

ALEXANDRE RODRIGUES DA SILVA

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM POPULAÇÕES DE Characidium
(PISCES, CHARACIDIINAE) COLETADOS EM AFLUENTES DA
BACIA DO RIO GRANDE, MG.**

Alfenas
2005

ALEXANDRE RODRIGUES DA SILVA

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM POPULAÇÕES DE *Characidium*
(PISCES, CHARACIDIINAE) COLETADOS EM AFLUENTES DA
BACIA DO RIO GRANDE, MG.**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência Animal, Alfenas, MG, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro, PhD.

Alfenas - MG
2005

Silva, Alexandre Rodrigues.

Análises Citogenéticas em Populações de *Characidium* (PISCES, CHARACIDIINAE) coletados em afluentes da bacia do Rio Grande, MG/Alexandre Rodrigues da Silva. Alfenas: UNIFENAS, 2005. 75p.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro, PhD.

Dissertação – (Mestrado) – Universidade José do Rosário Vellano.

1. *Characidium* 2. Rio Grande 3. Análises Citogenéticas
CDU: 639.3 (043)

Dedico este trabalho a minha esposa e filhos (Máyra, Matheus e Lucas), pois sem eles não haveria o verdadeiro motivo de minha existência.

Agradecimentos

- ✓ À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS);
- ✓ Aos meus colegas de curso, pela amizade e dedicação, e em especial a Camilo F. C. Canella Filho, Guilherme Pimenta de Pádua Zolini e Daniel Scould, pelas horas alegres que me dedicaram, pelas palavras de incentivo e compreensão nas horas dos desabafos;
- ✓ Aos colegas de laboratório, pela amizade e companheirismo;
- ✓ Ao Prof. Dr. João Evangelista Fiorini e sua equipe, pela ajuda e por ter colocado seu laboratório à disposição para a realização deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Paulo de Figueiredo Vieira, Coordenador do Mestrado em Ciência Animal, pela paciência, amizade, palavras de carinho e força nas horas difíceis;
- ✓ Ao Prof. Dr. Edson José Fassani, pelas dicas e conselhos maravilhosos e extremamente úteis, além de sua especial amizade;
- ✓ Aos membros da banca: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho (UFSCar); ao meu amigo Prof. Dr. Antonio Cleber da Silva Camargo (UNIFENAS) e ao meu orientador Prof. Dr. Edson Luis Maistro (UNIFENAS), pela tranquilidade que transmitiram a mim durante o decorrer das argüições.
- ✓ Em especial agradecimento ao Prof. Dr. Edson Luis Maistro, meu Orientador, por sua paciência, amizade, dedicação, tolerância e educação, por ter me ensinado a cultivar tais virtudes e a me ensinar o caminho da humildade;
- ✓ A minha família: esposa e filhos, pela paciência para que eu pudesse dedicar-me a esse trabalho;
- ✓ Aos meus pais, pela educação e ao amor dedicados a mim;
- ✓ E a Jesus Cristo, por me proporcionar mais uma vitória nessa vida.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO GERAL	ix
GENERAL ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Considerações gerais sobre a Citogenética de Peixes	2
2.2. Variação do número, morfologia e estrutura dos cromossomos	3
2.3. Cromossomos Supranumerários em peixes	13
2.4. Mecanismos Cromossômicos de Determinação do Sexo em Peixes	17
2.5. Considerações sobre os peixes do gênero <i>Characidium</i>	19
2.6. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Materiais	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Obtenção de células mitóticas	24
3.2.2. Preparação dos cromossomos mitóticos	24
3.2.3. Técnicas de coloração e bandamento cromossômico	25

3.2.3.1. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON _S)	26
3.2.3.2. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)	27
3.2.3.3. Coloração com Cromomicina A ₃ (GC-específico)	27
3.2.4. Estudos cariotípicos	28
3.2.4.1. Medidas cromossômicas	28
3.2.4.2. Montagem final dos cariótipos	29
4. Artigo(s) resultante(s) do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa	31
Cytogenetic divergences between two sympatric species of <i>Characidium</i> (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from Machado River, MG, Brazil	32
Karyotype characterization of two allopatric populations of <i>Characidium cf. zebra</i> (Pisces, Crenuchidae) from Grande River basin, MG, Brazil	48
5. Referências Bibliográficas	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
(Artigo I)	
FIGURA 1	45
FIGURA 2	46
FIGURA 3	47
(Artigo II)	
FIGURA 1	59
FIGURA 2	60
FIGURA 3	61

RESUMO

Foram realizados estudos citogenéticos em quatro populações de peixes pertencentes ao gênero *Characidium* coletados em pequenos tributários da bacia do Rio Grande, sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Os estudos resultaram em dois artigos sendo apresentados seus resumos abaixo:

Primeiro artigo: Divergências Citogenéticas entre duas espécies simpátricas de *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) do Rio Machado, MG, Brasil.

Foram realizados estudos citogenéticos em duas espécies simpátricas de *Characidium*, *C. gomesi* e *C. cf. zebra*, da bacia do Rio Grande, Estado de Minas Gerais, Brasil. Embora ambas as espécies tenham apresentado um número de cromossomos igual a 50 com um cariótipo que consiste exclusivamente de cromossomos meta e submetacêntricos, uma diversidade interespecífica foi detectada envolvendo o tamanho dos dois primeiros pares de cromossomos do cariótipo. RONS ativas foram localizadas em posição terminal no braço longo do 17º par em *C. gomesi* e em posição subterminal no braço longo do 23º par de *C. cf. zebra*. O fluorocromo CMA₃ marcou somente o par cromossômico portador da RON em ambas as espécies. O padrão de heterocromatina também mostrou alguma diferenciação entre estas espécies, estando restrita a regiões centroméricas ou pericentroméricas em *C. cf. zebra* e praticamente ausente em *C. gomesi*. Estes dados são discutidos no que diz respeito à diversificação cromossômica neste grupo de peixes.

Segundo artigo: Caracterização do Cariótipo de duas populações alopátricas de *Characidium* cf. *zebra* (Pisces, Crenuchidae) da bacia do Rio Grande, MG, Brasil.

Duas populações de *Characidium* cf. *zebra* foram coletadas em tributários da bacia do rio Grande e analisadas sob o aspecto citogenético. Ambas as populações de *C. cf. zebra* estudadas apresentaram a mesma estrutura cariotípica, com número diplóide de $2n = 50$ cromossomos meta e submetacêntricos e número fundamental igual a 100. O bandeamento C evidenciou a heterocromatina somente na região centromérica. Resultados das análises da região organizadora de

nucléolos, obtidas pela marcação com o nitrato de prata, evidenciaram as mesmas na posição terminal do braço longo de um pequeno par de cromossomos submetacêntricos. O tratamento dos cromossomos com o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA₃) mostrou regiões ricas em pares de bases GC no par de cromossomos marcado pela RON em ambas as populações e em um cromossomo metacêntrico na posição terminal do braço longo na população do córrego do Coqueiro. Alguns aspectos relacionados à composição cromossômica de *C. cf. zebra* são discutidos.

Abstract

Cytogenetic studies were performed on four populations of the fishes belonging to the *Characidium* genus collected on small tributaries of the Grande River basin, south of the State of Minas Gerais, Brazil. The studies brought forth two manuscripts whose abstracts are presented below:

Manuscript one: Cytogenetic divergences between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from Machado River, MG, Brazil.

Cytogenetic studies were performed on two sympatric species of *Characidium*, *C. gomesi* and *C. cf. zebra*, from the Grande river basin, Minas Gerais State, Brazil. Although both species had a chromosome number equal to 50 chromosomes with a karyotype exclusively consisting of meta- and submetacentric chromosomes, an interspecific diversity was detected concerning the size of the two first chromosome pairs of the karyotypes. Active NORs were located at terminal position on the long arm of the 17th pair in *C. gomesi* and at subterminal position on the long arm of the 23th pair in *C. cf. zebra*. The fluorochrome CMA₃ stained only the NOR-bearing pair of chromosomes of both species. The pattern of heterochromatin also showed some differentiation among these species being restricted to centromeric or pericentromeric region in *C. cf. zebra* and practically absent in *C. gomesi*. These data are discussed concerning chromosome diversification in this fish group.

Manuscript two: Karyotype characterization of two allopatric populations of *Characidium cf. zebra* (Pisces, Crenuchidae) from Grande River basin, MG, Brazil.

Two populations of *Characidium cf. zebra* were collected in tributaries from Grande river basin and analyzed from the cytogenetic viewpoint. Both *C. cf. zebra* populations studied had the same

karyotypic structure, with diploid number $2n = 50$ metacentric/submetacentric chromosomes and fundamental number 100. C-band patterns showed heterochromatin only in the centromeric region. Results of analyses from the nucleolus organizer region, obtained by silver nitrate staining was observed on one pair of small submetacentric chromosomes at the terminal position of the long arm. Treatment with chromomycin A₃ (CMA₃) showed regions rich in GC base pairs in the NOR-bearing pair of chromosomes on both populations and in one metacentric chromosome with bright signal on the terminal position in the long arm in the Coqueiro stream population. Some aspects related to *C. cf. zebra* chromosome composition are discussed.

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são animais objeto de inúmeros estudos por parte dos pesquisadores das mais diversas áreas, despertando o interesse e aguçando a imaginação dos estudiosos e do grande público.

Eles representam algo em torno de 25.000 espécies conhecidas, onde 170 são registradas somente na bacia do rio Grande; este, por sua vez, faz parte da bacia do rio Paraná, ocupando uma área de aproximadamente 143.000 km², sendo que 86.500 km² (60,7%) pertencem a Minas Gerais (Companhia Energética de Minas Gerais, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000).

De acordo com Hubbs (1981), os peixes vivem em uma grande variedade de habitats, o que os torna amplamente diversificados quanto à estrutura, tamanho, aparência, modos de vida e fisiologia. Apesar de possuírem centenas de milhões de anos, os peixes de esqueleto ósseo estão no auge de sua evolução.

Devido a características inerentes ao ambiente aquático, tais como cachoeiras, represas, diferentes bacias hidrográficas e uma série de outras, estes animais estão sujeitos a uma diversa possibilidade de ocorrência de isolamentos geográficos, podendo sofrer modificações particulares que são selecionadas de forma diferente pela seleção natural, o que facilita o processo de especiação (JESUS, 1996).

Assim, podemos encontrar nesses animais uma grande diversidade citogenética, com vários tipos de rearranjos cromossômicos como os Robertsonianos e não-Robertsonianos (inversões, duplicações, deleções e translocações), mostrando-nos a variedade de posições dos centrômeros, bandas e regiões organizadoras de nucléolo (FELDBERG, PORTO e BERTOLLO, 1992), além de variações do número diplóide, diferentes mecanismos de cromossomos sexuais, presença de cromossomos supranumerários, triploidia natural, polimorfismo de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo (BERTOLLO *et al.*, 2000; MOREIRA-FILHO, GALETTI JUNIOR e BERTOLLO, 2004).

Como o Estado de Minas Gerais é muito rico em rios, riachos e ribeirões, pertencentes a diferentes bacias hidrográficas, e os dados citogenéticos para os peixes da região da bacia do rio Grande são extremamente escassos, pretende-se com este trabalho analisar citogeneticamente diferentes populações de peixes do gênero *Characidium*, buscando caracterizar de forma inédita sua

composição cromossômica, através da qual pretende-se uma melhor compreensão dos processos de evolução cariotípica que imperam neste grupo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a Citogenética de Peixes

A citogenética vem sendo aplicada com a finalidade de se estudar o desenvolvimento evolutivo dos peixes. Nos últimos 20 anos, as publicações sobre a citogenética de peixes contribuíram significativamente, aumentando o conhecimento estrutural cariotípico de várias populações desses animais, sendo muitos destes trabalhos importantes no desenvolvimento de estudos ictiogenéticos. Os primeiros projetos apenas determinavam o número cromossômico das espécies, sendo que os mais recentes envolvem metodologias mais avançadas, como a citogenética molecular (MARIANO, 2001).

O estudo dos cromossomos vem sendo analisado por técnicas convencionais, tais como bandas C, para verificar o padrão de heterocromatina constitutiva, e a impregnação de sais de prata, para o estudo do número e posição das regiões organizadoras de nucléolo.

Sabe-se que em alguns vertebrados essas técnicas são utilizadas, revelando uma pequena modificação, ou mesmo nenhuma modificação evolutiva. Assim, quanto mais exatas forem às técnicas citogenéticas empregadas, mais cariótipos serão encontrados sem estarem conservados pela evolução, ou seja, são passíveis de terem suas modificações detectadas (FELDBERG, PORTO e BERTOLLO, 1992).

Essas técnicas relativamente simples envolvem a extração de células teciduais provenientes do rim anterior para a obtenção de metáfases, com a finalidade de se observar o número de

cromossomos, seus tipos e formas (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991) pelo método de (BERTOLLO, TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO, 1978).

Segundo Almeida-Toledo (1994), as bandas C, bem como as técnicas que identificam subconjuntos da heterocromatina constitutiva de acordo com sua composição molecular, têm sido importantes na identificação de polimorfismos autossômicos ou referentes a cromossomos sexuais.

A técnica para obtenção da marcação das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) identifica a atividade cromossomal durante a intérfase, marcando indiretamente as proteínas. Esta técnica tem ajudado os pesquisadores na identificação e caracterização de espécies, funcionando como excelente ferramenta adicional (FELDBERG, PORTO e BERTOLLO, 1992).

Existem ainda outros marcadores que ajudam a identificar a estrutura dos cromossomos, como os fluorocromos base específicos, que coram os subconjuntos de heterocromatina, o bandamento com enzimas de restrição, que clivam o DNA em sítios específicos, a hibridação *in situ*, permitindo a visualização da exata localização de seqüências do DNA nos cromossomos metafásicos e em células interfásicas e a análise dos complexos sinaptonêmicos, que observa o emparelhamento de cromossomos sexuais e comportamento meiótico de cromossomos B.

Nos tópicos que se seguem são apresentados alguns exemplos da diversidade cariotípica que pode ser observada no grupo dos peixes com a aplicação das técnicas mencionadas neste capítulo.

2.2 Variação do número, morfologia e estrutura dos cromossomos

Nos últimos 20 anos de pesquisas em citogenética de peixes, somente algo em torno de 12% das espécies conhecidas neste grupo foram estudadas e de alguma forma analisadas sob o aspecto cromossômico (KLINKHARDT, TESCHE e GREVEN, 1995).

Os peixes têm se revelado um excelente material para estudos em citogenética e evolução, contribuindo na elaboração dos padrões filogenéticos e ajudando na identificação das espécies.

São encontrados animais onde os números dos cromossomos podem permanecer constantes como, por exemplo, na família Anostomidae, onde diversas espécies analisadas por Galetti Junior. *et*

al. (1981) apresentaram um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos. Também se observa constância em relação ao número de cromossomos na família Prochilodontidae, onde a análise de oito gêneros desses peixes revelou um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos, com (NF) = 108 em *P. scrofa*, *P. vimboides*, *P. lineatus*, *P. affinis*, *P. marggravii*, *P. cearensis*, *P. argenteus* e *P. nigricans*, coletados nos estados de São Paulo e Minas Gerais (sudeste brasileiro), Mato Grosso do Sul (centro-oeste brasileiro), Ceará (nordeste brasileiro) e Amazonas (região norte do Brasil) Pauls e Bertollo (1990).

Segundo observações de Feldberg *et al.* (1992), além de outros, as espécies de peixes neotropicais que possuem cariótipos estáveis quanto ao número de cromossomos são as famílias Curimatidae, Anostomidae, Cichlidae, Prochilodontidae, Chilodontidae e Hemiodontidae. Estes pesquisadores estudaram nove espécies de peixes coletados na região central do baixo amazonas pertencentes a quatro gêneros da família Curimatidae e encontraram cariótipos com $2n = 54$ cromossomos e número fundamental (FN) = 108 para *C. vittata*, *C. kneri*, *C. cyprinoides*, *C. inornata*, *Psectrogaster rutiloides*, *Steindachnerina leuciscus*, *Curimatella alburna* e *Curimatella meyeri*. Somente *Curimata ocellata* apresentou um par cromossômico a mais em seu cariótipo, com $2n = 56$ cromossomos e (NF) = 112.

