



UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ESPÉCIES DE PEIXES Gymnotus
(PISCES, GYMNOTIDAE), COLETADAS NO CÓRREGO FUNDO,
ALFENAS, MINAS GERAIS.**

MARIA CONCEIÇÃO VIEIRA LACERDA

ALFENAS – MG
2005



UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ESPÉCIES DE PEIXES Gymnotus
(PISCES, GYMNOTIDAE), COLETADAS NO CÓRREGO FUNDO,
ALFENAS, MINAS GERAIS.**

MARIA CONCEIÇÃO VIEIRA LACERDA

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Ciência Animal da UNIFENAS, Alfenas, MG, para a obtenção do título de Mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Edson Luis Maistro.

ALFENAS – MG
2005

Lacerda, Maria Conceição Vieira.

Análises citogenéticas em espécies de peixes
Gymnotus (Pisces, Gymnotidae), coletadas no córrego
Fundo, Alfenas, Minas Gerais./ Alfenas: UNIFENAS,
2005. 50p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade José do Rosário Vellano.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro

1. Gymnotus 2. Córrego Fundo 3. Análises
citogenéticas

CDU: 639.3(043)

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ESPÉCIES DE PEIXES Gymnotus
(PISCES, GYMNOTIDAE), COLETADAS NO CÓRREGO FUNDO,
ALFENAS, MINAS GERAIS.**

MARIA CONCEIÇÃO VIEIRA LACERDA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edson Luis Maistro
(Orientador)

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Apresentada em: _15_ de ___Dezembro___ de 2005.

*Dedico este trabalho a Arthur e Iago,
meus netos, com quem partilho sonhos
e fantasias.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela vida e ensinamentos que construíram o meu eu e me conduziram na conquista dos meus propósitos;

Aos meus filhos, pelo estímulo constante, significado e razão no meu viver;

A Ramon huesca Garrido, pelo companheirismo incomparável e apoio à realização deste trabalho;

Ao Professor Doutor Edson Luis Maistro, orientador competente, amigo e paciente, pelas orientações firmes, constantes e valiosas que se constituíram em referencial fundamental à construção deste trabalho;

Aos professores pela competência e dedicação na comunicação dos conhecimentos;

Aos membros da banca examinadora desta Dissertação de Mestrado pela análise minuciosa da mesma e valiosas críticas construtivas apresentadas;

Aos colegas Bruno, Marinez, Guilherme, Ede, Matheus, Henrique e, em especial, a Alexandre pela solidariedade nos momentos de dificuldades;

A Lucimara Maria da Silva, técnica do laboratório de genética, pela boa vontade e auxílio nas técnicas laboratoriais e coletas dos animais;

A todos os meus colegas e amigos, pelo carinho no dia-a-dia;

A todos que de alguma forma confiaram e contribuíram em prol do alcance de mais esta conquista.

“De tudo ficam três coisas. A certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos. Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”.

Fernando Sabino

RESUMO

Estudos citogenéticos foram desenvolvidos em três espécies simpátricas de *Gymnotus* coletados no Córrego Fundo, um pequeno tributário do Rio Sapucaí, Bacia do Rio Grande, localizado no município de Alfenas, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Gymnotus sylvius* apresentou $2n = 40$ cromossomos (36 M/SM + 4 ST/A), *Gymnotus* sp. apresentou $2n = 50$ cromossomos (44 M/SM + 6 ST/A) e *Gymnotus paraguensis* apresentou $2n = 54$ cromossomos (50 M/SM + 4 ST/A). O bandamento C demonstrou a presença de blocos heterocromáticos na posição centromérica de poucos cromossomos em *G. sylvius* e na região centromérica de todos os cromossomos em *G. paraguensis*. Na caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foi observado que as mesmas estavam localizadas no braço curto de um par de cromossomos ST em *G. sylvius* e *Gymnotus* sp., e no braço curto do par cromossômico número um e logo abaixo do centrômero em um terceiro cromossomo em *G. paraguensis*. Os dados citogenéticos obtidos, comparados com os disponíveis na literatura, indicam que os exemplares de *Gymnotus* sp. analisados representam uma nova espécie de *Gymnotus*, visto que sua constituição cariotípica nunca foi relatada na literatura para este gênero. São discutidos alguns aspectos relacionados à diversificação cromossômica destas espécies de *Gymnotus* ocorrendo simpatricamente..

ABSTRACT

Three sympatric species of *Gymnotus* from the Fundo stream, a small tributary of the Sapucaí river, Minas Gerais State, Brazil, were studied in relation to their karyology. *Gymnotus sylvius* presented $2n = 40$ chromosomes (36 m/sm + 4 st/a), *Gymnotus* sp. presented $2n = 50$ (44 m/sm + 6 st/a) and *Gymnotus paraguensis* had $2n = 54$ (50 m/sm + 4 st/a). C-banding demonstrated positively stained heterochromatic blocks in the centromeric position of few chromosomes on *G. sylvius* and in the centromeric region of all chromosomes on *G. paraguensis* samples. The nucleolus organizer region (NOR) was located on the short arm of one st chromosome pair in *G. sylvius* and *Gymnotus* sp., and in the interstitial position on the short arm of the pair number one and below the centromere on a third chromosome on *G. paraguensis*. The cytogenetic data obtained indicate that *Gymnotus* sp. represent a new *Gymnotus* species with a karyotypic constitution never observed on other species from this genus. Some aspects related to the chromosome diversification of these *Gymnotus* are discussed.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Sucintas considerações sobre os peixes	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Citogenética: aspectos gerais	2
2.2	Considerações sobre a citogenética de peixes	3
2.2.1	Número e morfologia dos cromossomos dos peixes	5
2.2.2	Estudos envolvendo a estrutura dos cromossomos dos peixes	10
2.2.3	Cromossomos supranumerários em peixes	14
2.2.4	Mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em peixes	17
2.2.5	A família Gymnotidae	19
3.	OBJETIVOS	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Material	23
4.2	Métodos	23
4.2.1	Obtenção de células mitóticas	23
4.2.2.	Preparação dos cromossomos mitóticos	24
4.2.3.	Técnicas de coloração e bandamento cromossômicos	25
4.2.3.1	Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONS)	25
4.2.3.2.	Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)	26
4.2.4	Estudos cariotípicos	27
4.2.4.1	Medidas cromossômicas	27

4.2.4.2	Montagem final dos cariótipos	28
5.	ARTIGO DECORRENTE DO DESENVOLVIMENTO DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	29
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sucintas considerações sobre os peixes

Os peixes ocupam uma posição importante na filogenia dos vertebrados por serem o grupo mais numeroso e diversificado entre os mesmos, com aproximadamente 25.000 espécies conhecidas, o que representa mais da metade do número total de espécies de vertebrados conhecidas. Na bacia do Rio Grande, que faz parte da bacia do Paraná, ocupando uma área de aproximadamente 143.000 km², sendo 86.500 km² (60,7%) pertencentes a Minas Gerais, consta registro em torno de 170 espécies, onde várias são consideradas raras e endêmicas. Diversos são os ambientes aquáticos onde são encontradas, estando adaptadas em habitat característico, com variações para cada espécie. Algumas espécies vivem em corredeiras, em lagos e outras se locomovem nesses ambientes em decorrência do seu ciclo de vida (GUIA ILUSTRADO DE PEIXES DA BACIA DO RIO GRANDE ,2000).

