

## Padrões citogenéticos de duas espécies de ciclídeos de bacias do semi-árido do Brasil: *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*

Wagner Franco Molina<sup>1</sup>, George Antunes Pacheco<sup>2</sup>, Waldir Miron Berbel Filho<sup>3</sup>

1. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pós-doutorado em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Professor Associado III da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: molinawf2@yahoo.com.br

2. Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Mestrando em Biologia, Museu de História Natural da Dinamarca, Universidade de Copenhague, Dinamarca. E-mail: geo\_pachii@ufrnet.br

3. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Mestre em Sistemática e Evolução, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: wldl\_mir123@ufrnet.br

**RESUMO:** A família Cichlidae é considerada um modelo para estudos de radiação adaptativa entre vertebrados. Contudo, dados citogenéticos com vistas ao entendimento da evolução cariotípica dessa família ainda são incipientes, sobretudo para espécies da região semi-árida do nordeste do Brasil. O presente estudo traz as primeiras informações cariotípicas das espécies neotropicais *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*, a partir de técnicas de coloração convencional, bandamento-C, impregnação argêntea e coloração com fluorocromos base-específicos. Ambas as espécies apresentam  $2n=48$  cromossomos, com distinções em relação ao cariótipo, onde *C. menezesi* exibe  $4m+44st/a$  ( $NF=52$ ) e *C. orientale*  $6sm+10st+32a$  ( $N=54$ ). Os sítios ribossomais são simples localizados nos braços curtos do primeiro par (m) em *C. menezesi* e no terceiro (sm) em *C. orientale*. Em ambas as espécies os blocos heterocromáticos concentraram-se as regiões centroméricas e pericentroméricas e de forma conspícua em colocalização com as RONs (CMA+/DAPI-). Entre os ciclídeos, o clado Neotropical revela um conservadorismo cromossômico numérico ( $2n=48$ ), mas que contempla um variado dinamismo evolutivo quanto aos padrões estruturais do cariótipo. As duas espécies analisadas, *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*, típicas de regiões semi-áridas, reforçam esta condição.

**Palavras-chave:** diversidade cariotípica, evolução cromossômica, citogenética de peixes.

### Cytogenetic patterns of two cichlid species from semi-arid basins of Brazil: *Crenicichla menezesi* and *Cichlasoma orientale*

**ABSTRACT:** The family Cichlidae is considered a model for studies of adaptive radiation among vertebrates. However, cytogenetic data focusing to understanding the karyotype evolution of this family are still incipient, particularly for species of semi-arid region of northeastern of Brazil. This study presents the first karyotypic information of neotropical species *Crenicichla menezesi* and *Cichlasoma orientale*, by use of conventional staining, C-banding, silver staining and staining with base-specific fluorochromes. Both species have  $2n=48$  chromosomes, with some distinctions in relation to karyotype, once *C. menezesi* displays  $4m+44 st/a$  ( $NF=52$ ) and *C. orientale*  $6sm+10st+32$  ( $N=54$ ). Ribosomal sites are unique, located on the short arms of the first pair (m) in *C. menezesi* and on third pair (sm) in *C. orientale*. In both species the heterochromatic blocks are concentrated in the centromeric and pericentromeric regions and conspicuously in colocalization with NORs (CMA+/DAPI-). Among cichlids, the Neotropical clade reveals a numerical chromosomal conservatism ( $2n=48$ ), but that includes a varied evolutionary dynamics as the structural patterns of the karyotype. The two species analyzed, *Crenicichla menezesi* and *Cichlasoma orientale*, typical species of semi-arid regions reinforce this condition.

**Keywords:** karyotype diversity, chromosomal evolution, fish cytogenetic.

#### 1. Introdução

Diversidade biológica representa a variedade de organismos vivos, presente nos diversos ecossistemas e as interações ecológicas dos quais eles fazem parte; isso inclui a diversidade dentro de espécies, entre espécies e do ecossistema (MAGURRAN, 2004). A diversidade insere-se em três vertentes principais, a diversidade genética, de espécies e de ecossistemas. A diversidade genética abrange a variação de sequências, genes e cromossomos dentro e entre populações (GASTON; SPICER, 2004). A identificação da biodiversidade é reconhecida como meta de máxima importância. Caracterizá-la apropriadamente propicia seu uso como recurso biológico e em última instância a sua manutenção (GROOMBRIDGE, 1992; FRANKHAN et al., 2008).

Dentre as áreas com alta diversidade, a região

Neotropical é a que agrega maior riqueza de espécies. Compreende desde o deserto de Sonora (entre México e Estados Unidos), até o sul da América do Sul, abrigando uma ictiofauna de 4.475 espécies (REIS et al., 2003), ou seja, cerca de 1/8 de toda a biodiversidade de vertebrados (VARI; MALABARBA, 1998). Nesta região, a maior riqueza de peixes de água doce encontra-se na América do Sul, principalmente na bacia Amazônica – entre 1.500 e 5.000 espécies de peixes (SANTOS; FERREIRA, 1999), seguida pela bacia do Paraná – com aproximadamente 600 espécies (BONETTO, 1986). Apesar disto, o conhecimento da diversidade e taxonomia de peixes de água doce neotropicais é ainda incipiente (MENEZES, 1992; ROSA; MENEZES, 1996), sobretudo no que diz respeito aos seus aspectos genéticos. Para as bacias interiores do Nordeste brasileiro, que perfazem a maior parte

dos ambientes aquáticos do bioma Caatinga, essa situação é ainda mais crítica uma vez que mesmo inventários ictiofaunísticos, apesar de terem sido iniciados no século XIX, ainda são escassos e localizados (ROSA et al., 2003).