Outro trabalho envolvendo a família Curimatidae foi desenvolvido por Martins, Giuliano-Caetano e Dias (1996), que analisaram treze espécimes de *Cyphocharax modesta*, vindos do reservatório de Três Bocas, município de Londrina, Paraná e observaram um número de $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

Nos peixes da família Parodontidae, Moreira-Filho, Bertollo e Galetti Junior (1993) analisaram vinte e seis exemplares de *Parodon hilarii*, coletados em pequenos tributários do rio São Francisco, no distrito de Três Marias, Estado de Minas Gerais, onde todos possuíam $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com (NF) = 108 cromossomos, embora as fêmeas possuíssem um grande cromossomo W subteloacêntrico, caracterizando um sistema sexual ZZ/ZW.

Loureiro, Giuliano-Caetano e Dias (2000), estudando a caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Crenicichla* (Pisces, Cichlidae), encontraram diferenças entre as espécies de *C. niederleini* e *Crenicichla sp.*, com número diplóide de $2n = 48$ cromossomos. Entretanto, a morfologia dos cromossomos era diferente, sendo dois pares de metacêntricos, três pares de submetacêntricos e dezenove pares de subtelo-acrocêntricos com (NF) = 58 cromossomos na

espécie *C. niederleinii* e dois pares de metacêntricos, dois pares de submetacêntricos e vinte pares de subtelo-acrocêntricos com (NF) = 56 cromossomos em *Crenicichla sp.*

Maistro *et al.* (2000), analisando espécimes de *Prochilodus lineatus* oriundos do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, Estado de São Paulo, com o intuito de estudar a composição básica dos cromossomos A e B, observaram que todos os animais possuíam $2n = 54$ cromossomos, assim como os analisados por Pauls e Bertollo (1990), com a diferença que estes, provindos da cidade de Pirassununga, continham de 0 a 4 cromossomos supranumerários. Esses peixes podem ser encontrados possuindo cromossomos extras em número de 0 a 7 unidades por cariótipo, (OLIVEIRA *et al.*, 1997).

Pereira *et al.* (2002), analisando quatro espécies de Anostomidae vindos do rio Sapucaí, Alfenas, no Estado de Minas Gerais, encontraram número diplóide de $2n = 54$ cromossomos em *Leporinus friderici*, *L. octofasciatus*, *L. striatus* e *Schizodon nasutus*, sendo dos tipos meta e submetacêntricos.

A família Pimelodidae é outra que compreende peixes com certa capacidade de manter-se com cariótipos constantes. Em uma revisão, Swarça, Giuliano-Caetano e Dias (2000) encontraram alguns gêneros da família Pimelodidae (*Bergiaria*, *Iheringichthys*, *Parapimelodus*, *Pimelodus*, *Hemisorubim*, *Pseudoplatystoma*, *Sorubim* e *Paulicea*) possuindo cariótipos iguais a $2n = 56$ cromossomos, exceto para *Pimelodus blochii*, com $2n = 58$ cromossomos e *Callophisus sp.* e *Pinirampus sp.*, ambos com $2n = 50$ cromossomos.

Por outro lado, existem grupos de peixes que apresentam uma grande variação no número e morfologia dos cromossomos. Os Characidae são peixes que compreendem um grande número de gêneros que podem ou não apresentar uma extensa variedade de números de cromossomos. Paintner-Marques, Giuliano-Caetano e Dias (2002), pesquisando a diversidade cariotípica de *Bryconamericus aff. exodon* (Characidae, Tetragonopterinae), encontraram em quinze exemplares um número diplóide de $2n = 52$ cromossomos, sendo que havia dois citótipos nessas espécies, onde os pesquisadores encontraram dois números fundamentais diferentes: citótipo 1, apresentando dezesseis metacêntricos, doze submetacêntricos, seis subteloacrocêntricos e dezoito acrocêntricos, com (NF) = 86 cromossomos e citótipo 2, apresentando dez metacêntricos, vinte e quatro submetacêntricos, seis subteloacrocêntricos, doze acrocêntricos, com (NF) = 92 cromossomos. Os autores sugerem que as variações podem ter se originado através de inversões pericêntricas.

Outro exemplo da diversidade de número/morfologia de cromossomos pode ser observado na subfamília Tetragonopterinae, no gênero *Astyanax*, principalmente *Astyanax scabripinnis* que é considerado um complexo de espécies. Salvador e Moreira-Filho (1992) coletaram exemplares machos e fêmeas de *Astyanax scabripinnis* no córrego das Pedras, município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, identificando nos animais $2n = 50$ cromossomos, sendo seis cromossomos metacêntricos, vinte e dois submetacêntricos, dez subtelocêntricos e doze cromossomos acrocêntricos, além de um a dois macrocromossomos supranumerários em alguns exemplares.

Duas populações de *Astyanax scabripinnis*, uma procedente do córrego do Yukatan, bacia do Ivaí e outra do rio Águas do Rancho, apresentaram número de cromossomos igual a $2n = 50$; entretanto, a primeira população possuía $(NF) = 82$ e a segunda população $(NF) = 84$, respectivamente. A primeira população analisada, vinda da cabeceira do córrego do Yukatan, constituída por dezesseis fêmeas e dez machos, apresentou três pares de cromossomos metacêntricos, quinze pares de submetacêntricos, dois pares de subtelocêntricos e cinco pares de cromossomos acrocêntricos e a população vinda da cabeceira do rio Águas do Rancho, vinte e oito fêmeas e dez machos, apresentou três pares de cromossomos metacêntricos, quatorze pares de submetacêntricos e oito pares de cromossomos acrocêntricos, mostrando uma variação morfológica em seus cromossomos (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1997).

Mantovani *et al.* (2000), também estudando *Astyanax scabripinnis*, analisaram duas populações, oriundas da bacia hidrográfica do Paranapanema, providas do córrego Marrecas, onde vinte e nove espécimes apresentaram número diplóide de $2n = 48$ cromossomos, três pares de metacêntricos, dez pares de submetacêntricos, seis pares de subtelocêntricos, cinco pares de acrocêntricos, $(NF) = 86$. Para os peixes provindos do córrego do Centenário, com $2n = 50$ cromossomos, foram analisados dezenove espécimes, sendo observados com três pares de metacêntricos, dez pares de submetacêntricos, quatro pares de subtelocêntricos e oito pares de acrocêntricos com $(NF) = 84$, não existindo diferenças quanto ao sexo. Embora eles apresentem números diplóides distintos, mostram grupos de cromossomos meta e submetacêntricos altamente conservados (numericamente e morfológicamente).

Kavalco e Moreira-Filho, (2003), analisando quatro populações de *Astyanax*, perceberam a grande variedade dentro da espécie, mostrando ser um reflexo do ambiente repercutindo dentro das características genéticas. Estas variações incluem a diferenciação do número diplóide entre $2n = 36$ a $2n = 50$ cromossomos, além da diferenciação da macroestrutura cariotípica, chegando até à

poliploidia natural. Tais pesquisadores capturaram, no rio Macacos, seis espécimes de *Astyanax scabripinnis*, nove espécimes de *Astyanax parahybae*, vinte e oito espécimes de *Astyanax intermedius* que vieram do rio Paraitinga e vinte e um de *A. giton* vindos do rio Paraitinga e do córrego Jacuí, todos pertencentes ao sistema da bacia do rio Paraíba do Sul. As análises apresentaram um número para *A. parahybae* de $2n = 48$ cromossomos, obtendo-se oito metacêntricos, dezoito submetacêntricos, doze subtelo-cêntricos e dez acrocêntricos com (NF) = 86, *A. intermedius* com $2n = 50$ cromossomos, sendo seis metacêntricos, oito submetacêntricos, quatro subtelo-cêntricos e trinta e dois acrocêntricos, (NF) = 68, *A. giton* com $2n = 50$ cromossomos, seis metacêntricos, oito submetacêntricos, oito subtelo-cêntricos e vinte e oito acrocêntricos, (NF) = 72, *A. scabripinnis* de $2n = 50$ cromossomos, sendo compostos de oito metacêntricos, vinte submetacêntricos, oito subtelo-cêntricos e quatorze acrocêntricos com (NF) = 86.

Os resultados acima relatados para o gênero *Astyanax*, principalmente *Astyanax scabripinnis*, apontam para a idéia de que esse grupo de peixes parece ter evoluído separadamente devido a habitarem vários sistemas hídricos, ocorrendo uma grande variedade de citótipos, com números diplóides variando de $2n = 46$, 48 e 50 (MOREIRA-FILHO, GALETTI JUNIOR e BERTOLLO, 2004).

A família Erythrinidae é outro grupo de peixes que possui uma grande variação de cariótipos entre seus gêneros. Bertollo *et al.* (1997), estudando *Hoplias malabaricus*, descobriram uma variação do número de cromossomos de seus cariótipos, $2n = 40$ para as fêmeas e $2n = 39$ cromossomos para os machos, isso devido a uma característica restrita a poucos peixes com sistema sexual múltiplo. *Hoplias malabaricus* é considerada uma espécie complexa, pois apresenta populações com um variado número de cromossomos em seus cariótipos, mostrando uma grande distribuição geográfica, embora alguns citótipos pareçam ser endêmicos de determinadas regiões; às vezes ocorre uma simpatria entre dois citótipos diferentes, sem que apareçam formas híbridas entre as duas populações, caracterizando falta de fluxo gênico e mostrando que as diferenças cromossômicas estão bem estabelecidas e distintas (BERTOLLO *et al.*, 2000).

Bertollo *et al.* (2000) descobriram em seus estudos sete citótipos diferentes para *Hoplias malabaricus*, mostrando combinações únicas entre os números e a morfologia cromossômica em seus cariótipos. Os autores agruparam os citótipos em A, B, C, D, E, F e G, apontando as respectivas diferenças. No citótipo A, os peixes capturados nas bacias hidrográficas do norte do Uruguai, Brasil meridional e norte da Argentina, apresentaram $2n = 42$ cromossomos meta e submetacêntricos, sem

diferença entre os sexos. O citótipo B que também contém um número cromossômico de $2n = 42$ e uma estrutura cariotípica semelhante ao espécime do citótipo A, apresentou um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, restritos apenas à região dos lagos do Vale do Rio Doce. Os peixes com o citótipo C mostraram um número diplóide de $2n = 40$ cromossomos, metacêntricos e submetacêntricos, sem que houvesse diferenciação entre os sexos, sendo esses animais encontrados entre o norte do Brasil e o nordeste da Argentina. No citótipo D as fêmeas mostraram $2n = 40$ cromossomos, semelhante ao citótipo C, mas os machos apresentaram $2n = 39$ cromossomos, sendo todos meta e submetacêntricos, caracterizando um sistema sexual múltiplo. O número diplóide dos citótipos A e B é maior que os citótipos C e D. Estes quatro citótipos mostraram cariótipos com um aspecto geralmente semelhante, onde o primeiro dos quatro pares cromossômicos apresentou-se maior que o restante. No citótipo E, semelhante ao citótipo A em número e forma dos cromossomos, ocorreu um evento raro em *Hoplias malabaricus*, aparecendo um cromossomo acrocêntrico no sexto par; esta variância ocorreu somente no rio Trombetas localizado no Estado do Pará. O citótipo F, como o citótipo C, é caracterizado pelo mesmo número de cromossomos $2n = 40$, sendo metacêntricos e submetacêntricos, também sem diferenciação entre os sexos. Mostrou-se com um grande cromossomo metacêntrico, iniciando o cariótipo da espécie. É a forma mais comum, podendo ser encontrada do Suriname até o sudeste brasileiro. No citótipo G ocorreu uma diferenciação entre machos e fêmeas, onde os machos apresentaram $2n = 41$ cromossomos, formando um sistema sexual múltiplo que acrescenta um cromossomo a mais nos machos da espécie. As fêmeas são $2n = 40$ cromossomos e ambos os sexos apresentam formas cromossômicas metacêntricas e submetacêntricas com um grande cromossomo formando o primeiro par. O maior metacêntrico e o cromossomo acrocêntrico são compartilhados com os citótipos E e F. A distribuição geográfica destas formas cromossômicas é restrita para alguns locais amazônicos.

Uma outra forma de variação no número de cromossomos observada nos peixes é a triploidia natural. Esses relatos têm aparecido com mais frequência nos últimos anos, devido ao grande número de pesquisas desenvolvidas em citogenética de peixes. Espécies como *Misgurnes anguicaudatus*, *Curimata modesta*, *Hesperoleucus symmetricus*, *Eigenmannia sp.*, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, *Astyanax schubarti*, *A. eigenmanniorum* e *A. scabripinnis*, são alguns exemplos de animais possuidores dessa variação no número cromossômico (MALACRIDA, DIAS e GIULIANO-CAETANO, 2003).

Fauaz, Vicente e Moreira-Filho (1994) estudaram duas espécies de *Astyanax* oriundos do rio Grande, em Volta Grande no Estado de Minas Gerais e no rio das Pedras em Campos do Jordão, Estado de São Paulo. Os pesquisadores analisaram trinta *A. eigenmanniorum* e setenta e quatro de *A. scabripinnis*, ambos com número cariotípico de $2n = 50$ cromossomos. Três casos de triploidia natural foram descobertos, dois exemplares de *A. eigenmanniorum*, um macho e uma fêmea, e um espécime fêmea de *A. scabripinnis* que possuía dois cromossomos supranumerários.

Maistro *et al.* (1994) observaram dois casos de triploidia natural em *Astyanax scabripinnis* vindos do rio Araquá, um tributário do rio Tietê, localizado no município de Botucatu e do Córrego das Pedras, município de Campos do Jordão, ambas as cidades pertencentes ao Estado de São Paulo. Um animal $3n + 1$, capturado em Botucatu, além de apresentar triploidia, possuía um macrocromossomo B. Outro exemplar, coletado em Campos do Jordão, possuía um valor cromossômico de $3n + 2$, ou seja, triplóide e com dois macrocromossomos B. Os autores sugeriram que os casos de aparecimento de triploidia natural são provavelmente devido a choques térmicos ocorridos durante a fecundação externa desses animais, já que habitam cabeceiras de cursos d'água onde as altitudes elevadas e o pequeno volume existente contribuem para a queda rápida da temperatura.

Uma importante ferramenta citotaxonômica para identificação e estudos evolutivos em peixes é o uso de nitrato de prata (AgNO_3) para a identificação das regiões organizadoras de nucléolos (RON). A RON é encontrada em sítios de DNAr responsáveis pela reorganização dos nucléolos após o processo de divisão celular. Seu emprego consiste em impregnar com AgNO_3 as regiões dos cístrons ribossômicos, responsáveis pela formação do RNAr, preferindo as proteínas acídicas, não histônicas (HOWELL, 1977).

Na família Erythrinidae, observaram-se animais com variação do número de RONs, como descrito por Diniz e Bertollo (2003) em populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus* variando de duas, quatro e seis marcações localizadas em regiões intersticiais (pares de cromossomos meta e submetacêntricos) e regiões teloméricas em braços curtos de cromossomos subtelocêntricos, mais um par de cromossomos acrocêntricos, além de um quarto cromossomo ocasional meta e submetacêntrico que procede de uma RON intersticial.

No estudo de três espécies de *Pimelodus*, Souza, Giuliano-Caetano e Dias (2003) observaram que todos os três peixes deste gênero, *P. argenteus*, *P. misteriosus* e *P. maculatus*, possuíam duas marcações evidenciadas pela prata em um par de cromossomos subtelocêntricos, sempre em posição

terminal, nos braços curtos dos cromossomos de *P. argenteus* e *P. mysteriosus* e nos braços longos dos cromossomos de *P. maculatus*.