Devido à variação de habitats, os peixes apresentam ampla diversificação na estrutura, tamanho, aparência, modo de vida e fisiologia (HUBBS, 1981).

Um aspecto relevante quanto aos peixes, além do elevado número de espécies, é a grande importância comercial de algumas espécies que se constituem em fonte protéica na alimentação humana. Outras espécies são consideradas ornamentais em função de suas formas e ao colorido de seu corpo, alcançando altos preços no mercado. Além disso, pode-se citar ainda a pesca como importante atividade profissional e de subsistência, além de propiciar recreação, lazer e turismo para grande parte da população (GUIA ILUSTRADO DE PEIXES DA BACIA DO RIO GRANDE, 2000).

Com relação à diversidade biológica, os peixes apresentam os mais diversos hábitos; existem espécies que são altamente especializadas, como as que se alimentam exclusivamente de zooplâncton; algumas são generalizadas e outras são parasitas. Existem espécies que produzem venenos, sons, eletricidade e luminescência. Algumas espécies são bissexuais, hermafroditas, algumas possuem fecundação interna e a maioria, externa; outras apresentam ritual para o acasalamento e dimorfismo sexual entre machos e fêmeas. A temperatura da água é um fator muito importante para a vida dos peixes: eles são pecilotérmicos, podendo viver em temperaturas entre 2 e 44 graus. O oxigênio, o pH, a transparência da água a velocidade da corrente, tipo de fundo, as substâncias químicas presentes e a disponibilidade de alimentos

influenciam no comportamento e modo de vida das diferentes espécies (GUIA ILUSTRADO DE PEIXES DA BACIA DO RIO GRANDE, 2000).

Segundo Jesus (1996), devido às características do ambiente aquático, os peixes estão sujeitos a diversas possibilidades de ocorrência de isolamento geográfico, podendo sofrer modificações particulares determinadas pela seleção natural, o que propicia a especiação. Estas particularidades dos peixes torna-os excelente material para estudos envolvendo questões de variação morfológica, adaptação e evolução.

Do ponto de vista taxonômico, muitos trabalhos já foram realizados com peixes, porém, vários grupos ainda são pouco conhecidos, em especial nas espécies da região neotropical, que inclui a América do Sul e parte da Central. Um dos motivos desse conhecimento restrito da ictiofauna neotropical de água doce reside na riqueza dessa fauna (MALABARBA *et al.*,1998).

A região que abrange o Estado de Minas Gerais possui um grande manancial aquático de rios e ribeirões pertencentes às bacias do Rio Grande e do São Francisco, com grande variedade de peixes relativamente pouco estudados. Tal constatação justifica a realização deste trabalho, que tem como objetivo geral caracterizar citogeneticamente exemplares de *Gymnotus* provenientes do Córrego Fundo, Alfenas, MG, um afluente do rio Sapucaí, pertencente à bacia do Rio Grande.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citogenética: aspectos gerais

A citogenética, uma ciência híbrida, constituída de citologia e genética, está embasada no fato do material hereditário de um organismo encontrar-se arranjado nos cromossomos. Essa forma de arranjo torna possível a economia em número de unidades segregacionais, aumentando a eficiência da segregação, reduzindo o perigo de ganho ou perda de outras unidades individuais, além de possibilitar uma difusão funcional entre os componentes cromossômicos (SWANSON, MERZ & YOUNG, 1969).

A citologia teve início com a invenção do microscópio no século XVII. Durante o período de 1850 a 1900, ocorreu um grande avanço na identificação dos constituintes celulares nos seus processos biológicos. Foram descobertos e descritos os processos de mitose e meiose, criado o termo cromossomo, por Waldeejer, para identificar as pequenas unidades estruturais que se formavam em determinado período do ciclo celular. Também a teoria da evolução pela seleção natural, apresentada por Darwin e Wallace, processo pelo qual encontramos o princípio da continuidade genética enriquecido pela variação ou seja, pela diversidade herdável (SWANSON, MERZ & YOUNG, 1969; FUTUYMA, 1993).

Segundo Swanson, Merz & Young (1969), as leis que regem os processos de herança, por sua vez, foram descobertas por Mendel em 1885, mas ficaram ignoradas até o início do século XX, quando a teoria cromossômica da herança de Wilson, Sutton e Boveri, realizou a síntese que correlacionava a teoria celular, a de evolução e as leis de Mendel, dando origem à ciência da citogenética.

A comprovação experimental de que os genes estavam nos cromossomos foi dada por Morgan e seus alunos, em trabalhos desenvolvidos no período de 1910 a 1920 (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

A citogenética, portanto, preocupa-se com a organização química e genética dos cromossomos, bem como com a maneira segundo a qual esta organização determina o comportamento dos cromossomos nas células (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

2.2 Considerações sobre a citogenética de peixes

A citogenética de peixes apresenta duas fases distintas, sendo a primeira quando as preparações cromossômicas eram realizadas por secções de tecidos e a segunda quando as preparações passam a ser feitas a partir de células isoladas, através de suspensões celulares (GALETTI-JUNIOR, 1994). Os peixes constituem um dos grupos de animais de maior amplitude de variação cariotípica, com referência de $2n = 16$ até $2n = 250$ cromossomos. Na nossa ictiofauna, a maior concentração de informações cromossômicas encontra-se nos Characiformes e Siluriformes (incluindo Siluroidei e Gymnotoidei).

Os estudos citogenéticos em peixes tiveram início ainda no final do século IX (1890), com os trabalhos de Retzius, que sugeriu a presença de 50 cromossomos na espécie *Myxine glutinosa*, e o trabalho de Kastschenko, que sugeriu a presença de 30 a 50 cromossomos em *Pristiurus melanostomus* (DENTON, 1973). Até o início da década de 60, poucos trabalhos foram feitos em citogenética, pois os cromossomos eram visualizados apenas mediante o emprego de cortes histológicos seriados, o que além de muito trabalhoso resultava em muitos erros de interpretação. Com o descobrimento da técnica de hipotonização das células, por volta de 1960, houve um rápido avanço na determinação do cariótipo de muitas espécies, inclusive de peixes (NOGUSA, 1960).