Entre os peixes, a ordem Perciformes é a mais diversificada e a maior entre os vertebrados, e que compreende aproximadamente um terço de todos os peixes existentes (NELSON, 2006; HELFMAN et al., 2009). Neste grupo a família Cichlidae, considerada como um grupo basal da subordem Labroidae (HELFMAN et al., 2009), possui elevada diversidade e uma das poucas famílias de peixes tropicais cuja monofilia é bem estabelecida (MARESCALCHI, 2005). De fato, trata-se da família mais rica de peixes não-ostariófisianos de água doce, e uma das mais ricas famílias dos vertebrados, com pelo menos 1.300 espécies descritas, e aproximadamente 1.900 espécies estimadas, em uma visão conservadora. O número preciso da quantidade de gêneros e espécies ainda é indefinido para esse grupo. Distribuem-se desde América Central, América do Sul, África, Oriente médio, Madagascar, Índia e Sri Lanka (BERRA, 2001).

A biologia evolutiva tem devotado grande interesse ao estudo dos ciclídeos dos lagos africanos, diante de sua extraordinária radiação adaptativa, na qual aproximadamente 2.000 espécies têm evoluído nos últimos 10 milhões de anos (KOCHER, 2004). Por outro lado, tem sido despendida uma menor atenção aos aspectos evolutivos de espécies Neotropicas e de forma destacada àquelas distribuídas em regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil. Esta região desperta grande interesse diante das pressões seletivas sobre sua fauna íctica, sujeita a um baixo regime hídrico e elevadas temperaturas.

A família Cichlidae, presente em todos os rios e riachos do Brasil (BUCKUP, 1999), representa cerca de 6-10% dos peixes da região neotropical (KEENLEYSIDE, 1991), abrangendo cerca de 400 espécies (KULLANDER, 2003). Por sua complexidade ecológica, comportamental, vasta distribuição, processos especiativos e importância econômica, dispõem de uma sólida literatura científica nas mais diversas áreas (BERRA, 2001). Nas atuais estimativas de riqueza, número de linhagens e idade de radiação, os ciclídeos apresentam o mais rápido mecanismo de radiação em larga escala conhecido (TURNER, 1999). Desta forma, a diversidade e processos adaptativos em ambientes extremófilos, como regiões semiáridas, são particularmente interessantes como modelos evolutivos.

Recentes propostas filogenéticas têm sido endereçadas a grupos de ciclídeos Neotropicais (FARIAS, 2000; SPARKS, 2004; MARESCALCHI, 2005; SMITH et al., 2008). Os resultados apresentados indicam exemplos de complexas histórias taxonômicas, cuja história evolutiva em grande parte ainda não se encontra elucidada.

Entre as espécies neotropicais, pertencente à

subfamília Cichlinae distribuídas na América do Sul (KULLANDER, 2009), o gênero *Crenicichla* é reconhecido como o mais rico, compreendendo cerca de 80 espécies predadoras de corpos caracteristicamente alongados. Baseado em caracteres morfológicos (PLOEG, 1991; LUCENA; KULLANDER, 1992; KULLANDER; LUCENA, 2006) como forma corporal, número de escamas da linha lateral, presença ou ausência de marca humoral, o gênero *Crenicichla* é dividido em 9 grupos, *lugubris*, *acutirostris*, *lacustris*, *missioneira*, *reticulata*, *saxatilis*, *scotti*, *wallacii*, e *macrophthalma* (PLOEG, 1991; LUCENA; KULLANDER, 1992; KULLANDER; LUCENA, 2006). Entre estas, *Crenicichla menezesi* PLOEG, 1991 é predominante na região nordeste do Brasil, classificada no grupo *saxatilis*, demonstram geralmente pouca mobilidade encontrados em um mesmo local (PLOEG, 1991; GURGEL et al., 2002).

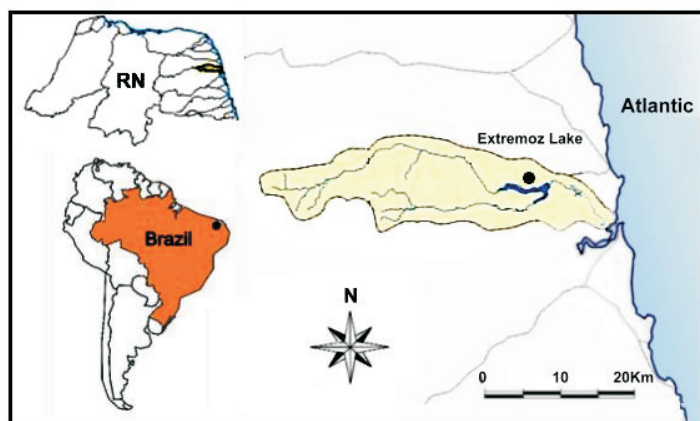
O gênero *Cichlasoma* compõe outro agrupamento de espécies com ocorrência em bacias das regiões semi-áridas sul-americanas. Este gênero não é considerado um agrupamento natural, sendo tratado como um gênero "catch-all" (KULLANDER, 1983), que até o presente momento, ainda mantém uma filogenia controversa e pouco resolvida (RÍCAN, 2008).