Alguns peixes, como o gênero *Astyanax*, apresentaram RONS múltiplas, obtendo vários padrões sobre as marcações argênticas. Pacheco, Giuliano-Caetano e Dias (2001), analisando *Astyanax altiparanae*, coletados no rio Claro, município de Tamarana, no Estado do Paraná, observaram três citótipos diferentes, em que o número cromossômico dos quatorze espécimes capturados era de $2n = 50$ cromossomos. Em todos eles foram detectadas múltiplas RONS em regiões teloméricas nos braços longos e/ou curtos de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, apresentando uma variação de um a quatro cromossomos nucleolares portadores das regiões organizadoras de nucléolos.

Kavalco e Moreira-Filho (2003), analisando quatro espécies de lambari, *A. scabripinnis* (rio Macacos), *A. giton* (rios Paraitinga e Jacuí), *A. parahybae* e *A. intermedius* (rio Paraitinga), todos fazendo parte da bacia do rio Paraíba do Sul, apresentaram, após impregnação pela prata, duas marcações em um par de cromossomos acrocêntricos em *A. scabripinnis*. Em *A. parahybae* a impregnação pela prata revelou múltiplas RONS em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, com número modal de duas marcas sobre o par metacêntrico. Em *A. intermedius*, os pesquisadores encontraram mais de seis marcações, evidenciadas pela prata, tanto nos braços curtos como nos braços longos de cromossomos acrocêntricos. Os exemplares de *Astyanax giton* apresentaram também acima das seis marcas, com valor modal igual a duas marcações em pares de cromossomos acrocêntricos.

Malacrida, Dias e Giuliano-Caetano (2003), pesquisando uma população de *Astyanax* aff. *scabripinnis*, coletada no córrego de Apertados, localizado no município de Londrina no Estado do Paraná, encontraram duas a seis marcações referentes a RON, prevalecendo quatro marcas de impregnação pela prata.

Outra importante ferramenta para estudar a variação na estrutura dos cromossomos é a realização de banda C. O estudo da heterocromatina constitutiva revela, através da caracterização de blocos heterocromáticos, os tipos de especiação ocorridos nas famílias de peixes neotropicais, produzindo variações cromossômicas (OLIVEIRA e WRIGHT, 1998). A heterocromatina foi identificada por apresentar-se compactada durante a intérfase, sendo transcricionalmente inativa. Possivelmente o papel estrutural da heterocromatina seria de promover a proteção de genes importantes do DNA, evitando sua destruição ou mudanças em seu código genético. A associação

da heterocromatina ao centrômero nos cromossomos acrocêntricos provavelmente induz o aparecimento de translocações cromossômicas (YUNIS *et al.*, 1971 *apud* MOLINA, 1995).

Em *Moenkhausia sanctaefilomenae*, Foresti *et al.* (1989) descobriram blocos heterocromáticos positivos para banda C, marcados em quase todos os cromossomos e também um padrão de faixas intersticiais localizadas na mesma posição em relação aos centrômeros no braço longo de um número grande de cromossomos.

Wasko, Venere e Galetti Junior (1996) observaram, em duas espécies de *Bryconamericus* vivendo simpatricamente no rio Piracicaba, município de Piracicaba, no Estado de São Paulo, que possuíam blocos de heterocromatina centromérica e telomérica nos cromossomos, assim como em pequenas regiões intersticiais, mostrando que não há diferenças significativas entre os dois cariótipos das duas espécies.

Estudando peixes da família Prochilodontidae, Maistro, Oliveira e Foresti (2000) analisaram nove espécimes de *Prochilodus lineatus*, vindos do rio Mogi-Guaçu, cidade de Pirassununga, no Estado de São Paulo, onde os autores descobriram, através de bandas C, fortes marcações de blocos heterocromáticos em regiões pericentroméricas, mostrando manchas bem extensas com presença de heterocromatina constitutiva terminal.

Analisando o conteúdo do DNA de alguns Anostomidae e seus cariótipos, Pereira *et al.* (2002) estudaram *Leporinus friderici*, *L. octofasciatus*, *L. striatus* e *Schizodon nasutus*, provenientes do rio Sapucaí, afluente do Rio Grande, no município de Alfenas, no Estado de Minas Gerais, onde observaram marcas de bandas C sobre regiões teloméricas em cada braço cromossômico de alguns pares de cromossomos em *L. friderici* (par de número 13) e *L. octofasciatus*, sendo praticamente ausente nas regiões centroméricas de todos os cromossomos destas espécies. Alguns cromossomos mostraram segmentos heterocromáticos nas regiões centroméricas em *Leporinus striatus*, além de apresentarem faixas teloméricas e grandes marcações nos pequenos braços de alguns pares de submetacêntricos. Em *Schizodon nasutus* as bandas C foram evidenciadas somente nas regiões do centrômero.

Souza, Giuliano-Caetano e Dias (2003) estudaram três espécies de *Pimelodus* provenientes da bacia do rio Paraguai. Os pesquisadores analisaram dezessete espécimes de *Pimelodus argenteus*, trinta e nove de *P. misteriosus* e sete de *P. maculatus*, todos vindos de Corumbá, no Estado do Mato Grosso do Sul. Usando a técnica de banda C, os espécimes de *P. argenteus* e *P. misteriosus* mostraram uma distribuição uniforme em vários cromossomos do cariótipo, principalmente em

regiões teloméricas. *Prochilodus argenteus* mostrou-se com um par de cromossomos com marcações terminais um pouco mais acentuadas que os demais, sendo provavelmente influenciada pela RON. Em *P. maculatus*, as marcações heterocromáticas também marcaram as regiões teloméricas de vários cromossomos, entretanto, com mais evidência em um par com fortes sinais intersticiais. Os autores concluíram que, por ser a distribuição da heterocromatina diferente entre as três espécies de peixes, o emprego da técnica de banda C na caracterização das espécies, é uma importante ferramenta citotaxonômica.

Outra forma de análise citotaxonômica é através da técnica de coloração dos cromossomos pela Cromomicina A₃ (CMA₃), utilizada para que se identifiquem regiões do DNA ricas em bases GC-específicas. As marcações fornecidas por esta técnica apresentam-se em cor verde cintilante, sendo análogas aos evidenciados pela impregnação deixada pelo nitrato de prata.

Maistro, Oliveira e Foresti (2000) analisaram *Prochilodus lineatus* vindos do rio Mogi-Guaçu, município de Pirassununga, localizado no Estado de São Paulo. Através da CMA₃ foram marcadas as regiões análogas formadas pelas RONS, sugerindo que essas regiões fossem ricas em pares de bases GC. O mesmo não ocorreu com os cromossomos supranumerários, encontrados em *P. lineatus*, mostrando que estes Bs provavelmente não são ricos em bases guanina e citosina. Os pesquisadores também descobriram algumas regiões cromossômicas marcadas pelo fluorocromo, comprovando que provavelmente esses segmentos também sejam ricos em GC.

Pacheco, Giuliano-Caetano e Dias (2001) analisaram uma população de *Astyanax altiparanae* coletada no rio Claro, município de Tamarana, no Estado do Paraná. Os animais foram submetidos ao tratamento com CMA₃, a fim de confirmarem as marcações relativas as RONS. Os autores encontraram de um a seis cromossomos com variações polimórficas confirmadas pelo fluorocromo, incluindo a região terminal de um submetacêntrico.

Utilizando o mesmo tratamento, Pereira *et al.* (2002) estudaram quatro espécies de Anostomidae: *Leporinus friderici*; *L. striatus*; *L. octofasciatus* e *Schizodon nasutus*, com a finalidade de compará-los, marcando as constricções secundárias e as regiões organizadoras de nucléolo. Entretanto, em *Leporinus friderici* os pesquisadores encontraram marcas cintilantes, coradas pela a CMA₃ em regiões centroméricas e teloméricas, no par cromossômico de número treze, o que não aconteceu nas outras espécies.

Souza, Giuliano-Caetano e Dias (2003) pesquisaram três espécies de Pimelodidae, descobrindo que em *Pimelodus maculatus* as marcações pela cromomicina não só impregnaram as

regiões correspondentes as RONS, mas também ocorreram marcações em outros cromossomos. Um par cromossômico com manchas intersticiais, que já havia sido identificado pela técnica de banda C, mostrou que esta espécie apresentava composições diferentes das outras duas por possuírem regiões ricas em GC, principalmente nos telômeros de vários cromossomos. Em *P. argenteus* e *P. mysteriosus* o fluorocromo cromomicina A₃ marcou somente as regiões determinadas pelas RONS. Portanto, a utilização de fluorocromos GC e AT específicos vem fornecendo importantes dados qualitativos envolvendo regiões heterocromáticas dos cromossomos dos peixes.

2.3 Cromossomos Supranumerários em peixes

Os cromossomos supranumerários são também conhecidos como cromossomos B, acessórios, extras ou ainda cromossomos adicionais, sendo estes não possuidores de homologia com os cromossomos do complemento padrão, ditos cromossomos A (BEUKEBOON, 1994; MIZOGUSHI e MARTINS-SANTOS (1997). Podem variar de forma, número, tamanho e também podem se apresentar em sexos separados ou em ambos os sexos (MARTINS, GIULIANO-CAETANO e DIAS 1996; NEO *et al.* 2000b). Essas variações cariotípicas são extremamente comuns em peixes, podendo ser encontradas em células de um mesmo indivíduo, em uma população ou ainda em populações diferentes (BEUKEBOON, 1994).

Os cromossomos supranumerários fazem parte do grupo de polimorfismos numéricos, sendo uma característica neutra. Esses cromossomos variam sua frequência nas diferentes espécies de plantas e animais, onde provavelmente sofreram desestabilização durante a divisão mitótica e/ou meiótica (JONES, 1991).

Assim, uma definição para cromossomos B seria: cromossomos adicionais e dispensáveis, presentes em alguns indivíduos e em algumas populações de determinadas espécies, que provavelmente tenham se originado de rearranjos estruturais de um cariótipo ancestral sofrendo a não disjunção de cromossomos A ou de cromossomos sexuais seguidos por uma inativação, mas que

seguem sua própria evolução (VOLOBUJEV, 1981). Dessa forma, os cromossomos B não constituem elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos.

Em peixes, os primeiros estudos revelando a presença de cromossomos B foram em *Prochilodus lineatus* (citado como *Prochilodus scrofa* PAULS and BERTOLLO, 1983), onde os autores descobriram 0 a 5 cromossomos supranumerários. Porém, mais tarde, estes foram encontrados entre os Prochilodontidae, Curimatidae, Parodontidae, Characidae, Pimelodidae, Callichthyidae, Loricariidae, Cichlidae e Coregonidae. Entre todos citados acima a família Characidae é a mais freqüente em Bs, especialmente a subfamília Tetragonopterinae (MIZOGUSHI e MARTINS-SANTOS, 1997). Esses cromossomos extras podem se apresentar em três formas distintas, variando desde os macrocromossomos, pequenos cromossomos e microcromossomos.

Maistro (1991), em seu trabalho de dissertação, encontrou em *Astyanax scabripinnis paranae*, um macrocromossomo supranumerário, na população do rio Araquá. Ainda em *Astyanax scabripinnis*, Maistro *et al.* (1992) relatam a ocorrência de um macrocromossomo B encontrado somente nas fêmeas da população do córrego Cascatinha, município de Botucatu, Estado de São Paulo, que possivelmente é causa de controle ou da interferência adaptativa.

Analisando exemplares de *Astyanax scabripinnis* em Campos do Jordão, Estado de São Paulo, Salvador e Moreira-Filho (1992) encontraram duas formas de macrocromossomos B, quanto ao bandamento C. Estes cromossomos supranumerários apresentavam-se ou totalmente heterocromáticos ou com regiões medianas eucromáticas nos lados do centrômero e possuía grandes blocos heterocromáticos em suas extremidades (posição distal). A população estudada pelos pesquisadores era composta de trinta e dois espécimes de *Astyanax scabripinnis*, sendo que eles encontraram cromossomos B em vinte e oito peixes, perfazendo 87,5% da amostra analisada.

Uma hipótese interessante sobre os cromossomos supranumerários em *Astyanax scabripinnis* foi proposta por Vicente, Moreira-Filho e Camacho (1996), sugerindo que os cromossomos B, baseando-se no bandamento C, são provavelmente derivados de grandes braços do par de cromossomos acrocêntricos do número 24.

Fauaz, Vicente e Moreira-Filho (1994), estudando duas espécies de *Astyanax*, *A. eigenmanniorum* e *A. scabripinnis*, descobriram também nessa última espécie cromossomos supranumerários. Estes vieram do Rio das Pedras, município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, onde foram pescados setenta e quatro espécimes, obtendo um número diplóide igual a $2n = 50$ cromossomos com $(NF) = 88$, obtidos para ambos os sexos. Entretanto, cinquenta e seis

espécimes do total possuíam cromossomos extras, aparecendo em todas as metáfases analisadas. Foi capturada também uma fêmea que apresentava triploidia natural e dois cromossomos B de tamanho igual ao primeiro par do cariótipo.

Maistro *et al.* (1994) estudaram duas populações de *Astyanax scabripinnis*, descobrindo em ambas a presença de cromossomos acessórios e dois espécimes triplóides, ambos com cromossomos supranumerários, uma em cada população. A primeira composta de quarenta animais que vieram do rio Araquá, afluente do rio Tietê, localizado no município de Botucatu, Estado de São Paulo, onde as fêmeas apresentaram 50% de cromossomos B. A segunda população, representada por oitenta e seis animais que foram coletados no córrego das Pedras, município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, onde 73% dos peixes coletados apresentaram um ou dois cromossomos extras.

Salvador e Moreira-Filho (1992) e Fauaz, Vicente e Moreira-Filho (1994) sugerem que o frio aliado a altitudes possa contribuir para a ocorrência da não disjunção na meiose em óvulos, ocasionando uma triploidia natural.

Neo, Bertollo e Moreira-Filho (2000), analisando 202 espécimes de *Astyanax scabripinnis* provindos do Riacho Grande, localizado no município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, capturaram em três diferentes altitudes (700, 1800 e 1920m) peixes possuidores de um a dois cromossomos extras, todos heterocromáticos conforme os resultados de banda C, sendo de três tipos diferentes, um cromossomo pequeno e dois macrocromossomos. Os animais capturados a 1920m de altitude apresentaram dois tipos de grandes cromossomos, um metacêntrico e um submetacêntrico. O terceiro apresentou-se com um pequeno metacêntrico correspondente ao terceiro par cromossômico. Quando analisada a população do Riacho Grande a 1800m de altitude, somente dois tipos de cromossomos acessórios foram descobertos, um do tipo metacêntrico e o outro submetacêntrico e a 700m de altitude não foi encontrado nenhum cromossomo supranumerário.

Moreira-Filho *et al.* (2001) analisaram populações de *A. scabripinnis* provindos do córrego das Pedras, na cidade de Campos do Jordão, Estado de São Paulo e descobriram peixes portadores de 1 a 2 macrocromossomos B em todos os seus cariótipos, similares ao tamanho do primeiro par do conjunto cromossômico. Os pesquisadores também observaram a presença de um grande cromossomo extra em animais das espécies *A. fasciatus* vindos do rio São Francisco, em Três Marias, Estado de Minas Gerais e *A. schubarti*, vindos do rio Paraná em Posadas, Misiones, Argentina.