Nos últimos anos, a citogenética de peixes tem se expandido significativamente, principalmente a partir da aplicação de técnicas de bandamento que, embora utilizadas de rotina nas pesquisas de citogenética humana e de mamíferos, apresentavam dificuldades de adaptação aos cromossomos de peixes. A introdução dessas técnicas, como os bandamentos C, NOR e G, o uso de fluorocromos e a incorporação de análogos de bases do DNA no ciclo celular, têm fornecido importantes resultados para o conhecimento de características dos cromossomos dos peixes e suas inter-relações evolutivas (ALMEIDA TOLEDO, FORESTI & TOLEDO-FILHO, 1988; FELDBERG, PORTO & BERTOLLO, 1992).

Nesse sentido, observa-se uma expansão das análises cromossômicas em populações de peixes, tendo se tornado cada vez mais freqüentes relatos de trabalhos extensivos em áreas geográficas relativamente amplas. Tais estudos superam uma fase de simples identificação do número e da morfologia dos cromossomos e passam para uma abordagem populacional, onde são analisados diferentes tipos de polimorfismos e modos de diversificação cromossômica. A variabilidade cariotípica verificada nesses estudos evidencia a necessidade de se analisarem sistematicamente grupos naturais de peixes, levando-se em conta sua distribuição geográfica e utilizando-se ao máximo as facilidades técnicas já desenvolvidas. A evolução técnica e a qualidade das preparações cromossômicas permitiram um aumento sensível do número de espécies estudadas e a descrição das suas características cromossômicas. (ALMEIDA TOLEDO, FORESTI & TOLEDO-FILHO, 1988; FELDBERG, PORTO & 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 (BERTOLLO, TAKAHASHI & MOREIRA-FILHO, 1978).

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

A técnica para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) identifica a atividade cromossomal durante a intérfase, marcando indiretamente o DNAr. Esta técnica tem ajudado os pesquisadores na identificação e caracterização de espécies, funcionando como excelente ferramenta citotaxonômica (FELDBERG, PORTO & 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 autossômicos, sexuais e o comportamento meiótico de cromossomos B (MAISTRO, OLIVEIRA & FORESTI, 1998).

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

2.2.1 Número e morfologia dos cromossomos dos peixes

De acordo com dados de Klinkhardt, Tesche & Greven (1995), durante as últimas duas décadas de pesquisas em citogenética de peixes, apenas algo em torno de 12% das espécies conhecidas neste grupo foram estudadas e de alguma forma analisadas sob o aspecto cromossômico.

Feldberg, Porto & Bertollo (1992) observaram que as espécies de peixes neotropicais que possuem cariótipos mais estáveis quanto ao número de cromossomo estão nas famílias Curimatidae, Parodontidae, Anostomidae, Cichlidae, Prochilodontidae, Chilodontidae e Hemiodontidae. Alguns exemplos foram apresentados por Galetti-Júnior. *et al.* (1981) na família Anostomidae, onde diversas espécies analisadas apresentaram um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos. Outros exemplos também foram observados na família Prochilodontidae, onde a análise de oito espécies destes peixes, coletadas em diferentes localidades, 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 & BERTOLLO, 1990).

Pereira *et al.* (2002), analisando quatro espécies de Anostomidae provenientes 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* também compreende alguns gêneros de peixes com certa capacidade de manter-se com números cromossômicos constantes. Swarça, Giuliano-Caetano & Dias (2000) relatam diversos gêneros como *Bergiaria*, *Iheringichthys*, *Parapimelodus*, *Pimelodus*, *Hemisorubim*, *Pseudoplatystoma*, *Sorubim* e *Paulicea* possuindo cariótipos com número diplóide de 58 cromossomos; além de *Callophisus sp.* e *Pinirampus sp.*, ambos com $2n = 50$ cromossomos.

Além dos grupos que mantêm-se com o número de cromossomos do cariótipo relativamente constante, existem outros que apresentam uma grande variação no número e morfologia dos cromossomos. Os Characidae são peixes que compreendem um grande número de gêneros que podem apresentar uma extensa variedade ou não de números de cromossomos. Paintner-Marques, Giuliano-Caetano & Dias (2002), pesquisando a diversidade cariotípica de *Bryconamericus aff. exodon* (*Characidae*, *Tetragonopterinae*) encontraram um número diplóide de 52 cromossomos, com a constatação de dois citótipos diferentes: citótipo 1, apresentando dezesseis metacêntricos, doze submetacêntricos, seis subtelocêntricos e dezoito acrocêntricos, com $NF = 86$ cromossomos, e citótipo 2, apresentando dez metacêntricos, vinte e quatro submetacêntricos, seis subtelocêntricos, doze acrocêntricos, com

NF = 92 cromossomos. Os autores sugerem que as variações podem ter se originado através de inversões pericêntricas.

Outro exemplo de 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 (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991). Salvador & Moreira-Filho (1992) analisaram exemplares machos e fêmeas de *Astyanax scabripinnis* do 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 e doze cromossomos acrocêntricos, além de um a dois macrocromossomos supranuméricos em alguns exemplares. Fauaz, Vicente & Moreira-Filho (1994), analisando setenta e quatro *A. scabripinnis* do rio das Pedras, Campos do Jordão, Estado de São Paulo, encontraram um número cromossômico também de $2n = 50$, mas com nítidas diferenças na morfologia dos cromossomos NF = 88, três metacêntricos, onze submetacêntricos, cinco subtelocêntricos e seis acrocêntricos, sem diferença entre os sexos). Em Volta Grande, Minas Gerais, os autores coletaram trinta espécimes de *Astyanax eigenmanniorum* no rio Grande, sendo quinze machos e quinze fêmeas apresentando um número de $2n = 50$ cromossomos e NF = 76 cromossomos, três metacêntricos, dez submetacêntricos, quatro subtelocêntricos e oito acrocêntricos, não existindo também variação cromossômica em relação ao sexo.

Segundo Mizoguchi & Martins-Santos (1997), 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.

A análise de duas populações de *Astyanax scabripinnis* oriundas da bacia hidrográfica do Paranapanema, do córrego Marrecas e do Córrego do Centenário, revelaram, na primeira

população, um número diplóide de $2n = 48$ cromossomos, sendo três pares de metacêntricos, dez pares de submetacêntricos, seis pares de subtelocêntricos, cinco pares de acrocêntricos, $NF = 86$, e na segunda, $2n = 50$ cromossomos, sendo três pares de metacêntricos, dez pares de submetacêntricos, quatro pares de subtelocêntricos e oito pares de acrocêntricos com $NF = 84$ (MANTOVANI *et al.*, 2000).