Análises genéticas têm contribuído para resolução de desafios de diversidade, sistemática e evolução em peixes. Entre as abordagens, a citogenética, tem propiciado novos dados voltados à identificação de espécies, inferências filogenéticas e processos específicos de carioevolução (ARAI, 2011).

Visto as escassas informações citogenéticas para os ciclídeos, em relação a sua diversidade e aspectos evolutivos, se faz necessário novas informações citogenéticas para um melhor conhecimento da diversidade genômica do grupo. Padrões biogeográficos associados às divergências cariotípicas propiciam condições para identificação da influência das barreiras físicas ou eventos vicariantes sobre a modelagem cariotípica de suas espécies. Diante disto, o presente estudo visou contribuir para a caracterização dos processos de evolução cariotípica nos gêneros *Crenicichla* e *Cichlasoma* da região nordeste do Brasil, através da análise das espécies *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*, através de técnicas de coloração convencional, impregnação argêntea, bandamento C, coloração com fluorocromos base-específicos, CMA<sub>3</sub> e DAPI.

## 2. Material e Métodos

Estudos citogenéticos foram realizados em amostras de *Crenicichla menezesi* (três fêmeas, quatro machos e dois indivíduos imaturos) e *Cichlasoma orientale* (dez machos e 9 fêmeas), proveniente da lagoa de Extremoz (5°42'45"S, 35°17'W), pertencente à bacia do rio Doce, no Estado do Rio Grande do Norte, região nordeste do Brasil (Figura 1). Os indivíduos foram sexados por visualização macro e microscópica das gônadas.



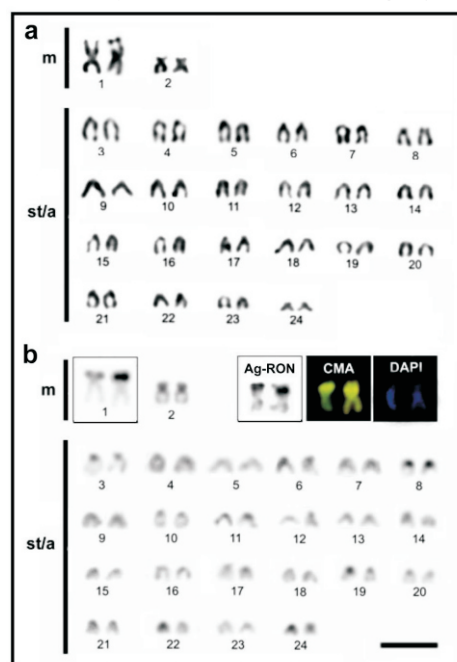
**Figura 1.** Mapa com a localização da lagoa de Extremoz, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

Os espécimes foram mitoticamente estimulados através da inoculação intramuscular de complexos de antígenos, por um período de 24 à 48h (MOLINA, 2001; MOLINA et al., 2010). Posteriormente foram anestesiados com óleo de cravo (Eugenol) e sacrificados para remoção de fragmentos do rim anterior. Os cromossomos mitóticos foram obtidos através preparações *in vitro* de acordo com GOLD et al. (1990). Resumidamente, fragmentos do rim anterior de cada indivíduo foram dissociados em 9,5 ml de meio de cultura RPMI 1640. Cinco gotas de colchicina à 0,025% foram adicionados ao meio de cultura, no qual a suspensão celular permaneceu por 28 minutos. A suspensão foi então centrifugada à 800 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspenso em 12ml de solução hipotônica de KCl 0,075M, à temperatura ambiente, por 25 minutos. Posteriormente essa suspensão foi centrifugada e as células posteriormente fixadas em solução de álcool metílico:ácido acético (3:1), em três ciclos de ressuspenso/centrifugação de 10 minutos cada. O material fixado foi mantido em tubos de 1,5ml com tampa, na temperatura de -20°C até a preparação das lâminas. Cerca de 30 metáfases foram analisadas para cada indivíduo. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX51, sob aumento de 1000X, por meio de sistema digital de captura DP73 Olympus, utilizando o software CellSens (Olympus Optical Co. Ltd.). As técnicas de Ag-RONs, bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub> e DAPI) foram desenvolvidas de acordo com HOWELL e BLACK (1980), SUMNER (1972) e CARVALHO et al. (2005), respectivamente. Os cromossomos foram classificados de acordo a posição dos centrômeros em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a) (LEVAN et al., 1964).