Moreira-Filho, Galetti Junior e Bertollo (2004) sugerem que o aparecimento dos grandes cromossomos B metacêntricos em *Astyanax scabripinnis* vem provavelmente de uma remota origem, antes mesmo de o gênero ter se especiado. Os autores relatam a existência de quatro tipos cromossômicos adicionais em *Astyanax*: os macrocromossomos B, metacêntricos (mais freqüentes) e os submetacêntricos, os pequenos cromossomos B, metacêntricos e os micro-cromossomos B. Segundo inicialmente proposto por Dias, 1994, *apud* Moreira-Filho, Galetti Junior e Bertollo (2004), a ocorrência de grandes cromossomos B metacêntricos, provavelmente apareceu por um mecanismo de formação de isocromossomos, onde, de acordo com Vicente, Moreira-Filho e Camacho (1996), tal cromossomo possivelmente seja derivado do par de cromossomos de número 24 do cariótipo padrão. Considerando ainda *A. scabripinnis*, é interessante o fato de que, ao longo de um mesmo ribeirão, cromossomos B estarem presentes em populações localizadas em elevadas altitudes, estando ausentes ou em freqüência bem menor em populações localizadas em baixas altitudes (PORTO-FORESTI *et al.*, 1997; NÉO, BERTOLLO e MOREIRA-FILHO, 2000).

Além dos grandes cromossomos B, existem espécies de peixes que apresentam pequenos e micro-cromossomos Bs. Como exemplos de micro-cromossomos existem estudos com peixes do gênero *Prochilodus scrofa* (*Prochilodus lineatus*). Pauls e Bertollo (1983), analisando cinquenta e nove animais, encontraram cinquenta e oito portando 5 micro-cromossomos supranumerários. A ocorrência deste tipo de cromossomo supranumerário também foi relatada em outras populações desta espécie (MAISTRO, OLIVEIRA e FORESTI 2000). Em *Gymnogeophagus balzanii*, Feldberg *et al.* (1984), estudando quatro espécimes, descobriram 4 micro-cromossomos em três exemplares. Almeida-Toledo *et al.* (1985), analisando cinco espécimes de *Pimelodella kronei*, encontraram um exemplar portador de 1 micro-cromossomo extra. Pauls (1985) observou sete exemplares de *Prochilodus cearensis* e destes, cinco portavam dois micro-cromossomos e Venere e Galetti Junior (1985), analisando dez espécimes de *Curimata modesta*, encontraram um exemplar triplóide ($3n = 81$), portador de um micro-cromossomo adicional.

Foresti, Almeida-Toledo e Toledo (1989), analisando trinta exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, provenientes do rio Capivara um afluente do rio Tietê, localizado no município de Botucatu, no Estado de São Paulo, relataram a ocorrência de um a oito pequenos cromossomos extras em todos os espécimes estudados, sendo que, nos animais avaliados, houve a presença também de um micro-cromossomo adicional.

Cyphocharax modesta ($2n = 54$) é uma espécie de Curimatidae, da qual a população do riacho Três Bocas, município de Londrina, Estado do Paraná, apresentou três fêmeas em um total de treze espécimes capturados, que possuíam em todos os seus cariótipos um pequeno cromossomo B do tipo metacêntrico, sendo este totalmente heterocromático (MARTINS, GIULIANO-CAETANO e DIAS, 1996). Segundo os autores, este cromossomo supranumerário é uma característica geral da espécie, não apresentando uma ocorrência normal em determinadas populações, atribuída à alta mobilidade destes peixes. Os autores propuseram duas hipóteses para a ocorrência dos cromossomos acessórios; a primeira sugere que estes cromossomos surgissem de antepassados da família Curimatidae, sendo eliminados nas espécies atuais. A segunda hipótese sugere uma origem recente, independente, acontecendo nas espécies que o portam. Este, provavelmente, surgiu de uma não disjunção de um cromossomo do complemento A com perda de cromatina, resultando em um pequeno cromossomo B.

2.4 Mecanismos Cromossômicos de Determinação do Sexo em Peixes

Embora a maioria das espécies de peixes não apresentem cromossomos sexuais morfológica e estruturalmente diferenciados, podem-se encontrar espécies com cromossomos diferenciados representando sistemas de heterocromossomos ou cromossomos sexuais. São caracterizados e identificados por dois padrões, conforme a presença de regiões heterocromáticas; uns são representados pelas letras ZZ (machos, homogaméticos) e ZW (fêmeas, heterogaméticas), e outros representados pelas letras XX (fêmeas homogaméticas) e XY (machos heterogaméticos).

Entre os peixes possuidores de sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, Moreira-Filho, Bertollo e Galetti Junior (1980) analisaram exemplares através da técnica de banda C, de *Apareiodon affinis*, descobrindo em algumas fêmeas, portadoras de um sistema sexual múltiplo ZZ/ZW₁W₂, que estas apresentavam $2n = 55$ cromossomos e os machos $2n = 54$. Entretanto, alguns exemplares desta espécie, encontrados em alguns pontos do rio Paraná, não apresentavam este

sistema sexual múltiplo, sendo encontrados indivíduos com $2n = 54$ cromossomos para ambos os sexos.

Nos peixes da família Parodontidae, Moreira-Filho, Bertollo e Galetti Junior (1993) analisaram vinte e seis exemplares de *Parodon hilarii* (14 fêmeas e 12 machos), coletados em pequenos tributários do rio São Francisco, no distrito de Três Marias, no Estado de Minas Gerais. Todos os animais possuíam $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com $(NF) = 108$ cromossomos, embora as fêmeas possuíssem um grande cromossomo W subtelocêntrico, caracterizando um sistema sexual ZZ/ZW. Para os machos, os autores sugeriram um cromossomo mediano, equivalente ao de número nove no cariótipo correspondente ao cromossomo Z.

Entre os peixes portadores de sistema sexual do tipo XX/XY, Almeida-Toledo, Foresti e Almeida-Toledo Filho (1984) analisaram vinte e duas espécimes de peixes do gênero *Eigenmannia*, coletadas em um pequeno tributário do rio Tietê, localizado na cidade de Botucatu, no Estado de São Paulo, e descobriram um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX, AA / X, YA A. Seis dos machos capturados possuíam um número diplóide igual a $2n = 31$ cromossomos e para todas as fêmeas $2n = 32$, porém, o sétimo exemplar macho possuía um número cromossômico igual a $2n = 30$. Os autores concluíram que, provavelmente para a espécie *Eigenmannia sp.*, possa ter ocorrido fusão cromossômica dos autossomos, indicando a ocorrência de um sistema cromossômico polimórfico dentro deste gênero.

A família Loricariidae é uma das maiores em espécies de peixes neotropicais de água doce existentes na América do Sul. Pertencem a esta família a sub-família Hypoptopomatinae, na qual encontra-se um gênero monotípico: *Pseudotocinclus tietensis*. Analisando treze espécimes, nove machos e quatro fêmeas, vindas das cabeceiras do rio Tietê, localizado na cidade de Paranapiacaba, no Estado de São Paulo, Andreatta *et al.* (1992) perceberam um sistema de cromossomo sexual do tipo XX/XY, através da técnica de banda C, mostrando um heteromorfismo nos machos e um homomorfismo nas fêmeas.

Bertollo *et al.* (1997), estudando doze exemplares de *Hoplias malabaricus*, vindos do reservatório Monjolinho e do rio Mogi-Guaçu, ambos pertencentes à bacia do rio Paraná, descobriram um sistema sexual múltiplo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$.

Segundo Bertollo *et al.* (2000), populações de *Hoplias malabaricus* apresentaram citótipos diferenciados em populações interespecíficas das quais podem não apresentar nenhum sistema de cromossomo sexual aparente (citótipos A, C e F). No entanto, apresentam um sistema XX/XY, onde

os cromossomos X subtelocêntricos podem ser polimórficos no tamanho (citótipo B), sistema sexual múltiplo $X_1X_1X_2X_2$ para as fêmeas e X_1X_2Y , para os machos (citótipo D). No citótipo G as fêmeas são normais XX , mas os machos apresentaram um cromossomo a mais, formando o conjunto XY_1Y_2 (BERTOLLO, TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO, 1983). Baseados em sua macroestrutura, os autores puderam determinar sete configurações básicas de cariótipos recorrendo aos citótipos encontrados.

2.5 Considerações sobre os peixes do gênero Characidium

Os peixes estudados neste trabalho são do grupo Characidiinae, que inclui aproximadamente 58 espécies nominais, além de outras espécies não descritas (BUCKUP, 1991, *apud* MAISTRO, 1998). O gênero Characidium sp inclui peixes de tamanho pequeno, não ultrapassando os 10 cm de comprimento, possuem o corpo fusiforme, com boca pequena e terminal (BUCKUP, 1991, *apud* CENTOFANTE, BERTOLLO e MOREIRA-FILHO, 2001), nadadeiras peitorais com implantação baixa que, juntamente com as pélvicas, são adaptadas para funcionar como ventosas, onde o animal pode se apoiar no substrato, permitindo que este possa enfrentar águas rápidas (Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande, 2000). O peixe é conhecido popularmente com os nomes de piquira, piquirinha, piabinha, canivetinho ou mocinha. Servem como forrageiro a outros peixes maiores, reproduzindo-se nas épocas da primavera ao verão, onde as águas se tornam mais quentes e ricas em plâncton, podendo fazer a desova três vezes ao ano: em outubro, em janeiro e finalmente em fins de março, sendo um animal de desova parcelada (MAGALHÃES, 1931). É uma espécie muito utilizada também em aquarofilia, sendo sua captura feita em cursos d'água com bastante capim plantado em suas margens.

Miyazawa e Galetti Junior (1994) estudaram quatro diferentes espécies de peixes do gênero Characidium, todos possuindo número diplóide de $2n = 50$ cromossomos. Estes animais foram coletados em diferentes locais do Estado de São Paulo. Vinte e três espécimes de C. cf. zebra, vieram do reservatório de Jataí, município de Luis Antonio, vinte e oito espécimes vindos do rio

Passa Cinco, município de Ipeúna e quatro fêmeas vindas do rio Piracicaba, município de Piracicaba, todos possuindo cromossomos meta e submetacêntricos. Os animais provenientes dos rios Passa Cinco e Piracicaba eram portadores de um pequeno par de cromossomos submetacêntricos com marcações RON e os provenientes do reservatório de Jataí, possuíam até três marcações RON. Quanto aos blocos heterocromáticos, ficaram restritos às regiões centroméricas daqueles peixes vindos do rio Passa Cinco e Piracicaba e os provindos do reservatório de Jataí os possuíam no centrômero e também em algumas regiões teloméricas, possivelmente relacionadas às RONs. Três espécimes de *C. cf. lagsantensis*, mais uma fêmea de *Characidium* sp. da lagoa Infernã, localizada no rio Mogi-Guaçu, estação ecológica de Jataí, município de Luis Antonio, apresentando $2n = 50$ cromossomos, meta e submetacêntricos, e oito espécimes de *C. pterostictum* vindos da estação ecológica de Carlos Botelho, município de São Miguel de Arcanjo, mostraram também $2n = 50$ cromossomos, porém com um par de cromossomos medianos subtelo-cêntricos que provavelmente podem ter surgido por inversão pericêntrica. Nessa espécie o primeiro par do grupo dos metacêntricos foi menor que o primeiro par dos cromossomos submetacêntricos, o que pode ter ocorrido através de translocações ou deleções no decorrer da evolução dessa espécie, reduzindo o primeiro par dos cromossomos metacêntricos.

Maistro *et al.* (1998) pesquisaram quarenta e três espécimes de *C. cf. fasciatum* (reidentificado como *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* (CENTOFANTE *et al.*, 2003). Formadas por duas populações provenientes do rio Pardo, município de Botucatu e do córrego do Quinta, município de Itatinga, ambos localizados no Estado de São Paulo. Os peixes analisados possuíam um número diplóide de $2n = 50$ cromossomos meta e submetacêntricos, sendo encontrados alguns animais com $2n = 51$ a 54 , devido à presença de 1 a 4 cromossomos B. Através de banda C, os pesquisadores relataram blocos heterocromáticos pericentroméricos em todos os cromossomos, mais acentuados na região do braço longo do par 19. Um dos cromossomos deste par mostrou-se totalmente heterocromático nas fêmeas, indicando a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. Pela técnica argêntica encontraram um par submetacêntrico, o de número 17, que continha marcas correspondentes às RONs localizadas nos braços longos desses cromossomos.

Analisando duas espécies simpátricas de *Characidium*, *C. gomesi* e *C. cf. zebra*, ambas com número igual a $2n = 50$ cromossomos meta e submetacêntricos, vindos do riacho de Paiol Grande, município de São Bento do Sapucaí, no Estado de São Paulo, Centofante *et al.* (2001) encontraram

para a espécie *C. gomesi* um sistema sexual do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo W apresentou-se totalmente heterocromático, sendo pequeno em relação ao Z, representado pelo segundo par do cariótipo. Através da técnica de banda C, os pesquisadores puderam observar em *C. gomesi*, regiões pericentroméricas e teloméricas discretamente marcadas pela heterocromatina. Pela impregnação de prata, foi observada uma forte marcação telomérica em longos braços do par submetacêntrico de número 18, diferentemente de *C. cf. zebra* onde foram encontradas marcações argênticas em posição intersticial em longos braços de um pequeno par de cromossomo submetacêntrico, o de número 23, coincidindo com pequenos blocos heterocromáticos. Outro fator de diferenciação entre as duas espécies relaciona-se quanto ao tamanho dos primeiros cromossomos cariotípicos. Em *C. cf. zebra* o primeiro par cromossômico é maior que o segundo, sendo que em *C. gomesi* estes pares cromossômicos têm aproximadamente o mesmo tamanho. Os autores encontraram ainda um espécime de *C. gomesi* triploide ($2n = 3x = 75$) que portava dois cromossomos Z e um W.

Centofante *et al.* (2003) analisaram duas novas espécies de *Characidium* vivendo simpatricamente, *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* e *C. lauroi*, vindos do córrego Ribeirão Grande, afluente do rio Paraíba do Sul, município de Pindamonhangaba, no Estado de São Paulo, ambos possuindo um número cariotípico igual a $2n = 50$ cromossomos. Entretanto, foi encontrado em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* um padrão cariotípico contendo trinta cromossomos metacêntricos e vinte submetacêntricos, diferente dos demais *Characidium* analisados. Normalmente esses animais possuem trinta e dois metacêntricos e dezoito submetacêntricos, com exceção dos portadores de supranumerários e cromossomos sexuais. Nessa espécie observou-se um novo sistema de cromossomos sexuais composto por cromossomos metacêntricos Z e W de mesmo tamanho, onde o W é totalmente heterocromático. A heterocromatina constitutiva apareceu na região pericentromérica em ambos os sexos. As marcações das RONS apareceram em longos braços do par cromossômico 16, em posição distal. No padrão cariotípico de *C. lauroi*, os autores encontraram vinte e quatro cromossomos metacêntricos, vinte e quatro cromossomos submetacêntricos e dois subteloicêntricos. Os blocos de banda C mostraram-se pericentroméricos em todos os cromossomos, sendo alguns teloméricos. A impregnação pela prata mostrou-se também telomérica em pares cromossômicos de número cinco e vinte e três, estando presente em até três cromossomos.

Maistro *et al.* (2004) analisaram trinta e um espécimes de *Characidium gomesi*, provenientes do rio Pardo, localizado no município de Botucatu, no Estado de São Paulo, onde o número cromossômico foi de trinta e dois metacêntricos e dezoito submetacêntricos, confirmando os

resultados encontrados também por Maistro *et al.* (1998). Anteriormente esse peixe fora classificado como *C. cf. fasciatum*, assumindo a classificação atual. Os autores analisaram comparativamente a composição da heterocromatina presente nos cromossomos A, B e nos cromossomos sexuais ZW, encontrando diferenças entre as mesmas, além de relatarem diferenças de morfologia e número de cromossomos B em exemplares desta população.

2.6 OBJETIVOS

O presente estudo faz parte de um projeto amplo que visa à amplificação de dados citogenéticos sobre os peixes de cabeceira da região sul de Minas Gerais, tendo como objetivo específico:

1.1 Caracterizar cromossomicamente diferentes populações de *Characidium*, coletados em ribeirões que deságuam no Rio Sapucaí, afluente do Rio Grande, para a determinação do número diplóide e morfologia dos cromossomos.