Kavalco, Pazza & Moreira-Filho (2003), estudando quatro espécies de *Astyanax*, também constataram uma grande variação envolvendo o número e morfologia dos cromossomos, sendo atribuída ao ambiente, a observação das variações genéticas. As análises revelaram um número diplóide para *A. parahybae* de $2n = 48$ cromossomos, sendo oito metacêntricos, dezoito submetacêntricos, doze subtelocêntricos e dez acrocêntricos, com $NF = 86$; *A. intermedius* com $2n = 50$ cromossomos, sendo seis metacêntricos, oito submetacêntricos, quatro subtelocêntricos e trinta e dois acrocêntricos, $NF = 68$; *A. gitton* com $2n = 50$ cromossomos, com seis metacêntricos, oito submetacêntricos, oito subtelocêntricos e vinte e oito acrocêntricos, $NF = 72$; e *A. scabripinnis* com $2n = 50$ cromossomos, sendo o cariótipo composto de oito metacêntricos, vinte submetacêntricos, oito subtelocêntricos e quatorze acrocêntricos, com $(NF) = 86$.

Os resultados acima relatados para o gênero *Astyanax*, principalmente *Astyanax scabripinnis* permitiram a proposição de que esse grupo de peixes parece ter evoluído separadamente, devido a habitarem vários sistemas hídricos com características particulares e sem fluxo gênico entre as diferentes populações, o que permitiu a observação de uma grande variedade de citótipos, com números diplóides variando de $2n = 46$, 48 e 50 (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI-JUNIOR, 2004).

Outro grupo de peixes em que se observa uma grande variação cariotípica entre seus gêneros é a família Erythrinidae. Bertollo *et al.* (1997), estudando *Hoplias malabaricus*, relataram uma variação no número de cromossomos entre fêmeas ($2n = 40$) e machos ($2n = 39$), isso devido a uma característica restrita a poucos peixes, que é a presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos. Diversos outros estudos demonstraram que *Hoplias malabaricus* pode ser considerada um complexo de espécies, pois apresenta populações com um variado número de cromossomos em seus cariótipos, mostrando uma grande distribuição geográfica e, embora alguns citótipos pareçam ser endêmicos de determinadas regiões, pôde-se observar em alguns casos simpatria entre dois citótipos diferentes, sem que apareçam formas híbridas entre as duas populações, caracterizando falta de fluxo gênico e mostrando

que as diferenças cromossomiais estão bem estabelecidas e distintas (BERTOLLO *et al.*, 2000).

Bertollo *et al.* (2000), após uma extensa revisão de diversos estudos citogenéticos em *Hoplias malabaricus*, que permitiram as conclusões gerais sucintamente apresentadas no parágrafo anterior, relataram a ocorrência de sete citótipos diferentes, mostrando combinações únicas entre número e 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 diferenças 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 citótipos 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 mostram $2n = 40$ cromossomos, semelhantes ao citótipo C, mas os machos apresentam $2n = 39$ 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, encabeçando 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; os machos apresentaram $2n = 41$ cromossomos, formando um sistema sexual múltiplo que acrescenta um cromossomo 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 a alguns locais amazônicos.

Ocorre também no grupo dos peixes uma outra forma de variação no número de cromossomos: a triploidia natural. Relatos deste tipo têm ocorrido 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 & GIULIANO-CAETANO, 2003).

Fauaz, Vicente & 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 coriotípico 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.

Foram observados também 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. Relatando a captura de um animal $3n + 1$, em Botucatu, que além de apresentar triploidia, possuía um macro-cromossomo B, e outro exemplar, coletado em Campos do Jordão, que possuía um valor cromossômico de $3n + 2$, ou seja, triplóide e com dois macro-cromossomos B (MAISTRO *et al.*, 1994). 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/elevação rápida da temperatura.

2.2.2 Estudos envolvendo a estrutura dos cromossomos dos peixes

Uma importante ferramenta citotaxômica 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 de 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). Nos parágrafos seguintes são apresentados alguns exemplos da aplicação desta metodologia no estudo dos cromossomos dos peixes.

Diniz & Bertollo (2003) observaram em populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus* variação no número de RONS, sendo observadas duas, quatro e seis marcações localizadas em regiões intersticiais (pares de cromossomos meta e submetacêtricos) e regiões teloméricas em braços curtos de cromossomos subteloalocêntricos, mais um par de cromossomos acrocêntricos, além de um quarto cromossomo ocasional meta e submetacêntrico que procede de uma RON intersticial.

Souza, Giuliano-Caetano & Dias (2003), estudando três espécies de *Pimelodus*, *P. argenteus*, *P. misteriosus* e *P. maculatus*, observaram que todas possuíam duas marcações evidenciadas pela prata, em um par de cromossomos subteloalocêntricos, sempre em posição terminal, nos braços curtos dos cromossomos de *P. argenteus* e *P. misteriosus* e nos braços longos dos cromossomos de *P. maculatus*. Esta última espécie, portanto, pôde ser diferenciada das outras pela posição das RONS.

Kavalco, Pazza & 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, observaram 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. *Astyanax giton* apresentaram também acima das seis marcas, com valor modal igual a duas marcações em pares de cromossomos acrocêntricos.

Dentre os diversos exemplos onde a aplicação das Ag-RONs tem se mostrado uma importante ferramenta citotaxonômica, pode-se destacar, como um último exemplo, o grupo dos *Characidium*. *Characidium* cf. *zebra* apresenta de forma constante um par de cromossomos submetacêntricos pequenos com RON em posição terminal no braço longo, com alguns exemplares podendo apresentar RONs ativas também em outros cromossomos (MIYAZAWA & Galetti-Júnior, 1994). Já outras espécies de *Characidium*, apesar de apresentarem número e morfologia dos cromossomos muito conservativos, puderam ser bem diferenciados pela posição dos cístrons ribossômicos. É o caso de *Characidium gomesi* em relação a *Characidium* cf. *zebra* (MAISTRO *et al.*, 1998b; CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001) e de *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* em relação a *Characidium lauroi* (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Outra importante ferramenta para estudar a variação na estrutura dos cromossomos é a realização da banda-C. O estudo do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva tem permitido também, como ferramenta auxiliar em alguns casos, e principal em outros, a evidenciação de tipos de especiação ocorridos nas famílias de peixes neotropicais (OLIVEIRA & WRIGHT, 1998). A heterocromatina foi identificada por apresentar-se compactada durante a intérfase, sendo transcricionalmente inativa. Possivelmente o papel estrutural da heterocromatina seria o 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 (MOLINA, 1995). Seguem a seguir, alguns parágrafos exemplificando a aplicação da metodologia envolvendo a banda C.