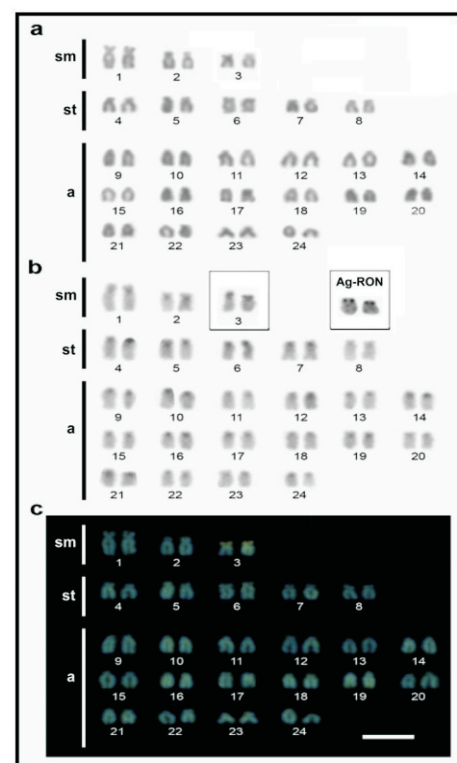
### 3. Resultados

Os exemplares de *C. menezesi* e *C. orientale* apresentaram 2n=48 cromossomos, com cariótipos compostos respectivamente por 4m+44st-a (NF=52) (Figura 2) e 6sm+10st+32a (NF=54) (Figura 3). Os sítios Ag-RONs se mostraram simples para as duas

espécies e localizados em posição intersticial no braço curto do primeiro par (m), em *C. menezesi* e no braço curto do 3º par cromossômico (sm) em *C. orientale* (Figuras 2 e 3; em destaque). O bandamento C revelou nos cromossomos de ambas as espécies pequenos blocos heterocromáticos restritos às regiões centroméricas e pericentroméricas, com marcações mais conspícuas sobre as RONS, únicos sítios que se apresentaram CMA<sub>3</sub>+ /DAPI- (Figuras 2 e 3; em destaque).



**Figura 2.** Cariótipo de *Crenicichla menezesi*. Coloração com Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque o par organizador nucleolar (par 1) submetido à técnica de Ag-RON, e coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI. Barra = 5µm.



**Figura 3.** Cariótipo de *Cichlasoma orientale* a partir de coloração por Giemsa (a), bandamento C (b) e coloração sequencial com CMA<sub>3</sub>/DAPI (c). Em destaque o par organizador nucleolar (par 3) evidenciando os sítios Ag-RONs. Barra=5µm.

#### 4. Discussão

A família Cichlidae é tida em geral como um grupo citogeneticamente conservado (THOMPSON, 1979; KORNFIELD, 1984; FELDBERG; BERTOLLO, 1985). De fato, a manutenção do padrão acrocêntrico ancestral, com poucos cromossomos bbraquiais (m-sm) é uma tendência evolutiva prevalente em ciclídeos neotropicais. Apesar de uma grande parte das espécies de espécies neotropicais retenham cariótipos com  $2n=48$  de cromossomos, pode ocorrer diversificação cromossômica numérica ( $2n=38$  a  $60$ ), também associada à ocorrência de rearranjos cromossômicos conforme identificada pela significativa variação no número fundamental, que pode se estender de  $NF=44$  a  $118$  (FELDBERG et al., 2003).

Para *Crenicichla* e *Cichlasoma*, gêneros com grande diversidade de espécies, já se dispõe de um relativo conjunto de informações citogenéticas da macroestrutura cariotípica (Tabela 1). Estes dados citogenéticos mais amplos possibilitam identificar que *C. menezesi* e *C. orientale*, assim como as demais espécies destes gêneros se mostram conservativas quanto à manutenção do número diploide ( $2n=48$ ), mas revelam um padrão evolutivo mais diversificado quanto a presença de números variáveis de cromossomos bi-braquiais.

No gênero *Cichlasoma*, a variação do número de pares cromossômicos metacêntricos e/ou submetacêntricos é consideravelmente mais extensa, variando de 0 a 14 pares de cromossomos (Tabela 1). Até o momento, apenas a espécie *C. salvini*, apresenta valores diploides  $>48$  cromossomos ( $2n=52$ ), enquanto valores  $<2n=48$  foi observada em uma população de *C. bimaculatum* ( $2n=44$ ;  $NF=44$ ) (SALGADO et al., 1995).

O gênero *Crenicichla* considerado basal em aspectos morfológicos (Kullander, 1998), apresenta uma variação no número de elementos bi-braquiais

consideravelmente menor que *Cichlasoma*, se estendendo de 2 a 7 pares por cariótipo. Estes padrões são indicativos de que as principais mudanças evolutivas detectáveis no cariótipo de ambos os gêneros, foram derivadas de inversões pericêntricas (FELDBERG et al., 2003), mas que atuaram de forma diferenciada entre os dois gêneros. Além da maior homogeneidade na macroestrutura cariotípica, como identificado em *C. menezesi*, as espécies de *Crenicichla* exibem um primeiro par cromossômico, geralmente metacêntrico-submetacêntrico, característico, portando uma constrição secundária conspícua que se apresenta como um marcador citotaxonomico para o gênero (FELDBERG, 2003).