1.2 Aplicar técnicas de coloração e bandamentos cromossômicos diferenciais, tais como Banda C, Ag-RON e Cromomicina A₃, que forneçam dados sobre as regiões organizadoras de nucléolo, padrão de distribuição e composição da heterocromatina constitutiva, visando contribuir com informações mais detalhadas a respeito dos mecanismos de diferenciação cromossômica ocorridos nestas espécies e/ou populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

No presente trabalho realizaram-se análises citogenéticas em exemplares de *Characidium cf. zebra* coletados na nascente do Rio Machado (município de São João da Mata, MG), no Córrego do Coqueiro (município de Alfenas, MG) e no Córrego do Mombuca (município de Lambari, MG); e *Characidium gomesi*, coletados na nascente do Rio Machado (município de São João da Mata, MG), todos pertencentes à bacia do Rio Grande, Minas Gerais.

Os exemplares foram coletados com puçás de malha fina, transportados até à UNIFENAS e mantidos em aquários aerados no laboratório de Pesquisas em Genética I. Após serem processados, foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70%, sendo então encaminhados ao professor Dr. Francisco Langeani (UNESP - São José do Rio Preto) para classificação, sendo depois depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Pesquisas em Genética I da UNIFENAS, localizada na cidade de Alfenas, Estado de Minas Gerais.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de células mitóticas

Para obtenção de um maior número de mitoses nas preparações, foi utilizada a técnica de injeção prévia nos animais de uma solução de fermento biológico, descrita por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, e utilizada também por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos.

O procedimento utilizado foi descrito por Bertollo *et al.* (1978), para peixes, e consiste em:

1. preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento; 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
2. incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos;
3. injetar a solução dorso-lateralmente no peixe, na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do animal;
4. deixar o animal em aquário bem aerado por 48h ou 72h;
5. proceder à técnica para obtenção das preparações cromossômicas.

3.2.2 Preparação dos cromossomos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção dos cromossomos metafásicos foi a descrita por Foresti *et al.* (1993), e consiste em:

1. injetar intraperitonealmente colchicina (0,05%) na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do animal. Deixá-lo nadando livremente por 50 minutos;
2. sacrificar o animal, retirando rins e, quando necessário, brânquias;

3. colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M);
4. dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células, devendo-se dissociar o material com pinças de ponta fina e, depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur;
5. retirar a suspensão da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrífuga e, em seguida, deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 20 minutos;
6. retirar da estufa, colocar 5 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente), agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente;
7. adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura, deixando em repouso por 10 minutos e, então, levar à centrífuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos;
8. retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador, centrifugando por 7 minutos a 1200 ± 100 rpm;
9. repetir o item 8 por duas ou três vezes;
10. pingar o material em lâminas colocadas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C;

Após este último procedimento, as lâminas foram colocadas em caixas porta-lâminas e armazenadas em freezer.

Para coloração com Giemsa, utilizou-se o seguinte procedimento:

1. hidrolisar o material contido na lâmina em HCl 1 N a 60°C por cerca de 3 minutos;
2. corar com uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por 10 minutos.

3.2.3 Técnicas de coloração e bandamento cromossômico

Foram utilizadas as técnicas de coloração pela prata, para localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON_S); a técnica de banda C, para a localização da heterocromatina

constitutiva e a técnica envolvendo a coloração dos cromossomos com o fluorocromo base-específico Cromomicina A₃ (CMA₃).

3.2.3.1 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs)

O procedimento foi executado conforme a técnica descrita originalmente por Howell and Black (1980). Foram utilizadas duas soluções:

Solução A: solução coloidal reveladora: 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada, à qual acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.

Solução B: solução de nitrato de prata: 1 g de AgNO₃ dissolvida em 2 ml de água destilada.

Essas soluções, uma vez preparadas, foram mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das RONs foi o seguinte:

1. hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1 N a 60°C;
2. secar as lâminas e pingar sobre o material uma gota da solução A e duas gotas da solução B, cobrindo em seguida com lamínula;
3. deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C, deixando por alguns minutos (aproximadamente 3) até que a mistura das soluções se torne marrom dourada;
4. lava-se a lâmina em água destilada e deixa-se secar;
5. corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,7) por 30 segundos.

3.2.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para obtenção de bandas C foi usada a técnica descrita originalmente por Sumner (1972), que consiste em:

1. hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente. Lavar em água destilada;
2. passar por uma solução de Ba(OH)₂ por cerca de 15 segundos. Lavar em água destilada;
3. lavar em HCl 1 N a 60°C; lavar em água destilada;
4. incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH = 6,8), a 60°C;
5. corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

3.2.3.3 Coloração com Cromomicina A₃ (GC-específico)

Os procedimentos para a marcação dos cromossomos com CMA₃ foram feitos a partir da técnica descrita por Schweizer (1981) que consistem em:

1. cobrir as lâminas com solução de tampão McIlvaine + MgCl₂, em placa de Petri umedecida com o mesmo tampão por 10 minutos;
2. retirar o tampão com pipeta Pasteur e, sem lavar as lâminas, secar a parte de trás das mesmas;
3. depositar as lâminas em placa de Petri contendo dois bastões de vidro e colocar 150 µl de cromomicina, cobrindo a seguir com lamínulas lavadas com etanol no momento de uso, colocando a placa de Petri contendo as lâminas dentro de uma caixa escura por 15 minutos;
4. retirar as lamínulas em tampão McIlvaine lavando as lâminas vagorosamente nesta solução;
5. incubar as lâminas em solução de methyl-green/Hepes por 15 minutos;
6. lavar as lâminas em solução de Hepes/NaCl;

7. secar as lâminas e pingar uma gota de glicerol com propilgalato; a seguir, deve-se depositar uma lamínula para montagem de uma lâmina permanente;
8. deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 3 dias antes da análise;
9. observar e fotografar em microscopia de fluorescência com filtro de excitação de 450-490nm.

3.2.4 Estudos cariotípicos

Após a análise e contagem dos cromossomos em cerca de 30 metáfases, de cada exemplar, procurou-se estabelecer o número modal para os indivíduos de cada espécie.

Para se estabelecer o número modal de RONS, foram utilizadas somente metáfases completas (com número de cromossomos igual à moda para o indivíduo) e apresentando pelo menos 1 cromossomo marcado.

As melhores metáfases, ou se seja, as que apresentaram maior dispersão e cromossomos com morfologia mais nítida, foram fotografadas em um fotomicroscópio Olympus BX - 50, com objetiva de imersão. O filme utilizado foi o Imagelink-HQ, Kodak. As cópias dos negativos foram feitas em papel Kodak F₃.

3.2.4.1 Medidas cromossômicas

As medições cromossômicas foram realizadas exclusivamente nas metáfases escolhidas para montagem final dos diferentes cariótipos.

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan, Fregda e Sandberg (1964), e foram classificados

em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntricos (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntrico (RB maior que 7,00).

O método a ser utilizado para as medidas cromossômicas foi o seguinte:

1. copiaram-se todas as metáfases a serem analisadas na mesma escala;
2. foi feita uma fotocópia de cada metáfase, também na mesma escala;
3. numeraram-se os cromossomos na fotocópia;
4. delimitou-se o centrômero e traçou-se uma linha mediana no interior de cada cromátide,
5. mediu-se o comprimento de cada linha mediana com um paquímetro e calculou-se o tamanho do braço maior, do braço menor, o comprimento total e a relação de braços de cada cromossomo;
6. foi calculado o número de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos de cada metáfase;
7. repetiram-se os itens de 3 a 6, até que o valor de cada tipo cromossômico (M, SM, ST e A) apresentou um valor modal nítido;
8. foram recortados os cromossomos das fotografias e numerados da mesma forma que nas fotocópias;
9. foram montados preliminarmente os cariótipos de acordo com as categorias cromossômicas encontradas e em ordem decrescente de tamanho;
10. quando padronizados todos os cariótipos, calcularam-se os valores médios do braço maior (BM), braço menor (Bm), comprimento total (CT), comprimento relativo (CR), e relação de braços (RB), de cada par cromossômico.

3.2.4.2 Montagem final dos cariótipos

Feitas às medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos foram

arranjados segundo o tipo (M, SM, ST e A), pareados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho, para o arranjo final do cariótipo.

4. Artigo(s) resultante(s) do desenvolvimento deste Projeto de Pesquisa

**Cytogenetic divergences between two sympatric species of
Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae)
from Machado River, MG, Brazil**

Alexandre Rodrigues da Silva and Edson Luis Maistro^{*}.

*- UNIFENAS, Instituto de Farmácia e Nutrição, Lab. de Genética, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil. FAX – 55 35 32993125. E-mail: edson.maistro@unifenas.br

Abstract

Cytogenetic studies were performed on two sympatric species of *Characidium*, *C. gomesi* and *C. cf. zebra*, from the Grande river basin, Minas Gerais State, Brazil. Although both species had a chromosome number equal to 50 chromosomes with a karyotype exclusively consisting of meta- and submetacentric chromosomes, an interspecific diversity was detected concerning the size of the two first chromosome pairs of the karyotypes. Active NORs were located at terminal position on the long arm of the 17th pair in *C. gomesi* and at subterminal position on the long arm of the 23th pair in *C. cf. zebra*. The fluorochrome CMA₃ stained only the NOR-bearing pair of chromosomes of both species. The pattern of heterochromatin also showed some differentiation among these species being restricted to centromeric or pericentromeric region in *C. cf. zebra* and practically absent in *C. gomesi*. These data are discussed concerning chromosome diversification in this fish group.

Key words: *Characidium gomesi*, *Characidium cf. zebra*, Crenuchidae, NOR-banding, C-banding.

Introduction

The genus *Characidium* belongs to the Crenuchidae family and comprises small sized fishes which rarely exceed a standard length of 100 mm (Buckup, 1993a). Although this family includes about 80 nominal species (Buckup, 1993a), little is known about the chromosomes of this fish group.

The most cytogenetically studied genus of the Crenuchidae is *Characidium*. Cytogenetic data are available with regard to four populations of *C. cf. zebra* (Miyazawa and Galetti-Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998a), one of them published as *C. cf. fasciatum* and reidentified as *Characidium* sp. aff. *C. zebra*, one population of *C. lagsantensis* (Miyazawa and Galetti-Jr., 1994), one population of *C. pterostictum* (Miyazawa and Galetti-Jr., 1994), two populations of *C. gomesi*, one of them published as *C. cf. fasciatum* and reidentified as *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001; Maistro *et al.*, 2004), one population of *C. lauroi* (Centofante *et al.*, 2003) and one population of *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* (Centofante *et al.*, 2003). All this *Characidium* species/populations presented a relatively stable karyotypic macrostructure, showing a diploid number of $2n=50$ and biarmed chromosomes, usually meta-submetacentrics. Exception to this diploid chromosome number was observed in the *Characidium* cf. *zebra* from Passa-Cinco river, when one sample presented one B-chromosome in some cells (Venere *et al.*, 1999); *C. gomesi* from Quinta and Pardo river, due the presence of 0 to 4 supernumerary chromosomes (Maistro *et al.*, 1998a; 2004) and in *C. gomesi* from the Paiol Grande stream, when a triploid sample was described (Centofante *et al.*, 2001). Although *Characidium* have demonstrated a constant diploid number of chromosomes, the karyotype structure is variable regarding chromosome shape, sex chromosome systems and number and position of Ag-NORs and heterochromatin (Miyazawa and Galetti-Jr., 1994, Maistro *et al.*, 1998a; Centofante *et al.*, 2001; 2003; Maistro *et al.*, 2004).

Since *Characidium* is the most diverse genus along the Crenuchidae family, including 59 nominal taxa usually occurring in small headwater streams (Buckup, 1993b) and there are not any cytogenetic data about *Characidium* from Minas Gerais region, the main objective of the present study was to describe the karyotype structure of two sympatric species of *Characidium* from the south of Minas Gerais State, Brazil. The data obtained are discussed concerning some aspects related to the chromosomal evolution of this genus.

Material and Methods

A cytogenetic survey was performed on twenty specimens (14 females and 6 males) of *Characidium gomesi* and thirteen specimens (10 females and 3 males) of *C. cf. zebra* sympatrically collected in the Machado River, São João da Mata town, State of Minas Gerais, Brazil (S 22°04.471' - W 46°02.810'). Voucher specimens are deposited at the fish collection of the Museu Nacional (MNRJ), Rio de Janeiro, under catalog numbers MNRJ 28408 (*Characidium cf. zebra*) and MNRJ 28411 (*Characidium gomesi*).

Mitotic cells were obtained from gill and kidney tissues by the technique described by Foresti *et al.* (1993). Chromosome morphology was determined on the basis of arm ratios as proposed by Levan *et al.* (1964) and the chromosomes were classified as metacentrics (M) and submetacentrics (SM) and were paired by decreasing size order. C-banding was performed by the method of Sumner (1972), and silver-staining of the nucleolus organizer regions was performed by the technique of Howell and Black (1980). Chromomycin A₃ staining was performed by the method of Schweizer (1980).

Results

Both species of *Characidium* analyzed presented the same basic karyotypic constitution after Giemsa staining, with the diploid number of the 50 chromosomes (32M + 18SM), with the fundamental number (number of chromosomal arms) equal to 100 (Figures 1a and 1b). However, *C. cf. zebra* presented the first metacentric chromosome pair considerably larger than the second pair, while *C. gomesi* showed the first and the second metacentric chromosome pair with similar size. A secondary constriction was evidenced on the subterminal position on the long arm of the 23th chromosome pair in *C. cf. zebra* (Figure 1b). No chromosome differences were observed between males and females of both species.

NOR analysis in both *Characidium* species showed the presence of only one chromosome pair with active NORs. Terminal NORs were observed on the long arm of a pair of major submetacentric chromosomes (pair 17) in *C. gomesi* (Figure 2a) and on the subterminal position on the long arm of the small-sized submetacentric (pair 23), coinciding with the region of secondary constriction in *C. cf. zebra* (Figure 2b). The employment of Chromomycin A₃ fluorochrome showed marking only in NOR regions in both species (Figures 2c and 2d).

With regard to C-band pattern, heterochromatic blocks were detected in the centromeric or pericentromeric regions of all chromosomes and in the subterminal position of the 23th chromosome pair in *C. cf. zebra* (Figure 3a). *C. gomesi* showed small heterochromatin blocks distributed in the centromeres and telomeres of few chromosomes, including the telomeric region of the long arm of 17th chromosome pair (Figure 3b).

Discussion

C. cf. zebra and *C. gomesi* from Machado River presented the same diploid chromosome number of $2n=50$, distributed in 32 metacentrics and 18 submetacentrics in the karyotype. This karyotype macrostructure is the same observed in the majority of the other *Characidium* species or populations analyzed, with exception to *C. pterostictum* from Reserva Jataí, SP (Miyazawa and Galetti-Jr., 1994) and *C. lauroi* from Ribeirão Grande stream, SP (Centofante *et al.*, 2003), that presented one subtelocentric chromosome pair and few differences in the number of meta-submetacentric chromosomes. The two species studied in the present work could be perfectly differentiated by the size of the first metacentric chromosome pair in *C. cf. zebra*, that is larger than the second pair, while the first metacentric pairs of chromosomes in *C. gomesi* showed homogeneous size. Since the great majority of the other *Characidium* studied, except *Characidium* sp. cf. *C. alipioi*, *C. lauroi* (Centofante *et al.*, 2003) and *C. cf. zebra* (present study), presented the 1st metacentric pair considerably larger than the 2nd, this characteristic could be considered basal to *Characidium*, the size homogeneity being derived between the 1st and 2nd chromosome pairs.