Wasko, Venere & Galetti-Júnior. (1996) observaram em duas espécies de *Bryconamericus*, vivendo simpatricamente no rio Piracicaba, município de Piracicaba, no Estado de São Paulo, 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.

Analisando o conteúdo do DNA de alguns Anostomidae e seus cariótipos, Pereira *et al.* (2002), estudando *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, observaram bandas C com um padrão distinto entre *L. friderici* (par de número 13) e *L. octofasciatus*. O mesmo foi observado entre outras duas espécies deste mesmo rio, onde 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 do submetacêntricos, e em *Schizodon nasatus* as bandas C foram evidenciadas somente nas regiões do centrômero.

Em estudos de três espécies de *Pimelodus* provenientes da bacia do rio Paraguai, Souza, Giuliano-Caetano & Dias (2003) analisaram dezessete espécimes de *Pimelodus argenteus*, trinta e nove de *P. misteriosus* e sete de *P. maculatus*, todos vindos de Corumbá, no Estado de 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 mostrou-se uma importante ferramenta citotaxonômica.

Outra ferramenta auxiliar no estudo da estrutura cromossômica é a coloração dos cromossomos pela Cromomicina A₃ (CMA₃), utilizada para que se identifiquem regiões do DNA ricas em bases GC. As marcações fornecidas por esta técnica apresentam-se em cor verde cintilante, sendo normalmente análogas às evidenciadas pela impregnação pelo nitrato de prata.

Utilizando a cromomicina, Maistro, Oliveira & Foresti (2000) analisaram os cromossomos de *Prochilodus lineatus* coletados no rio Mogi-Guaçu, município de Pirassununga, SP. A associação da cromomicina A₃ com o bandamento C, com a Ag-RON e com enzimas de restrição, permitiu a detecção de diferenças na estrutura da heterocromatina presente nos cromossomos A e nos cromossomos supranumerários desta espécie.

A associação da CMA₃ com outras técnicas citogenéticas também permitiu a detecção de variações na estrutura cromossômica entre 4 espécies de Anostomidae coletadas no rio Sapucaí, município de Alfenas, MG. *Leporinus friderici*, *Leporinus striatus*, *L. octofasciatus*

e *Schizodon nasutus* mostraram todos $2n = 54$ cromossomos meta-submetacêntricos, mas puderam ser diferenciados cariotipicamente pelos padrões de bandas C, RON e cromomicina (PEREIRA *et al.*, 2002).

Pesquisas realizadas por Souza, Giuliano-Caetano & Dias (2003) em três espécies de Pimelodidae revelaram 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. argentus* e *P. misteriosus* o fluorocromo cromomicina A_3 marcou somente as regiões heterocromáticas dos cromossomos.

2.2.3 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). Podem variar de forma, número, tamanho e também podem se apresentar em sexos separados ou em ambos os sexos (MARTINS, GIULIANO-CAETANO & DIAS, 1996; NEO, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2000). Estes cromossomos têm se mostrado comuns em peixes, podendo ser encontrados em células de um mesmo indivíduo, em uma população ou ainda em populações diferentes (BEUKEBOON, 1994; MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI-JÚNIOR, 2004).

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).

Os cromossomos B podem ser definidos como 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, seguindo 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 *Prochiladus scrofa* (PAULS & BERTOLLO, 1983), onde os autores descobriram 0 a 5 cromossomos supranumerários.

Até o ano de 1991, cerca de 18 espécies de peixes pertencentes a sete diferentes famílias de peixes ósseos tinham relatos de ocorrência de cromossomos B em seu complemento cromossômico (SALVADOR & MOREIRA-FILHO, 1992). Hoje em dia estes cromossomos foram encontrados em espécies das famílias Prochilodontidae, Curimatidae, Paradontidae, Characidae, Pimelodidae, Callichthyidae, Loricariidae, Cichlidae e Coregonidae, e entre todas as famílias citadas acima, a família Characidae é a que mais freqüentemente tem apresentado peixes portando cromossomos B, especialmente a subfamília Tetragonopterinae (MIZOGUSHI & MARTINS-SANTOS, 1997; MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI-JÚNIOR, 2004). Esses cromossomos extras podem se apresentar de três tamanhos distintos, variando desde macrocromossomos, pequenos cromossomos e microcromossomos. Os parágrafos seguintes trazem alguns destes trabalhos.

Maistro *et al.* (1994) encontraram 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 em fêmeas da população do córrego Cascatinha, município de Botucatu, Estado de São Paulo.

Salvador & Moreira-Filho (1992), analisando exemplares de *Astyanax scabripinnis* de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, encontraram duas formas de macrocromossomos B, quanto ao bandamento C. Estes cromossomos supranumerários apresentaram-se totalmente heterocromáticos ou com regiões medianas ou cromáticas nos lados do centômeros e possuíam grandes blocos heterocromáticos em suas extremidades (posição distal). A população estudada pelos pesquisadores teve trinta e dois espécimens analisados, sendo encontrados cromossomos B em vinte e oito (87,5% da amostra analisada).

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

A. scabripinnis coletados no rio das Pedras, município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, também apresentaram um macrocromossomo supranumerário em seu complemento cromossômico, onde de setenta e quatro espécimens analisados, cinquenta e seis apresentavam em todas as metáfases o cromossomo B (FAUAZ, VICENTE & MOREIRA-FILHO, 1994). Os autores descreveram ainda um exemplar apresentando triploidia natural e a presença de dois cromossomos B.

De forma similar e também em exemplares de *A. scabripinnis*, Maistro *et al.* (1994), analisando as populações do rio Araquá, um afluente do Tietê, e do córrego das Pedras, Campos do Jordão, encontraram, em ambas, exemplares portando macrocromossomos B, e também relataram a ocorrência de indivíduo com triploidia natural portando supranumerários.

Uma importante revisão apresentando a ocorrência de cromossomos supranumerários em *Astyanax* foi apresentada por Moreira-Filho, Bertollo & Galetti-Júnior. (2004). Neste trabalho são apresentadas todas as populações e espécies deste gênero que até aquela data foi constatada a presença de cromossomos supranumerários, com discussão de aspectos relacionados a sua origem e distribuição, tamanho e morfologia, particularmente em *A. scabripinnis*. O trabalho pode ser considerado um Tratado sobre cromossomos B em *Astyanax*.