Sítios Ag-RONs únicos constituem uma condição plesiomórfica em Cichlidae (FELDBERG; BERTOLLO, 1985b). Sítios Ag-RONs múltiplos, mais raros na família e considerados derivados, podem ser originários de rearranjos cromossômicos, tais como translocações e inversões (HSU et al., 1975; FELDBERG et al., 2003). Dentre os Cichlasomatinae, apenas cerca de 30% das espécies estudadas ( $n=5$ ) apresentaram mais de um par portador de sítios ribossomais (Tabela 1). No gênero *Cichlasoma* os dados disponíveis referentes às RONS para três espécies revelaram que elas podem se mostrar simples sobre um único par portador como em *C. facetum* ou múltiplas, como em *C. amazonarum*, com três cromossomos marcados e *C. paranaense*, variando de 2 a 6 cromossomos portadores. Sítios ribossomais estão presentes exclusivamente nos braços curtos do 3° par cromossômico (sm) do cariótipo de *C. orientale* (Figura 2 a) coincide com o padrão observado em *C. facetum*, possivelmente a condição ancestral desta característica em Cichlidae. Porém, um número ainda maior de informações ainda são requeridas para uma análise evolutiva mais aprofundada da evolução dos sítios ribossomais nos gêneros *Crenicichla* e *Cichlasoma*.

**Tabela 1.** Dados citogenéticos das espécies dos gêneros *Crenicichla* e *Cichlasoma*.

Gênero/Grupo	Espécies	2n	Cariótipos	NF	RONs	Referências
<b>Crenicichla</b> <b>Grupo saxatilis</b>	<i>C. saxatilis</i>	48	4 m/sm+44 st/a	52	-	1
	<i>C. lepidota</i>	48	6 m/sm+42 st/a	54	1°, q, i	2, 3
	<i>C. lepidota</i>	48	6 m/sm+42 st/a	54	1°, p, t; 5° q, t	4
	<i>C. lucius</i>	48	-	-	-	5
	<i>C. inpa</i>	48	6 m/sm+42 st/a	54	1°, q, i	6
	<i>C. menezesi</i>	48	4m+44 st/a	52	1°, p, i	Presente estudo
	<i>C. britskii</i>	48	8 m/sm+40 st/a	56	4°, q, t	6
<b>Crenicichla</b> <b>Grupo lacustris</b>	<i>C. iguassuensis</i>	48	8 m/sm +40 st/a	56	1°, -, i	7
	<i>C. iguassuensis</i>	48	6 m/sm +42 st/a	54	1°, p, i	8
	<i>C. lacustris</i>	48	6 m/sm +42 st/a	54	1°, p, i	2, 3
	<i>C. niederleinii</i>	48	14 m/sm +34 st/a	62	1°, p, i	4
	<i>C. niederleinii</i>	48	10 m/sm +40 st/a	58	2 cr.	9
	<i>C. niederleinii</i>	48	6 m/sm+ 42 st/a	58	1°, p, i	10
<b>Crenicichla</b> <b>Grupo wallacii</b>	<i>C. notophthalmus</i>	48	6 m/sm +42 st/a	54	-	5
<b>Crenicichla</b> <b>Grupo reticulata</b>	<i>C. reticulata</i>	48	6 m/sm +42 st/a	54	1°, p, i	11
	<i>C. semifasciata</i>	48	6 m/sm +42 st/a	54	1°, p, i	2, 3

Cont.

							Cont.
<b>Crenicichla</b> <b>Grupo lugubris</b>	<i>C. strigata</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	-		5
	<i>C. vittata</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	1°, p, i		2, 3
	<i>C. cincta</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	1°, p, i		6
	<i>C. lugubris</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	3°, q, t		6
	<i>C. cf. johanna</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	24°, p, t		6
<b>Cichlasoma</b>	<i>C. amazonarum</i>	48	2 m/sm + 46 st/a	50	3 cr.		12
	<i>C. beani</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	-		5
	<i>C. bimaculatum</i>	44	44st/a	44	-		12
	<i>C. bimaculatum</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	-		12
	<i>C. dimerus</i>	48	-	-	-		5
	<i>C. facetum</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	-		13
	<i>C. facetum</i>	48	10 m/sm + 38 st/a	58	2 cr.		14
	<i>C. orientale</i>	48	6 sm + 10st + 32 a	54	3°, p, t		<b>Presente estudo</b>
	<i>C. octofasciatus</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	2 cr.		2, 3
	<i>C. paranaense</i>	48	14 m/sm + 34 st/a	62	2 cr.		15
	<i>C. paranaense</i>	48	20 m/sm + 28 st/a	68	2 cr.		16
	<i>C. portalegrensis</i>	48	-	82	-		5
	<i>C. salvini</i>	52	-	104	-		17
	<i>C. salvini</i>	52	28 m/sm + 24 st/a	80	-		4
	<i>C. trimaculatus</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	-		5
	<i>C. dovii</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	-		5, 18
	<i>C. friedrichstalii</i>	48	6 m/sm + 42 st/a	54	-		18
	<i>C. istlanum fusca</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	-		19
	<i>C. iist. istlanum</i>	48	8 m/sm + 40 st/a	56	-		19.
	<i>C. tetracanthum</i>	48	6 m/sm+28st+14a	54	-		20