Similar karyotypic pattern was observed in the cis-Andean *Trichomycterus* species, a small fish that is also usually found isolated in the headwaters of small rivers like *Characidium*. *T. florensis*, *T. reinhardti* and *T. auroguttatus* form the group in which the first metacentric pair is considerably larger than the second metacentric pair, while *T. sp. aff. T. itatiae* and *T. davisii* form the other group where the first and second metacentric pairs are about the same size, although larger than the other metacentric pairs (Sato *et al.*, 2004).

The position of the ribosome sites could clearly differentiate both populations from Machado River. *C. cf. zebra* showed the NOR sites in the subterminal position on the long arm of the 23rd small-sized submetacentric pair, while *C. gomesi* presented NORs in the telomeric position

on the long arm of the large submetacentric pair 17. Centofante *et al.* (2003) suggested that species of *Characidium* with ZZ/ZW sex chromosome systems are more closely related among themselves than to species without such systems. This idea was specially based on the fact that only species of *Characidium* with sex chromosomes presented Ag-NORs in the terminal region of the long arm of a large submetacentric chromosome pair. The NOR characterization developed in the present study showed that *C. gomesi* from Machado river is the only species that presented NORs in a large SM chromosome and no sex chromosome system.

The cytogenetic data available in the literature from the other *Characidium* show some species with a single chromosome pair bearing NORs and others with the presence of multiple ribosomal sites. Variation in the NOR-bearing chromosome number is a common feature among characid fishes specially when Ag-NORs technique was employed (Almeida-Toledo and Foresti, 1985; Wasko *et al.*, 1996; Jesus and Moreira-Filho, 2003; among others). Maistro *et al.* (1998a) observed multiple NORs in some specimens of the *Characidium* from the Pardo River. However, the analysis of the chromosomes of the 4 individuals with FISH analysis with 18S rDNA showed only one pair bearing ribosomal sites (Maistro *et al.*, 2004). The variable number of ribosomal sites found in the Pardo River population could suggest the occurrence of an inter-individual numerical polymorphism of the NOR sites, as well as observed in the *Prochilodus lineatus* chromosome complement (Maistro *et al.*, 2004; Jesus and Moreira-Filho, 2003).

The majority of the *Characidium* species analyzed showed Ag-NORs located in small or medium-sized SM chromosomes and, with exception of *C. lauroi*, NORs always were located in the long arm. Besides the diploid chromosome number of $2n=50$, NORs located on the long arm of the chromosomes seems to be another common feature to *Characidium*. The fact that *Characidium* species living in sympatry always showed NORs on different chromosome pairs (Centofante *et al.*, 2001; 2003; present paper) confirms that NOR location is an important cytotaxonomic tool for this

group. FISH analysis with rDNA probes could help the better understanding of the pattern distribution of the ribosome sites on *Characidium*.

The Ag-NORs were positively stained by the CMA₃ fluorochrome (Figure 2b), suggesting that the rDNA loci of both *Characidium* studied in the present work may contain spacer sequences or NOR-associated heterochromatin rich in GC base pairs. On the other hand, these data suggest that the other C-band-positive segments found in both species are not rich in GC base pairs. This characteristic has been commonly found in several fish species (Amemiya and Gold, 1986; Maistro *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2003; among others).

The C-banding pattern also could differentiate the two *Characidium* sympatric species analyzed in the present work. In both species heterochromatin preferentially appears in the centromeres or pericentromeric regions, however, *C. cf. zebra* presented more heterochromatin than *C. gomesi*, and the latter also present some few telomeric C-band positive blocks. Centromeric/pericentromeric heterochromatin was observed in the majority of the *Characidium* species and in less quantity in *C. gomesi* from the Paiol Grande stream (Centofante *et al.*, 2001), *C. sp. cf. C. gomesi* from the Pardo River (published as *C. cf. fasciatum* by Maistro *et al.*, 1998a) and *C. gomesi* studied in this work. The available C-banding data shows that *Characidium* taxa more related to *gomesi* present less heterochromatin than other *Characidium* species.

Maistro *et al.* (1998a) described for *Characidium gomesi* from the Pardo river a ZZ/ZW sex-chromosome system, where the Z and W chromosome have the same shape and size, being differentiated from each other by the total heterochromatinization of the W. Centofante *et al.* (2001) found similar sex chromosome system on *C. gomesi* from the Paiol Grande stream, when the W chromosome also showed total heterochromatinization, but have a small size in comparison to the Z chromosome. In the present study, sex chromosome differentiation was not detected on *C. gomesi*, and considering the way of life of these fish group, once they live in stream heads, showing a low

mobility and forming local populations, attributes that could facilitate the speciation process, *C. gomesi* from the Machado river could represent a new *Characidium* specie.

Based on available cytogenetic data about *Characidium* species it is possible to suggest that its general trends of karyotypic diversification is similar to other fish groups that maintain a conserved karyotype macrostructure, but that are quite divergent in terms of NOR location, heterochromatin distribution and occurrence of sex chromosomes (Koehler *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2002; for example). The particularities observed in the chromosome structure of the genus *Characidium* are probably due to the fact that this nominal species is composed of isolated populations found in the headwaters of small tributaries, which probably followed different routes of chromosomal diversification. These characteristics give *Characidium* an excellent basic material for evolutionary studies, as well as *Astyanax scabripinnis* and *Trychomycterus* that have similar ecological characteristics (Moreira-Filho and Bertollo, 1991; Maistro *et al.*, 1998b; Borin and Martins-Santos, 1999). Since only few species of *Characidium* have been studied until now, further studies on other species/populations are necessary for a better understanding of the chromosome diversification process of this fish group.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Francisco Langeani Neto and to Dr. Paulo Buckup for the taxonomic identification of the species. To Dr. Orlando Moreira Filho for critical suggestions to this work. Funds supporting this study were provided by FAPEMIG and UNIFENAS.

References

- Almeida-Toledo LF and Foresti F (1985) As regiões organizadoras de nucléolos em peixes. *Cienc Cult* 37:448-453.
- Amemiya. CT and Gold JR (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1:226-231.
- Borin LA and Martins-Santos IC (1999) Karyotype characterization of three species of the genus *Trychomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguacu river basin. *Genetica* 106:215-221.
- Buckup PA (1993a) The monophyly of Characidiinae, a neotropical group of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysii). *Zool J Linn Soc* 108:225-245.
- Buckup PA (1993b) Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysii). *Cladistics* 9:305-341.
- Centofante L, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2001) Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54:253-260.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA and Moreira-Filho O (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138:213-218.
- Fonseca YM, Oliveira C, Foresti F and Maistro EL (2003) First cytogenetic description of the species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Hepapteridae). *Cytologia* 68:31-34.
- Foresti F, Oliveira C and Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49:810-813.

- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Jesus CM and Moreira-Filho O (2003) Chromosomal location of 5S and 18S rDNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 56:281-287.
- Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti-Jr PM and Schmid M (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chrom Res* 5:12-22.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Maistro EL, Prieto-Mata E, Foresti F and Oliveira C (1998a) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica* 104:1-7.
- Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (1998b) Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genet Mol Biol* 21:201-206.
- Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (2002) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, silver nitrate and CMA₃ staining and restriction endonuclease banding. *Cytologia* 67:25-31.
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O and Foresti F (2004) Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69:181-186.
- Miyazawa CS and Galetti-Jr PM (1994) First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia* 59:73-79.

- Moreira-Filho O and Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Braz J Genet* 14:331-357.
- Pereira MA, Oliveira C, Foresti F and Maistro EL (2002) Cytogenetic and nuclear DNA content analysis in Anostomidae fishes from the Sapucaí river, Minas Gerais state, Brazil. *Cytologia* 67:289-296.
- Sato LR, Oliveira C and Foresti F (2004) Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes: Trichomycteridae). *Genet Mol Biol* 27:45-50.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27:190-193.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl Cell Res* 75:304-306.
- Venere PC, Miyazawa CS and Galetti-Jr PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genet Mol Biol* 22:345-349.
- Wasko AP, Venere PC and Galetti-Jr PM (1996) Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Braz J Genet* 19:225-230.

Figure Legends

Fig. 1. Karyotypes of (a) *Characidium gomesi* and (b) *Characidium cf. zebra* from the Machado River after conventional Giemsa staining.

Fig. 2. Somatic metaphases of *Characidium gomesi* (a and b) and *Characidium cf. zebra* (c and d) from the Machado River, after silver nitrate (a and c) and CMA₃ staining (b and d). The arrows point NOR-bearing chromosomes.

Fig. 3. C-banding Karyotypes of (a) *Characidium gomesi* and (b) *Characidium cf. zebra* from the Machado River.