Além dos grandes cromossomos B que mais comumente têm sido descritos em *Astyanax*, existem espécies de peixes que apresentam pequenos e microcromossomos B. Como exemplos de espécies com a presença de microcromossomos supranumerários pode-se citar *Prochilodus scrofa* (*Prochilodus lineatus*). Pauls & Bertollo (1983), analisando cinquenta e nove exemplares, encontraram cinquenta e oito portando até 5 microcromossomos supranumerários. A ocorrência desse tipo de cromossomo também foi relatada em outra população desta espécie (MAISTRO, OLIVEIRA & FORESTI, 2000). Feldberg & Bertollo (1984) relataram a presença de microcromossomos supranumerários em *Gymnogeophagus balzanii*. Almeida-Toledo, Trajano & Foresti (1985) também relataram a presença de microcromossomo B em *Pimelodella Kronei*, e Pauls (1985) observou similar ocorrência em *Prochilodus cearensis*.

Foresti, Almeida-Toledo & Toledo (1989), analisando 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 nos espécimens analisados, inclusive com a constatação menos comum de cromossomos B eucromáticos.

Cyphocharax modesta ($2n = 54$) é uma espécie de Curimatidae, onde a população do ribeirão Três Bocas, município de Londrina, Estado do Paraná, apresentou alguns indivíduos que possuíam em sua constituição cariotípica um pequeno cromossomo B do tipo metacêntrico, sendo este totalmente heterocromático (MARTINS, GIULIANO-CAETANO & DIAS, 1996). Segundo os autores, este cromossomo supranumerário parece ser uma característica geral da espécie, não apresentando uma ocorrência normal em determinadas populações. Os autores propuseram duas hipóteses para a ocorrência destes supranumerários: a primeira sugere que estes cromossomos tivessem aparecido em antepassados da família Curimatidae, tendo sido eliminados na maioria das espécies atuais; a segunda hipótese sugere uma origem recente e independente, com a constatação de um número maior de espécies que os portam. Tal cromossomo provavelmente surgiu de uma não-disjunção de um cromossomo do complemento A com perda de cromatina, resultando em um pequeno cromossomo B.

2.2.4 Mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em peixes

Geralmente a maioria das espécies de peixes não apresentam cromossomos sexuais citologicamente diferenciados. No entanto, podem-se encontrar espécies com cromossomos diferenciados representando sistemas de heterocromossomos ou cromossomos sexuais. Moreira-Filho, Bertollo & Galetti-Júnior. (1993) relacionaram dez famílias de peixes neotropicais que até aquela data apresentavam espécies com descrição de cromossomos sexuais heteromórficos. São caracterizados e identificados por dois padrões, conforme a presença de regiões heterocromática, sendo representados pelas letras ZZ (machos, homogaméticos) e ZW (fêmeas heterogaméticas), e pelas letras XX (fêmeas homogaméticas) e XY (machos heterogaméticos).

Dentre os relatos de heteromorfismo cromossômico sexual, o sistema ZZ/ZW tem sido o mais encontrado, sendo que, somados aos demais casos de heterogametia feminina perfazem

aproximadamente 50% dos casos relatados em peixes neotropicais. O sistema ZZ/ZW tem sido descrito para diversas espécies de *Leporinus* e *Triphortheus*, em *Microlepidogaster leucofrenatus* e em *Parodon hilarii*. Já o sistema XX/XY, onde o macho é o sexo heterogamético, foi descrito para espécies de *Hoplias*, *Hypostomus*, *Pseudotocinclus*, *Pimelodella* e *Eingenmannia* e o sistema de cromossomos sexuais múltiplos envolvendo heterogametia masculina foi descrito em *Hoplias*, *Eigenmannia* sp. e duas espécies até o ano de 1993 ainda não identificadas, pertencendo as famílias Cyprinodontidae e Goodeidae (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI-JÚNIOR, 1993). Nos parágrafos que se seguem, serão citados alguns exemplos deste tipo de heteromorfismo cromossômico.

Na família Parodontidae, a análise de exemplares de *Parodon hilari* (14 fêmeas e 12 machos), coletados em pequenos tributários do rio São Francisco, no distrito de Três Marias, Estado de Minas Gerais, revelaram que todos os exemplares possuíam $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com $(NF) = 108$, contudo, as fêmeas possuíam um grande cromossomo W submetacêntrico, 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 (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI-JÚNIOR, 1993).

Maistro *et al.* (1998), estudando exemplares de *Characidium* cf. *fasciatum* (reidentificado como *Characidium* sp. cf. *C. gomesi* (CENTOFANTE *et al.*, 2003) provenientes de duas populações: uma do rio Pardo, município de Botucatu, e outra 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 a 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, que tinham o mesmo tamanho, mostrou-se totalmente heterocromático somente nas fêmeas, indicando a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. Tal sistema não é comum nos peixes, visto que nas espécies que apresentam o sistema ZZ/ZW, o cromossomo W normalmente tem um segmento eucromático junto com grande segmento heterocromático. Também foi descrita ocorrência similar em exemplares de *Characidium gomesi* coletados no córrego Paiol Grande, São Bento do Sapucaí, SP, mas naquela população o cromossomo W, além de ser totalmente

heterocromático, tinha um tamanho menor em relação ao Z (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001).

Entre os peixes portadores de sistema sexual do tipo XX/XY, Almeida-Toledo, Foresti & Toledo-Filho (1988) analisando exemplares da espécie *Eigenmannia virescens*, coletados em um pequeno tributário do rio Tietê, localizado na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, observaram a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, onde não havia diferenças no número de cromossomos entre machos e fêmeas, mas uma diferença na estrutura detectada pelo bandamento C onde o macho tinha o par de cromossomos heteromórficos.

Existem também relatos em algumas espécies de peixes de três ou mais cromossomos participando da determinação do sexo, constituindo os sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. Tais mecanismos já foram descritos em espécies como *Hoplias* sp. (BERTOLLO, TAKAHASHI & MOREIRA-FILHO, 1983) e *Eigenmannia* sp. (ALMEIDA-TOLEDO, FORESTI & TOLEDO-FILHO, 1984), ambas com o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, além de outras. O sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW_1W_2 foi descrito para diferentes populações de *Apareiodon affinis* (JESUS, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 1999; LEITE & MAISTRO, 2004).

2.2.5 A família Gymnotidae

A família Gymnotidae é formada por um grupo monofilético de peixes eletrogênicos de água doce, exclusivamente Neotropical e apresenta um único gênero, *Gymnotus*. *Gymnotus* é o Gymnotiforme com a mais ampla distribuição geográfica, sendo encontrado do Rio Salgado, nos pampas argentinos (36° S), ao Rio San Nicolás, México (18° N). Distribui-se nas águas continentais das Américas do Sul e Central, com exceção do Chile e Belize. Atualmente são reconhecidas 18 espécies, porém, este grupo de peixes apresenta uma grande diversidade críptica (NELSON, 1994; FERNANDES-MATIOLI, MATIOLI & ALMEIDA-TOLEDO, 2000; ALVES-LUIZ *et al.*, 2002).