(NF) – número fundamental; RONS – regiões organizadoras de nucléolos; (p) - braço curto; (q) - braço longo; (i) intersticial; (t) terminal; (cr) cromossomos. Referências: 1. OYHENART-PERERA et al., 1975; 2. FELDBERG; BERTOLLO, 1985a; 3. FELDBERG; BERTOLLO, 1985b; 4. MARTINS et al., 1995; 5. THOMPSON, 1979; 6. BENZAQUEM et al., 2008; 7. MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 2000; 8. LORSCHIEDER; MARGARIDO, 2004; 9. LOUREIRO et al., 2000; 10. FENOCCHIO et al., 2003; 11. FELDBERG et al., 2004; 12. SALGADO et al., 1995; 13. SANTOS et al., 1998; 14. RONCATI et al., 2000; 15. QUIJADA; CESTARI, 1998; 16. ZAHNER, 1997; 17. LOUREIRO; DIAS, 1998; 18. SALAS; BOZA, 1991; 19. URIBE-ALCOCER et al., 1999; 20. RÁB et al., 1983.

Propostas filogenéticas para o gênero *Crenicichla*, baseadas em sequências mtDNA, associa *C. menezesi* ao grupo *saxatilis*, próximo a *C. sveni* e diferentes linhagens de *C. lepidota* (KULLANDER et al., 2009). Este agrupamento apoia proposta anterior baseada em caracteres morfológicos (PLOEG, 1991), mostrando similaridade entre ambas as abordagens quanto ao relacionamento destas espécies. Do ponto de vista citogenético, apesar do número diploide não constituir elemento diferencial dentro do gênero, identifica-se por outro lado uma maior similaridade cariotípica dentro dos grupos, tanto quanto ao número fundamental, presença e eventualmente posicionamento das RONS. Esta condição pode ser identificada entre os representantes do grupo *saxatilis*, onde se insere a espécie *C. menezesi* (*C. saxatilis*, *C. lepidota*, *C. lucius*, *C. inpa*, *C. britskii*; Tabela 1).

O posicionamento dos sítios ribossomais no braço curto do par 1 em *C. menezesi* se mostra discordante de outras espécies do grupo *saxatilis*, mas similar a *C. lepidota*, podendo revelar alguma proximidade filogenética entre estas espécies. Realmente, estudos sobre as regiões organizadoras nucleolares têm revelado que sua localização pode se mostrar espécie-específica para vários grupos de peixes (GALETTI et al., 1984; 1991; VÊNERE; GALETTI, 1989) e portanto um valioso marcador citotaxonomico para determinados grupos de peixes (CALADO et al., 2013).

Processos relacionados à heterocromatina têm desempenhado um destacado papel na diversificação cariotípica entre alguns grupos de peixes (OJIMA; UEDA, 1979; MAYR et al., 1985). Em ciclídeos, apesar de alguns estudos sobre a constituição da heterocromatina (MAZZUCHELLI; MARTINS, 2009; MARTINS et al., 2010), a informação sobre essa porção do genoma ainda é escassa. Nos cromossomos de *C. menezesi* e *C. orientale*, a heterocromatina está distribuída em grande parte nas regiões pericentroméricas, e, sobretudo, nas regiões organizadoras de nucléolos, condição frequente para outros ciclídeos neotropicais (FELDBERG et al., 2003; BENZAQUEM et al., 2008). Geralmente uma associação heterocromatina-RONS está presente em todos os cariótipos eucarióticos (CLARK; WALL, 1996). Apesar da associação de cístrons ribossomais e regiões heterocromáticas possibilitarem algum papel na diferenciação cromossômica (GALETTI et al., 1991), os padrões gerais para esses gêneros e especificamente nos cromossomos de *C. menezesi* e *C. orientale* não sugerem uma participação mais ativa na diferenciação cromossômica nestas espécies.

## 5. Considerações finais

A família Cichlidae representa um importante modelo evolutivo. O clado Neotropical, com sua grande diversidade, ainda representa um grupo de complicada