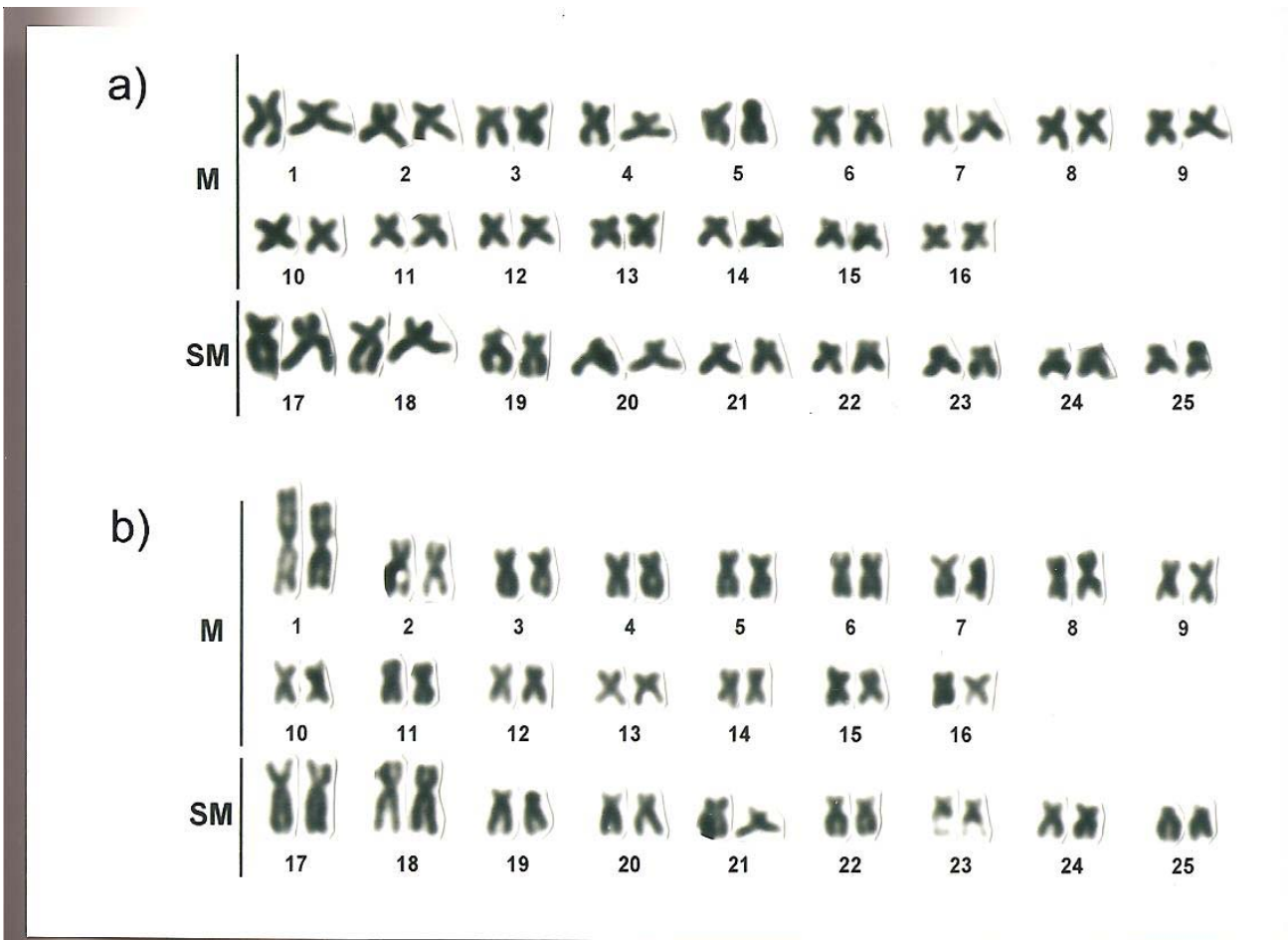


FIGURE 1

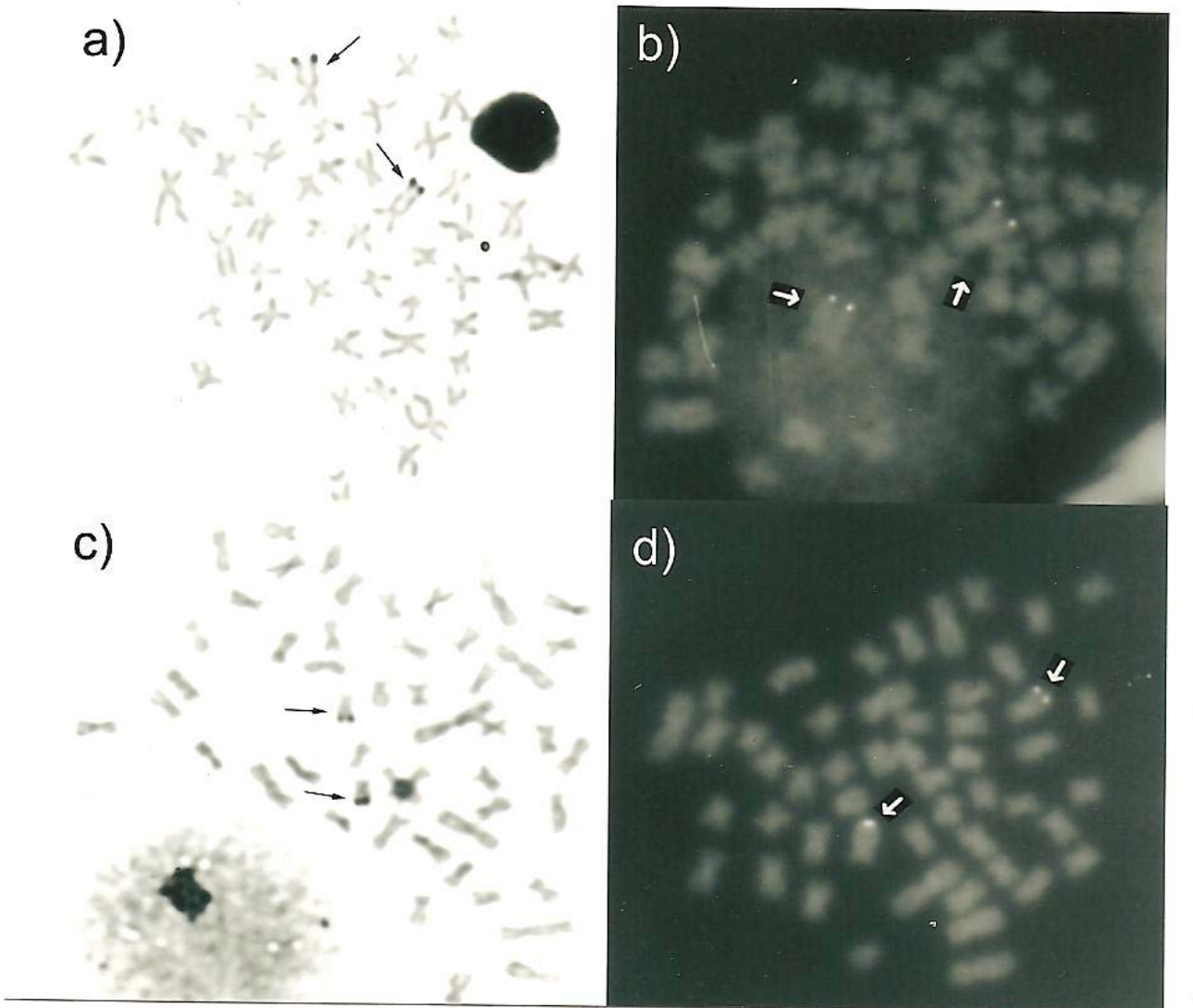


FIGURE 2

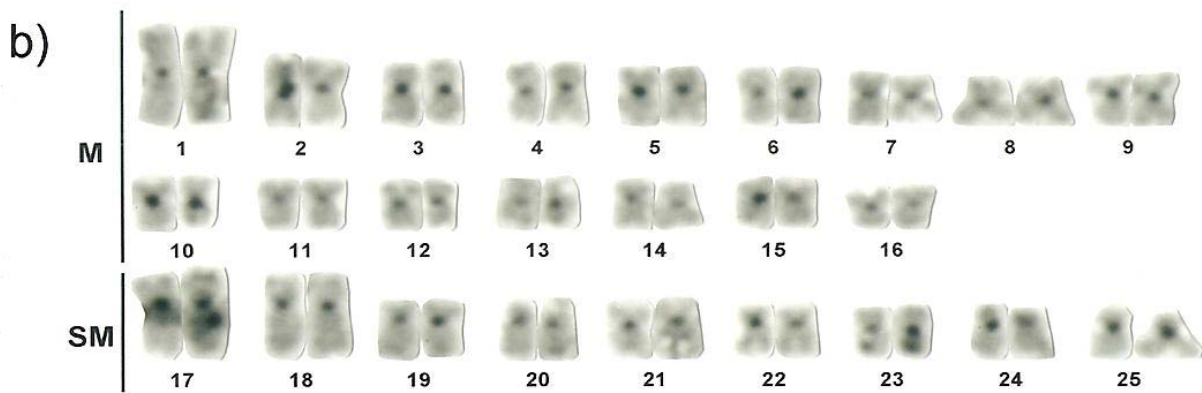
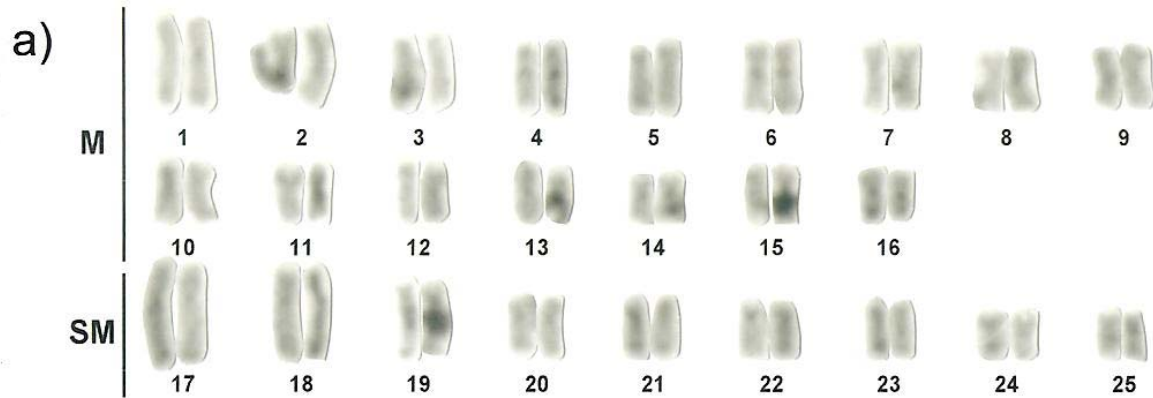


FIGURE 3

Karyotype characterization of two alopatric populations of
***Characidium cf. zebra* (Pisces, Crenuchidae)**
from Grande River basin, MG, Brazil

Alexandre Rodrigues da Silva & Edson Luis Maistro¹.

1- Instituto de Farmácia e Nutrição, UNIFENAS, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil. FAX – 55 35
32993125. E-mail: edson.maistro@unifenas.br

Key words: *Characidium cf zebra*, Crenuchidae, NOR-banding, C-banding, Cromomycin A₃.

Abstract

Two populations of *Characidium cf. zebra* were collected in tributaries from Grande river basin and analyzed from the cytogenetic viewpoint. Both *C. cf. zebra* populations studied had the same karyotypic structure, with diploid number $2n = 50$ metacentric/submetacentric chromosomes and fundamental number 100. C-band patterns showed heterochromatin only in the centromeric region. Results of analysis from the nucleolus organizer region, obtained by silver nitrate staining was observed on one pair of small submetacentric chromosomes at the terminal position of the long arm. Treatment with chromomycin A₃ (CMA₃) showed regions rich in GC base pairs in the NOR-bearing pair of chromosomes on both populations and in one metacentric chromosome with bright signal on the terminal position in the long arm in the Coqueiro stream population. Some aspects related to *C. cf. zebra* chromosome composition are discussed.

Introduction

The species *Characidium cf zebra* belongs to the Crenuchidae family and comprises small sized fishes which rarely exceed a standard length of 100 mm, have no frontal fontanel, the mouth is small, inferior, and the jaws have conic teeth in a single series. They present a dark band following the lateral line, with transversal dark bands occurring in the whole body (Buckup 1993a).

Despite being considered ecologically restricted to small tributaries with good possibilities to assemble in isolated populations, characteristics that give *C. cf zebra* an excellent basic material for evolutionary studies, few populations were cytogenetically investigated. There are chromosomic data only for five populations. All of them presented a diploid number $2n = 50$ and bivalved meta-submetacentric chromosomes (Miyazawa and Galetti-Jr. 1994; Centofante et al. 2001; Silva et al., in press).

To our knowledge, there have not been any previous cytogenetic studies of the species of the genus *Characidium* from the Sapucaí river tributaries. Therefore, the aim of this investigation was to describe the chromosomic constitution of two allopatric populations of *C. cf zebra* discussing some aspects related to its chromosome evolution.

Materials and methods

Sixteen specimens (6 females, 7 males and 3 with indetermined sex) of *Characidium* cf. *zebra* collected from the Coqueiro stream (Alfenas, MG, Brazil – S 21°25.902′ - W45° 52.772′) and fifteen specimens (7 females, 6 males and 2 with indetermined sex) collected from the Mombuca stream (Lambari, MG, Brazil – S 21°58.585′ - W 04°52.394′) were analyzed in the present study. Samples were identified by Dr. Francisco Langeani Filho of the UNESP of São José do Rio Preto, SP, and have been deposited in the fish collection of the Laboratory of Genetics, UNIFENAS, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

Mitotic cells were obtained from gill and kidney tissues by the technique described by Foresti et al. (1993). The arms relation limits suggested by Levan et al. (1964) were employed for classification of chromosome types that were paired by decreasing size order. C-band pattern was characterized according to the technique of Sumner (1972), and silver-staining of the nucleolus organizer regions was performed by the technique of Howell and Black (1980). Chromomycin A₃ staining was performed by the method of Schweizer (1980).

Results and Discussion

A total of 217 metaphasic cells from males and females of *Characidium cf. zebra* from Coqueiro stream and 163 metaphase preparations from both sexes of *C. cf. zebra* from Mombuca stream were analysed. Both presented a diploid number equal to 50 chromosomes (32M + 18SM), with the fundamental number (number of chromosomal arms) equal to 100 (Figs. 1a and 1b). A review of the literature indicates that all other *C. cf. zebra* populations studied presented this same diploid chromosome number and morphology (Miyazawa and Galetti-Jr. 1994, Centofante et al. 2001, Silva et al. in press).

Analysis of C-band also revealed the same pattern for both populations and showed a pattern composed of small marked heterochromatic blocks distributed on the centromeric region of all chromosomes (Figs. 2a and 2b). Miyazawa and Galletti-Jr. (1994) related constitutive heterochromatin in *C. cf. zebra* specimens from the Passa Cinco river distributed only in the centromeric region, whereas in the specimens from the Jataí Reservoir the telomeric region of some chromosomes was also deeply stained in addition to the centromeric regions. According to the authors these heterochromatin pattern may be related to the multiplicity of nucleolar organizer regions detected in the same individuals. Centofante et al. (2001) and Silva et al. (in press), analysing respectively *C. cf. zebra* from Paiol Grande Stream (São Bento of Sapucaí – SP) and Machado river (São João da Mata – MG), related C-band positive signals only in the centromeric position of all chromosomes and in the NOR region, as was observed on both populations analysed in the present work. There were no data about C-band pattern on *C. cf. zebra* from Piracicaba river, SP (Miyazawa and Galletti-Jr., 1994).

Four specimens from Coqueiro stream with 42 cells analysed and eight specimens from Mombuca stream with 45 cells analysed showed that all cells had two small homologous submetacentric chromosomes bearing Ag-NOR sites. The nucleolus organizing regions (NORs) are located on the subterminal region of the long arm (Figs. 3a and 3c). The employment of Chromomycin A₃ fluorochrome showed marking in NOR regions in both species and in a third submetacentric chromosome in one specimen from a Coqueiro stream population (Figures 3b and 3d). These observations reveal the GC-rich DNA content of these chromosomal sites and the additional mark observed probably represents an inter-individual polymorphism involving GC-rich telomeric heterochromatin.

This same NOR location was observed in *C. cf. zebra* from Passa Cinco and Piracicaba rivers (Miyazawa and Galletti-Jr., 1994), Paiol Grande stream (Centofante et al., 2001) and Machado river (Silva et al., in press); however, Miyazawa and Galetti-Jr. (1994) related NORs in the 25th submetacentric pair and other authors in the 23th pair. The population from the Jataí Reservoir, however, had as many as three NOR-bearing pairs, with most cells presenting 2 to 3 NOR-bearing chromosomes (Miyazawa and Galletti-Jr., 1994).

Our cytogenetic data and others available for the five *C. cf. zebra* populations point to a stable karyotypic macrostructure, with a constant diploid number of chromosomes ($2n = 50$) and the same number of bivalents meta-submetacentric chromosomes, despite the populations being located in distant regions and considered ecologically restricted to small tributaries with good possibilities to assemble in isolated populations (Caramaschi 1986, Buckup 1993b). On the other hand, when microstructure is considered, variations in NOR numbers and location, and heterochromatin distribution have been observed, indicating to be the principal process of reorganization of *C. cf. zebra* chromosomes. In the genus *Characidium*, Ag-NOR sites are located in different chromosome pairs considering *C. gomesi*, *C. sp. cf. C. alipioi*, *C. lauroi* and *C. zebra* (Miyazawa and Galetti-Jr.

1994, Maistro et al. 1998, Centofante et al. 2001, 2003, Maistro et al. 2004, Silva et al., in press), and confer a significant cytotoxic value on this trait. This trend of karyotypic diversification has also been recorded in other fish groups (Galetti-Jr. et al. 1991, Feldberg et al. 1992, Pereira et al. 2002, among others).

Most characiform groups present karyotype symmetrization associated to a size-chromosome homogeneity. These features might mean an optimum organization adjusted to the cellular homeostasis during the mitotic process, being selectively regulated against large modifications (Venere and Galetti-Jr. 1989, Galetti-Jr. et al. 1994). This mechanisms could be involved in the maintenance of a stable karyotype macrostructure among *Characidium* fishes. However, this question need to be better investigated since still few *Characidium* species/populations were cytogenetically investigated.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Francisco Langeani Neto for the taxonomic identification of the species. Funds supporting this study were provided by CNPq, FAPEMIG and UNIFENAS.

References

- Buckup, P.A. (1993a). The monophyly of Characidiinae, a neotropical group of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysi). *Zool. J. Linn. Soc* 108: 225-245.
- Buckup, P.A. (1993b). Review of characidiin fishes (Teleostei, Characiformes), with descriptions of four new genera and ten new species. *Ichthyol. Explor. Fresw.* 4: 97-154.
- Caramaschi, E. (1986) Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Doctoral Thesis. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C. and Moreira-Filho, O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54(3): 253-260.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Buckup, P.A. and Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138: 213-218.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R. and Bertollo, L.A.C. (1992) Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psetrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Braz. J. Genet.*, 15:369-383.
- Foresti, F.; Oliveira, C. and Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Galetti-Jr., P.M.; Mestriner, C.A.; Venere, P.C. and Foresti, F. (1991) Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenetic Cell Genet.*, 56: 116-121.

- Galetti-Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C. and Moreira-Filho, O (1994) Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia* 47: 289-297.
- Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Levan, A.; Fredga, K and Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Maistro, E.L.; Prieto-Mata, E.; Foresti, F. and Oliveira, C. (1998) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica* 104: 1-7.
- Maistro, E.L.; Jesus, C.M.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. and Foresti, F. (2004) Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69(2): 181-186.
- Miyazawa, C.S. and Galetti-Jr., P.M. (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia* 59: 73-79.
- Pereira, M.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. and Maistro, E.L. (2002) Cytogenetic and nuclear DNA content analysis in Anostomidae fishes from the Sapucaí river, Minas Gerais state, Brazil. *Cytologia*, 67: 289-296.
- Silva, A.R.; Braga, R.J. and Maistro, E.L. (in press) Cytogenetic divergences between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from Machado River, MG, Brazil.
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 190-193.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75: 304-306.

Venere, P.C. and Galetti-Jr., P.M. (1989) Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Braz. J. Genet.* 12: 17-25.

Figure Legends

Fig. 1. Karyotypes of *Characidium cf. zebra* from the Coqueiro stream after (a) conventional Giemsa staining and (b) C-banding.

Fig. 2. Karyotypes of *Characidium cf. zebra* from the Mombuca stream after (a) conventional Giemsa staining and (b) C-banding.

Fig. 3. Somatic metaphases of *Characidium cf. zebra* from Coqueiro stream (a and b) and from Mombuca stream (c and d), after silver nitrate and CMA₃ staining, respectively.

