÉO, D. M., MOREIRA FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18s and 5s rDNA in *astyanax scabripinnis* (pisces, characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica (The Hague)**. Holanda: v. 110, p. 55-62, 2001.

FUJIWARA A., ABE, S., YAMAZAKY, F. & CANO, J. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organized regions in salmonid fishes. **Chromosome Research**. v. 6, p. 463-471, 1998.

GALETTI JR, P. M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology**. v. 65, p. 53–56, 1998.

GUERRA, M. **Introdução À Citogenética Geral**. Editora Guanabara Rio de Janeiro, Brasil. 1988.

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

JACOBINA, U. P. **Variação Cariotípica em Populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) em Lagos do sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Programa de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

JORDAN, G. At the heart of the nucleolus. **Nature**. v. 329, p. 489-499, 1987.

JORGE, L. C. **Estudos citogenéticos comparativos de algumas espécies de peixes da região de Corrientes - Argentina com as do Alto Paraná**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Brazil. 1995.

LEMOS, P. M. M., FENOCCHIO, A. S., BERTOLLO, L. A. C. & CESTARI, M. M. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n = 42 group, from the first plateau of the Iguaçu river basin (Paraná State, Brazil). **Caryologia**. v. 55, p. 193-198, 2002.

LOPES, P. A. & FENOCCHIO, A. S. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). **Cytobios**. v. 80, p. 217:221, 1994.

LOPES, P. A., ALBERDI, A. J., DERGAM, J. A. & FENOCCHIO, A. S. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey river (Province of Corrientes, Argentina). **Copeia**. p. 485:487, 1998.

LOVEJOY, N. R. & DE ARAÚJO, M. L. G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**. v. 9, p. 259–268, 2000.

LOZANO, R., REJÓN, C. R. & REJÓN, M. R. An analysis of coho salmon chromatin by means of C-banding, AG- and fluorochrome staining, and in situ digestion with restriction endonucleases. **Heredity**. v. 66, p. 403-409. 1991.

LUNDBERG, J. G. African–South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: **Biological relationships Between Africa and South America** (ed. Goldblatt P), p. 156–199. Yale University Press, New Haven, CT, 1993.

LUNDBERG, J. G. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Malabarba L.R. *et al.* (eds) Edipucrs: Porto Alegre, Brasil. p 49-68, 1998.

LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERRERO, J., HORTON, B., MALABARBA, M. C. S. L., WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a History of tropical South America rivers. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Malabarba, LR *et al.* (eds). Edipucrs: Porto Alegre, Brasil. p 13-48, 1998.

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

MARTINEZ, P., VIÑAS, A., BOUZA, C., ARIAS, J., AMARO, R., SANCHEZ, L. Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of sea and brown trout from northwestern Spain. **Heredity**. v. 66, p. 9–17, 1991.

MARTINS, C., FERREIRA, I. A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., GALETTI JR, P. M. A. Tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiforme: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**. v. 127, p. 133-141, 2006.

MOLINA, W. F. **Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero Leporinus (Pisces, Anostomidae)**. MSc dissertation *Universidade Federal de São Carlos*. 1995.

MOLINA, W. F., SCHMID, M., GALETTI JR, P. M. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**. v. 94, p. 141–149, 1998.

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

MYERS, G. S. Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. **Reptile Smithsonian Institute**. p. 339-364, 1938.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons Ltd. New York. 3 ed, 1994.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae (Tetraodonidae). In: **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. REIS, R., E. KULLANDER, S.O. & FERRARI JR, C. J. (eds). Edipucrs: Porto Alegre. p.238-240. 2003

OYAKAWA, O. T. **Revisão sistemática das espécies do gênero Hoplias (grupo lacerdae) da Amazônia Brasileira e região leste do Brasil (Teleostei, Erythrinidae)**. MSc dissertation. Universidade de São Paulo, Brazil. 1990.

PENDÁS, A. M., MORÁN, P. & GARCIA-VÁSQUEZ, G. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 63, p. 28-130, 1993.

PORTO, J. I. R., FELDBERG, E., NAKAYAMA, C. & FALCÃO, J. N. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Revue D'Hydrobiologie Tropicale**, v. 25, n.4, p. 287–299, 1992.

REEDER, R. H. rRNA synthesis in the nucleolus. **Trends Genetics**, v.6, p. 390-395, 1990.

SABINO, J. & ZUANON, J. A stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 8, p. 201-210, 1998.

SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, P., BOUZA, C. & VINÃS, A. Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* with restriction enzymes. **Heredity**. v. 86, p. 241-249, 1990.

SCAVONE, M. D. P., BERTOLLO, L. A. C. & CAVALLINI, M. M. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios**. v. 80, p. 223-227, 1994.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**. v. 87, p. 327–444, 1982.

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

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

SOUZA, I. L. **Estudos citogenéticos em populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) pertencentes a dois riachos de diferentes bacias do Sudeste brasileiro**. MSc dissertation. Universidade Federal de São Carlos. 1996

SOUZA, I. L. **rDNAs nucleares e bandamentos cromossômicos nos caracídeos Salmininae e *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes)**, doctor Scientiae. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

SOUZA, I. L. & MOREIRA-FILHO, O. Método alternativo para uma melhor visualização dos cromossomos mitóticos nos estudos rotineiros em citogenética de vertebrados. **Ciência e Cultura**, v. 46, p.770, 1994.

SOUZA, I. L., MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex. II. Different cytotypes living in sympatry. **Cytologia**. v. 60, p. 273–281, 1995.

SOUZA, I. L., MOREIRA-FILHO, O. & GALETTI JR, P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 19, p. 405-410, 1996.

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

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304-306, 1972.

VARI, R. P. & MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview, In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Malabarba, LR *et al.* (eds). Edipucrs: Porto Alegre, Brasil, p 1-11. 1998.

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

VICARI, M. R., ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Animal Cytogenetics and Comparative Mapping**. v. 101, p. 24-28, 2003.

VICARI, M. R., PAZZA, R., ARTONI, R. F., MARGARIDO, V. P. & BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú river. **Brazilian Archives of biology and technology**. v. 49, p. 297-303, 2006.

Vitorino, C. A., Silva, L. P., Venere, P. C. & Souza, I. L. Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias malabaricus* (Traíra) e *Hoplerythrinus initaeniatus* (Jeju) do médio Araguaia. **Anais: VII Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)