Em revisão sobre os dados cromossômicos disponíveis para este grupo, encontram-se disponíveis dados citogenéticos para espécies de *Gymnotus* em cerca de 53 localidades brasileiras, distribuídas por 13 bacias hidrográficas. Verifica-se a ocorrência de *G. carapo* (2n=54) em 16 localidades, *G. pantherinus* (2n=52) em 21, *G. inaequilabiatus* (2n=52) em

três populações, *G. sylvius* ($2n=40$) em 11 pontos geográficos diferentes, e de *Gymnotus* sp. ($2n=40$) em duas outras localidades. Ocorrem ainda espécies não identificadas em outras 12 localidades (FERNANDES-MATIOLI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1998; ALVES-LUIZ *et al.*, 2002).

As diferentes populações de *Gymnotus carapo* têm apresentado uma grande diversidade cariotípica quando comparadas entre si. Bordenave, Pastori de Beltrami & Fenocchio (1992), analisando uma população na Argentina, reportou um número diplóide de $2n = 54$ cromossomos e um par de cromossomos portando as regiões organizadoras de nucléolo (RONs). Os demais dados citogenéticos sobre *G. carapo* são de populações coletadas em diferentes regiões do Brasil. No Rio Paraná, Borin & Júlio-Júnior (1994) relataram um número diplóide de $2n = 40$ cromossomos, também com um par portando as RONs, embora em posição diferente da população Argentina. Mais de uma dezena de outras populações também coletadas no Brasil apresentaram $2n = 54$ cromossomos, a exemplo do que se observou na população da Argentina, entretanto, com variações na morfologia dos cromossomos e na posição das RONs (KLINKHARDT, TESCHE & GREVEN, 1995; FERNANDES-MATIOLI, 1996). Além dos números diplóides 40 e 54, outras populações apresentaram ainda $2n = 42$ cromossomos (FORESTI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1984), $2n = 48$ (FORESTI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1984), e $2n = 52$ cromossomos para outras 2 populações (FORESTI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1981; FORESTI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1984).

Por outro lado, a análise citogenética de diversas populações de *Gymnotus* da região sudeste do Brasil, abrangendo as bacias do alto Paraná e do Leste, sendo elas *G. carapo*, *G. inaequilabiatus*, *G. sylvius* e *G. pantherinus*, mostraram um alto conservatismo cariotípico intraespecífico, não sendo localizadas raças geográficas, diferentemente do que se observa em outros Gymnotiformes. Independentemente de serem de diferentes localidades, todos os exemplares de *G. carapo* apresentaram $2n = 54$ cromossomos, *G. pantherinus* e *G. inaequilabiatus* apresentaram $2n = 52$ e os de *G. sylvius* apresentaram $2n = 40$. As NORs foram detectadas em um único par de cromossomos homólogos e, apesar de apresentarem diferenças interespecíficas considerando a morfologia dos cromossomos portando as mesmas e sua localização no cariótipo, foi observado que as regiões das NOR nestas espécies apresentam características comuns; elas são eucromáticas, apresentam polimorfismo de tamanho, estão localizadas no braço curto dos cromossomos e são vistas como uma constrição secundária quando coradas com Giemsa (FERNANDES-MATIOLI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1998).

As populações de *Gymnotus* sp. também têm apresentado ampla variabilidade cromossômica, a exemplo do que se observa em *G. carapo* (KLINKHARDT, TESCHE & GREVEN, 1995; FERNANDES-MATIOLI, ALMEIDA-TOLEDO & TOLEDO-FILHO, 1998).

Fernandes-Matioli & Almeida-Toledo (2001), realizando análises filogenéticas moleculares com inferências na evolução cromossômica de espécies de *Gymnotus*, propuseram, com base em dados obtidos em *Gymnotus* provenientes da bacia do alto Paraná, que o número diplóide de $2n = 52$ cromossomos poderia ser considerado como uma característica basal para o grupo, sem ser necessariamente um tratto plesiomórfico. O aumento da quantidade de heterocromatina constitutiva poderia ser uma característica sinapomórfica evidenciando a relação filogenética entre *G. carapo* e *G. inaequilabiatus*. Finalmente, o número diplóide de 54 cromossomos seria um “último” evento onde a fissão cromossômica poderia ser um tratto autapomórfico para *G. carapo*. A ocorrência do número diplóide de $2n = 40$ cromossomos provavelmente seria devido a eventos de fusão cêntrica associados com gradual perda de blocos heterocromáticos, características que poderiam ser consideradas autapomórficas para *G. sylvius*.

Os dados citogenéticos disponíveis para a família Gymnotidae revelam uma ampla e interessante variação citogenética. Frente a estes dados, torna-se de grande interesse o estudo citogenético de peixes desta família, visando uma melhor compreensão da evolução cariotípica que vem ocorrendo neste grupo, assim como para auxiliar na classificação destes animais, fornecendo dados de citotaxonomia que são muito valiosos na identificação das espécies.

3. OBJETIVOS

O presente estudo faz parte de um projeto amplo que visa a ampliação de dados citogenéticos sobre os peixes de cabeceira da região sul de Minas Gerais, tendo como objetivos específicos:

3.1 Caracterizar cromossomicamente diferentes espécies de *Gymnotus*, coletados no Córrego Fundo, afluente do rio Sapucaí, para a determinação do número diplóide e morfologia dos cromossomos.

3.2 Aplicar técnicas de coloração e bandamentos cromossômicos diferenciais, tais como a Ag-RON e banda C, que forneçam dados sobre as regiões organizadoras de nucléolo e padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, visando contribuir com informações mais detalhadas a respeito dos mecanismos de diversificação cromossômica ocorridos nestas espécies.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

No presente trabalho foram realizadas análises citogenéticas em exemplares de peixes do gênero *Gymnotus* coletados no Córrego Fundo, afluyente do Rio Sapucaí, pertencente à bacia do Rio Grande, Minas Gerais.

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

4.2 Métodos

4.2.1 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 & Leavens (1971) para anfíbios e répteis, e utilizada também por Lee & 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 banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos;

3. injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml para cada 100g de peso do animal;
4. deixar o animal em aquário bem areado por 48h ou 72h;
5. proceder à técnica para obtenção das preparações comossômicas.

4.2.2 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 placas de Petri contendo cerca de 6 ml de solução hipotônica (KCI 0,075 M);
4. dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células, devendo-se dissociar o material com pinças de pontas finas e, depois, homogeneizar com o 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) e, agitando levemente a mistura com uma pipeta Pasteur, 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 outras 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. hidrolizar 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.