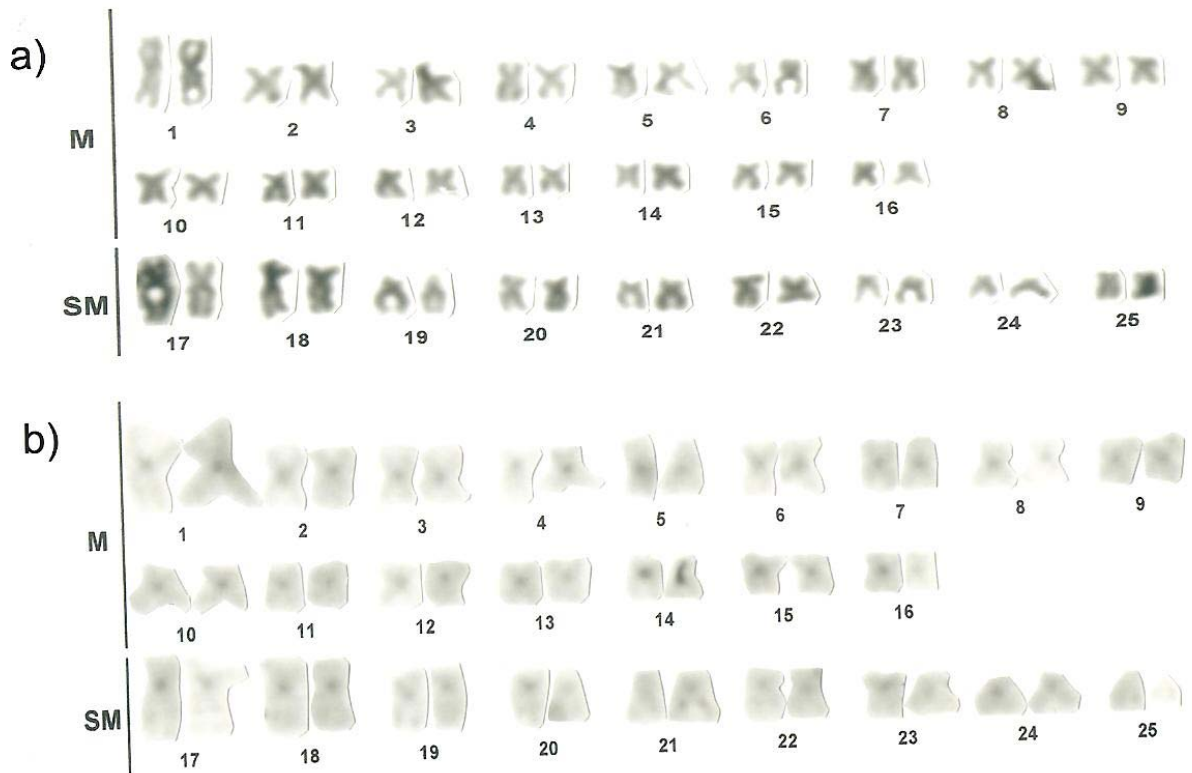


FIGURE 1

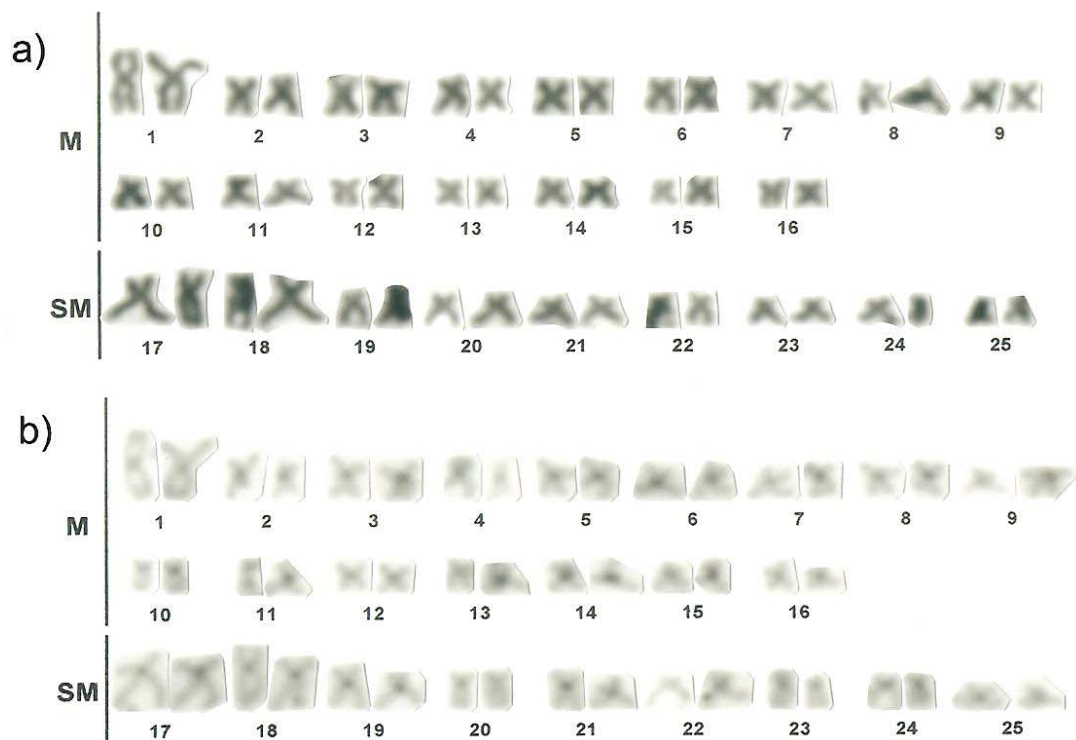


FIGURE 2

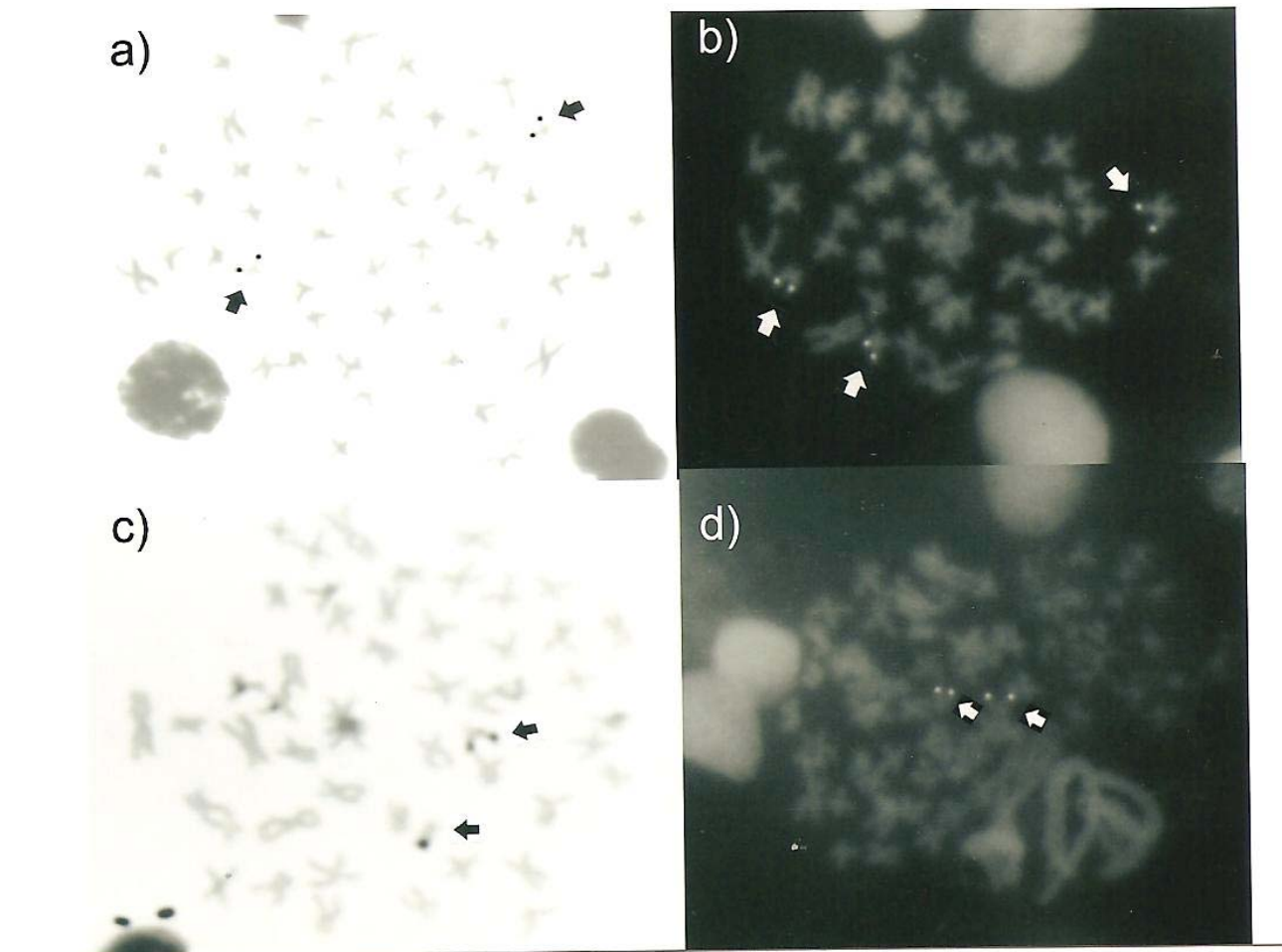


FIGURE 3

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. and ALMEIDA-TOLEDO FILHO, S. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). **Genetica**, v. 64, p. 165-169, 1984.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. *et al.* Análise citogenética comparativa entre o peixe cego *Pimelodella kroneri*, das grutas do Iporanga (SP) e o seu possível ancestral *Pimelodella transitoria*. **Ciênc. Cult.**, v. 37, n. 7:, p. 777, 1985.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Técnicas de bandamento na análise citogenética de peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, V, 1994, São Paulo. São Paulo: UNESP, 1994, p. 74 - 77.

ANDREATA, A.A. *et al.* Chromosome Heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. **Cytologia**, v. 51, p. 309-312, 1992.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J. Genet.**, v. 1, n. 2, 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 *et al.* The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C-and chromosome replication banding. **Chromosome Res.**, v. 5, p. 493-499, 1997.

BERTOLLO, L.A.C. *et al.* A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and

Cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research.**, Netherlands, v. 8, p. 603-613, 2000.

BEUKEBOOM, L.W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome Conference. **Heredity**, v. 73, p. 328-336, 1994.

BIAVATI, S.H. **Caracterização citogenética de populações de *Astyanax altiparanae* e *Astyanax scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE) de riachos do sul de Minas Gerais.** Dissertação (Mestrado)-UNIFENAS, Alfenas – MG, 2001.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 253-260, 2001.

CENTOFANTE, L. *et al.* Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, v. 138, p. 213-218, 2003.

COLE, C.J.; LEAVENS, C.R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol. Rev.**, v. 3, n. 6, p. 102, 1971.

COMPANHIA ENERGÉTICA E MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande.** Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p. il. mapa.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, v. 56, n. 3, p. 303-313, 2003.

FAUAZ, G.; VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Rev. Brasil. Genet.** **17**, v. 2, p. 157-163, 1994.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces: Cichlidae). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 7, n. 4, p. 639-645, 1984.

FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the Genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Brazil. J. Genetics**, v. 15, n. 2, p. 369-383, 1992.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, p. 107-114, 1989.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813, 1993.

GALETTI Junior, P.M. Tendências da evolução cromossômica dos nossos peixes. (Uma síntese). In: SIMPÓSIO DE CITOGÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1994, Botucatu. São Paulo: UNESP, 1994. p.31-32.

GALETTI Junior, P.M.; *et al.* Karyotypic similarity in three genera (*Leporinus*, *leporellus* and *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Rev. Bras. Genet.**, v. 4, p. 11-15, 1981.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal – gene activity: silver stain proteins associated with RNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v. 62, p. 361 – 367, 1977.

HOWELL, W.M.; 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.

HUBBS, C.L. Introdução. In: OMMANNEY, F.D. **Biblioteca da Natureza: Os Peixes**. Rio de Janeiro: Livraria José Olympio, 1981. p.7.

JESUS, C.M. **Contribuições aos Estudos Citogenéticos da Família Parodontidae (Pisces, Characiformes)**. Dissertação para obtenção de Título de Mestrado: São Carlos. 2 p. 1996.

JONES, R.N.B – Chromosomes drive. **Am. Nat.**, v. 137, p. 430-442, 1991.

KAVALCO, K.F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus Astyanax (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56, n.4, p. 453-461, 2003.

KLINKHARDT, M.; TESCHE, M.; GREVEN, H. Database of Fish Chromosomes. **Westarp Wissenschaften**, Magdeburg, 1995, 237 p.

LEE, M.R. and ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 26, p. 36-40, 1980.

LEVAN, A., FREGDA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LOUREIRO, M.A., GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic Characterization of Two Species of the Genus Crenicichla (Pisces, Cichlidae). **Cytologia**, v. 65, p. 57-63, 2000.

MAGALHÃES, A.C. Monographia Brasileira de Peixes Fluviais. In: **PIQUIRA – Characidium fasciatum, Rheinh.** São Paulo: Graphicars, 1931. p. 158 – 159.

MALACRIDA, A.C.C.P.; DIAS, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L. Natural Triploidy in Astyanax aff. Scabripinnis (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. **Cytologia**, v. 68, n. 3, p. 267-270, 2003.

MANTOVANI, M., *et al.* Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution., **Genetica**, Netherlands, v. 109, p. 161-168, 2000.

MAISTRO, E.L. **Caracterização Citogenética e Morfológica de Populações de Astyanax scabripinnis paranae (PISCES, CHARACIDAE) das Bacias dos rios Tietê e Paranapanema.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. 1991.

MAISTRO, E.L., *et al.* Occurrence of macro B chromosome in Astyanax scabripinnis paranae (Pisces, Characiformes, Characidae)., **Genética**, Netherlands, v. 87, p. 101-106, 1992.

MAISTRO, E.L., *et al.* Natural triploidy in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B- chromosomes. **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p. 233-239, 1994.

MAISTRO, E.L., *et al.* Unusual occurrence of a ZZ / ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in Characidium cf. fasciatum (Pisces, Characiformes, Characidiinae)., **Genetica**, Netherlands, v. 104, p. 1 – 7, 1998.

MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of A- and B- chromosomes of Prochilodus lineatus (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. **Genetica**, v. 108, p. 119-125, 2000.

MAISTRO, E.L., *et al.* Cytogenetic Analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW Sex Chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae), Japan Mendel Society. **Cytologia**, v. 69, n. 2, p. 181-186, 2004.

MARIANO, A.R.T. **Descrição citogenética de espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Araguari – Uberlândia (MG)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2001.

MARTINS, C., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). **Cytobios**, v. 85, p. 247-253, 1996.

MATHEY, R. **Les Chromosomes des Vertébrés**. Rouge, Lausanne, 1949.

MIZOGUSHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro – and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae), **Hereditas**, v. 127, p. 249-253, 1997.

MIYAZAWA, C.S.; GALETTI Junior, P.M. First Cytogenetical Studies in *Characidium* Species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). **Cytologia**, v. 59, p. 73-79, 1994.

MOLINA, W.F. Cromossomos sexuais e polimorfismos cromossômicos no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 1995.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Junior., P.M. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 33, p. 83-91, 1980.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish (Pisces, Characidae). **Brazil. J. Genet.**, v. 14, n.4, p. 1085-1090, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Junior, P.M. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, v. 46, n. 2-3, p. 115-125, 1993.

MOREIRA-FILHO, O., *et al.* Occurrence of a Metacentric Macrochromosome B in Different Species of the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, p. 59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Junior, P.M.; BERTOLLO, L.A. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenet Genome Res.**, v. 106, p. 230-234, 2004.

NÉO, D.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE)., **Genetica**, Netherlands, v. 108, p. 211-215, 2000a.

NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141, 2000b.

OLIVEIRA, C., *et al.* Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v. 41, n. 3-4, p. 227-236, 1986.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NÉOTROPICAIS. Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu - SP. p. 6, resumo: A.1. 1994.

OLIVEIRA, C., *et al.* Increased B-chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, v. 79, p. 473-476, 1997.

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J.M. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosome of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Research**, v. 6, p. 205-211, 1998.

PACHECO, R.B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytotypes and Multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v. 5, p. 109-114, 2001.

PAINTNER-MARQUES, T.R., GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 67, n. 4, p. 397-402, 2002.

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881, (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 36, n. 4, p. 307-314, 1983.

PAULS, E. Considerações sobre a evolução cromossômica e sistema de cromossomos supranumerários em espécies do gênero *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). 1985. 156 Tese (Doutorado) - **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 1985.

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 81, p. 117-123, 1990.

PEREIRA, M.A. **Análises citogenéticas e de conteúdo de DNA nuclear em peixes da família ANOSTOMIDAE**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Alfenas. Alfenas – MG. 1999.

PEREIRA, M.A., *et al.* Cytogenetic and Nuclear DNA Content Analysis in Anostomidae Fishes from the Sapucaí River, Minas Gerais State, Brazil. **Cytologia**, v. 67, p. 289-296, 2002.

PORTO-FORESTI, F., *et al.* Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Braz. J. Genet.**, v. 20, n. 3, 377-380, 1997.

SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50-56, 1992.

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

SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic Study of Three Species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River Basin. **Cytologia**, v. 68, n.4, p. 345-350, 2003.

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

SWARÇA, A.C., GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 589-593, 2000.

VENERE, P.C.; GALETTI Junior, P.M. Um caso de triploidia natural no gênero *Curimata* (Pisces, Characiformes) com ocorrência de um cromossomo extra. **Ciênc. Cult.**, v. 37, n.7, p. 806, 1985.

VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 74, p. 70-75, 1996.

VOLOBUJEV, V.T. B-chromosome system of the mammals. **Caryologia**, v. 34, p. 1-23, 1981.

WASKO, A.P.; VENERE, P.C.; GALETTI Junior, P.M. Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 2, p. 225-230, 1996.