solução filogenética e incipiente conhecimento citogenético. Nesta família, os dados citogenéticos disponíveis revelam um conservadorismo cromossômico numérico, mas com diferentes níveis de dinamismo evolutivo quanto aos padrões estruturais do cariótipo. As duas espécies analisadas, *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*, típicas de regiões semi-áridas, reforçam esta condição. De fato, enquanto *C. menezesi* possui uma macroestrutura cariotípica mais conservada, *C. orientale*, apresenta maior nível de divergência em relação a outras espécies do gênero. Inversões pericêntricas se revelam destacadamente como o principal mecanismo de diversificação citogenética em ambos os gêneros. Dados subsequentes envolvendo um maior número de espécies e populações permitirão uma visão mais abrangente sobre a evolução cariotípica nesta família e da fauna íctica típica das regiões semi-áridas da América do Sul.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa pelo apoio financeiro.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALBERTSON, R.C.; KOCHER, T.D. Genetic and developmental basis of cichlid trophic diversity. *Heredity*, v. 97, p. 211-21, 2006.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E.; Vari, R.P. (eds.) **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. EDIPUCRS. Porto Alegre, p. 583-587, 1998.
- AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, v. 1986, p. 226-231, 1986.
- ARAI, R. **Fish Karyotypes: a check list**. Japan: Springer, 2011.
- BENZAQUEM, D.C.; FELDBERG E.; PORTO J.I.; ZUANON J.A.S. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). *Genetic Molecular Biology*, v. 31, p. 250-255, 2008.
- BERRA, T.M. **Freshwater fish distribution**. Academic Press, San Diego, California, EUA: Academic Press, 2001.
- Brum, M.J.I. **Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes Teleosteos**. Série Monografias, v. 2, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brasil, p. 5-42, 1995.
- BRUM, R.H. **Estrutura e evolução cariotípica de peixes ciclídeos sul americanos**. Dissertação (mestrado) – Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.
- Buckup, P.A. (1999). Sistemática e Biogeografia de Peixes de Riachos. In: Caramaschi, E.P., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R. (eds) **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 91-138, 1999.
- CALADO, L.L.; BERTOLLO, L.A.C.; COSTA, G.W.W.F.; MOLINA, W.F. Cytogenetic studies of Atlantic mojarras (Perciformes – Gerreidae): chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH. *Aquaculture Research*, v. 44, p. 829-835, 2013.
- CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics and Molecular Research*, v. 4, p. 663-667, 2005.
- CHAKRABARTY, P. Cichlids biogeography: comment and review. *Fish and Fisheries*, v. 5, p. 97-119, 2004
- CLARK, M.S.; WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. Londres: Chapman & Hall, 1996.
- FARIAS, I.P., ORTÍ, G.; MEYER, A. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of Experimental Zoology*, v. 288, p. 76-92, 2000.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, v. 38, p. 257-268, 1985a.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Nucleolar organizing regions in some species of neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, v. 38, p. 319-324, 1985b.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; ALVES-BRINN, M.N.; MENDONÇA, M.N.C.; BENZAQUEM, D.C. B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 106, p. 195-198, 2004.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L. A. C. 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, 2003.
- GALETTI JR., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. (1984) Characterization of eight species of Anostomidae (Characiformes) fish on the basis of the nucleolar organizing regions. *Caryologia*, v. 37:401-406.
- GASTON, K.J.; SPICER, J.I. **Biodiversity: An introduction**. Oxford: Blackwell Publishing Company, 2004.
- GOLD, J.R.; LI, C.; SHIPLEY, N.S.; POWERS, P.K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, v. 37, p. 563-575, 1990.
- GROOMBRIDGE, B. **Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources**. Londres: Chapman & Hall, 1992.
- GURGEL H.C.B.; LUCAS F.D.; SOUZA L.L.G. Feeding habits of seven fish species from the semi-arid region of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista de Ictiologia*, v. 10, p. 7-16, 2002.
- HELFMAN, G.S.; COLLETTE, B.B.; FACEY, D.E.; BOWEN, B.W. **The diversity of fishes: biology, evolution and ecology**. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- HSU, T.C., SPIRITO S.E., PARDUE, L.M. Distribution of 18/28S ribosomal genes in Mammalian genomes. *Chromosoma*, v. 53, p. 25-36, 1975.
- JULIA, J.D., JAMES, A.C., TIMOTHY, G.B. Tempo and mode of diversification of Lake Tanganyika cichlid fishes. *PLoS One*, v. 5, e1730, 2008.
- KEENLEYSIDE, M.H.A. Parental care. In: Keenleyside M.H.A. (ed.) **Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution**. Nova Deli: Chapman and Hall, p. 191-208, 1991.
- KOCHER, T.D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 288-298, 2004.
- KORNFIELD, I.; SMITH, P.F. African cichlid fishes: model systems for evolutionary biology. *Annual Review of Ecological Systematics*, v. 31, p. 163-196, 2000.
- KORNFIELD, I.L. Descriptive Genetics of Cichlid fishes. In: **Evolutionary Genetics of Fishes**, Turner, B.J. (ed.) Plenum Press, New York, p. 591-616, 1984.
- KORNFIELD, I.L.; RITTE, U.; RICHLER, C.; WAHRMAN, J. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the Sea of Galilee. *Evolution*, v. 33, p. 1-14, 1979.
- KULLANDER S.O. A review of the species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from the Atlantic coastal rivers of southeastern Brazil from Bahia to Rio Grande do Sul States, with descriptions of three new species. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, p. 127-146, 2006.
- KULLANDER, S.O. **A revision of the South American cichlid genus Cichlasoma**. Swedish Museum of Natural History, 296 pp., 1983.
- KULLANDER, S.O. Family Cichlidae. In: Reis, R.E.; Kullander S.O.; Ferraris Jr, C.J. (eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 605-606, 2003.

- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LORSCHIEDER, C.A.; MARGARIDO, V.P. 2004. Estudos citogenéticos comparativos em *Crenicichla niederleini* e *Crenicichla iguassuensis* (Perciformes, Cichlidae). *Anais do X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Natal, pp 111.
- LOUREIRO, M.A. **Análise citogenética em quatro espécies da família Cichlidae**. Dissertação. Londrina: Universidade Estadual de Londrina UEL, 1999.
- LOUREIRO, M.A.; CAETANO, L.G.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of two species of the genus *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae). *Cytologia*, v. 65, p. 57-63, 2000.
- LOUREIRO, M.A.; DIAS, A.L. 1998. Regiões organizadoras de nucléolo (RONs) múltiplas em *Cichlasoma paranaense* (Pisces, Cichlidae) da região de Guaravera, Londrina, PR. *Proc. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotrópicos*, C18.
- LUCENA C.A.S.; KULLANDER S.O. The species of the Uruguai River drainage in Brazil. *Ichthyology Exploration of Freshwaters*, v. 3, p. 97-160, 1992.
- MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Publishing Company, 2004.
- MARESCALCHI, O. Karyotype and mitochondrial 16S gene characterization in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). *Journal of Zoology Science*, v. 43, p. 22-28, 2005.
- MARTINS, C.; FERREIRA, A.I.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI JR, P.M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, v. 127, p. 1-141, 2006.
- MARTINS, I.C.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JÚLIO JÚNIOR, H.F. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces-Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia*, v. 60, p. 223-231, 1995.
- MAYR, B.; KALAT, M.; RÁB, P. Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica*, v. 67, p. 51-56, 1985.
- MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, v. 136, p. 461-469, 2009.
- MENEZES, N.A. Sistemática de peixes. In: Agostinho, A.A., Benedito-Cecílio, E. (eds.) **Situação e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá: Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, p. 18-28, 1992.
- MOLINA, W.F. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, v. 5, p. 149-152, 2001.
- MOLINA, W.F.; ALVES, D.E.O.; ARAÚJO, W.C.; MARTINEZ, P.A.; CARVALHO, R.A.A.; SILVA, M.F.M.; COSTA, G.W.W.F. **Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetics**. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 1807-1810, 2010.
- MUSILOVÁ, Z.; RÍCAN, O.; JANKO, K.; NOVÁK, J. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 46, p. 659-672, 2008.
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. Porlamar: Editora Universidad del Oriente, 2006.
- OJIMA, Y. Fish cytogenetics. In: Sharma, K., Sharma, A. (eds.) **Chromosomes in evolution of eukaryotic group**, Boca Raton: CRC Press, p. 111-145, 1983.
- OJIMA, Y.; UEDA, T. New C-banded marker chromosomes found in carpfuna hybrids. *Proceedings of the Japan Academy Series B*, v. 54, p. 15-20, 1979.
- OYHENART-PERER, M.F.; LUENGO, J.A.; BRUM-ZORRILLA, N. Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) y *Crenicichla saxatilis* (Linn.) (Teleostei, Cichlidae). *Revista Biología del Uruguay*, v. 3, p. 29-36, 1975.
- PLOEG, A. **Revision of the South American cichlid genus *Crenicichla* Heckel, 1840, with description of fifteen new species and consideration on species groups, phylogeny and biogeography (Pisces, Perciformes, Cichlidae)**. Amsterdam: Academisch Proefschrift, p. 1-153, 1991.
- RÁB, P.; LIEHMAN, P.; PROKES, M. Karyotype of *Cichlasoma tetracanthum* (Pisces, Cichlidae) from Cuba. *Folia Zoologica*, v. 32, p. 185-188, 1983.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCS, 2003.
- ROSA, R.S.; MENEZES, N.A.; BRITSKI, H.A.; COSTA, W.J.E.M.; GROTH, F. In: Leal, I.R.; Tabarelli, M.; Silva, J.M.C. **Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga**. Recife: Editora Universitária Universidade Federal do Pernambuco, p. 135-180, 2003.
- ROSA, R.S.; MENEZES, N.A. Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces: Elasmobranchii e Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, p. 647-667, 1996.
- SALAS, E.; BOZA, J. Citotaxonomia comparativa de tres especies de *Cichlasoma* (Pisces: Cichlidae) nativas de Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, v. 39, p. 219-224, 1991.
- SALGADO, S.M.; FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R. Estudos citogenéticos em cinco espécies da família Cichlidae (Perciformes-Labroidei), da bacia amazônica central. *Revista Brasileira de Genética*, v. 18, p. 463, 1995.
- SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G. Peixes da bacia amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H (ed.) **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, p. 345-373, 1999.
- SEEHAUSEN, O. **African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research**. *Proceedings of Biology Science*, v. 22, p. 1987-1998, 2006.
- SMITH, W.L.; CHAKRABARTY, P.; SPARKS, J.S. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*, v. 24, p. 625-641, 2008.
- SPARKS, J.S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 30, p. 599-614, 2004.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, v. 75, p. 304, 1972.
- THOMPSON, K.W. Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*, v. 1979, p. 679-691, 1979.
- THOMPSON, K.W. Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces: Perciformes). *Experientia*, v. 37, p. 351-352, 1981.
- TURNER, G.F. Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*, v. 17, p. 827-831, 2007.
- URIBE-ALCOCER, M.; TELLEZ-VARGAS, C.; DIAZ-JAIMES, P. Chromosomes of *Cichlasoma istlanum* (Perciformes: Cichlidae) and karyotype comparison of two presumed subspecies. *Revista Biología Tropical*, v. 47, p. 1051-1059, 1999.
- VARI, R.P.; MALABARBA L.R. Neotropical ichthyology: an overview. 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**. Porto Alegre: EDIPUCS, p. 1-11, 1998.