4.2.3 Técnicas de coloração e bandamento cromossômico

Foram utilizadas as técnicas de coloração pela prata, para localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e a técnica de banda C, para a localização da heterocromatina constitutiva.

4.2.3.1 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs)

O procedimento foi executado conforme a técnica descrita originalmente por Howell & 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 a seguinte:

1. hidrolizar 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. lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;
5. corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por 30 segundos.

4.2.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

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

1. hidrolizar 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).

4.2.4 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 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.

4.2.4.1 Medidas cromossômicas

As medidas 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, Fredga & Sandberg (1964), e foram classificadas 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 acrocêntricos (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 fotocópias 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, calculou-se os valores médios do braço maior (BM), braço menor (Bm), comprimento total (MT), comprimento relativo (CR), e relação de braços (RB), de cada par cromossômico.

4.2.4.2 Montagem final dos cariótipos

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo ($m-sm$ e $st-a$), pareados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho, para o arranjo final do cariótipo.

5. Artigo decorrente do desenvolvimento desta dissertação de Mestrado.

**Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* species
(Teleostei: Gymnotidae) from the
Fundo stream, MG, Brazil**

Maria Conceição Vieira Lacerda, Beatriz Terezinha dos Santos 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

Three sympatric species of *Gymnotus* from the Fundo stream, a small tributary of the Sapucaí river, Minas Gerais State, Brazil, were studied in relation to their karyology. *Gymnotus sylvius* presented $2n = 40$ chromosomes (36 m/sm + 4 st/a), *Gymnotus* sp. presented $2n = 50$ (44 m/sm + 6 st/a) and *Gymnotus paraguensis* had $2n = 54$ (50 m/sm + 4 st/a). C-banding demonstrated positively stained heterochromatic blocks in the centromeric position of few chromosomes on *G. sylvius* and in the centromeric region of all chromosomes on *G. paraguensis* samples. The nucleolus organizer region (NOR) was located on the short arm of one st chromosome pair in *G. sylvius* and *Gymnotus* sp., and in the interstitial position on the short arm of the pair number one and below the centromere on a third chromosome on *G. paraguensis*. The cytogenetic data obtained indicate that *Gymnotus* sp. represent a new *Gymnotus* species with a karyotypic constitution never observed on other species from this genus. Some aspects related to the chromosome diversification of these *Gymnotus* are discussed.

Key words: *Gymnotus paraguensis*, *Gymnotus sylvius*, *Gymnotus* sp., NOR-banding, C-banding.

Introduction

Gymnotus is the most geographically widespread of all Gymnotiformes, extending from the Rio Salado in the Pampas of Argentina (36°S) to the Rio San Nicolás of southeastern Chiapas, Mexico (18°N), and is present in the continental waters of all South and Middle American countries except Chile and Belize (Albert, 2001). It is the only genus of Gymnotidae and encompasses about 32 valid species (Crampton and Albert, 2003; Albert *et al.*, 2005) although many undescribed species probably still exist (Nelson, 1994). *Gymnotus* is most diverse in the Amazon Basin where 18 species are known to reside, including three undescribed forms (Albert *et al.*, 2005). Fishes of this group present nocturnal habits, and are extremely territorial and aggressive (Lundberg *et al.*, 1987).

Gymnotus species have been studied from the cytogenetic viewpoint. *G. carapo* present $2n = 54$ chromosomes, *G. sylvius* $2n = 40$, *G. pantherinus* and *G. inaequilabiatus* sharing $2n = 52$ chromosomes, *Gymnotus pantanal* (cited as *Gymnotus* sp.) present $2n = 40$ for females and $2n = 39$ for males, being the only *Gymnotus* species with multiple sex chromosome system, and high intraspecific karyological conservation have been observed when different *Gymnotus* populations are compared (Foresti *et al.*, 1984; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2004; Silva and Margarido, 2005). An extensive chromosome variability was initially described for *G. carapo*, including chromosome numbers varying from $2n = 52$, $2n = 48$, $2n = 46$ to $2n = 42$, which were described for different populations on this species sampled from the Amazon basin, the Paraná basin and from the East basin (Almeida-Toledo, 1978; Foresti *et al.*, 1984; Foresti, 1987). However, Albert and Crampton (2003), after the reexamination of these *G. carapo* populations, made their redescription and described some new species. Natural triploidy was observed on *G. carapo* samples from Mogi Guaçu river (Upper Paraná basin) (Fernandes-

Matioli *et al.*, 1998) and a wide variability of the NOR-bearing chromosomes was observed on six *G. carapo* populations from the Upper Paraná river system in Brazil (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997), now redescribed as a new species, *G. paraguensis* (Albert and Crampton, 2003). In order to better understand the *Gymnotus* evolution, some species also were analyzed considering its electric organ discharge (Fernandes-Matioli, 1996), nuclear (GGAC)_n microsatellite (Fernandes-Matioli *et al.*, 2000) and the partial sequence of the subunit 2 of the NADH-dehydrogenase mitochondrial gene (Fernandes-Matioli and Almeida-Toledo, 2001).

The purpose of this paper is to describe the diploid number, chromosome formula, constitutive heterochromatin pattern, and NOR location of three sympatric *Gymnotus* species collected in a small tributary of Sapucaí river, Minas Gerais, Brazil.

Material and Methods

A cytogenetic survey was performed on eleven specimens of *Gymnotus sylvius* (5 females, 2 males and 4 with undetermined sex), sixteen specimens of *G. paraguensis* (7 females, 2 males and 7 with undetermined sex) and two specimens of *Gymnotus* sp. (2 males) collected in the Fundo stream, Alfenas town, State of Minas Gerais, Brazil. Voucher specimens are deposited in the fish collection of the Laboratory of Genetics, UNIFENAS, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

Chromosome preparation: Animals were injected with 0.025% colchicine (1 ml/100g body weight) 50 min before sacrifice. Anterior kidney was extracted and minced in a 0.075M KCl solution, placed in a incubator at 37°C for 23 min and then centrifuged. The supernatant was discarded and the cell pellet was fixed twice in a methanol:acetic acid (3:1) solution,

ressuspended in fresh fixative and dropped on heated slides (Foresti *et al.*, 1993). Chromosome preparations were stained with a 5% Giemsa staining solution. Chromosome morphology was determined on the basis of arm ratios as proposed by Levan *et al.* (1964) and the chromosomes were classified as metacentric/submetacentric (m/sm) and subtelocentric/acrocentric (st/a), 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).

Results

Gymnotus sylvius analyzed in this study presented $2n = 40$ chromosomes, being 36 m/sm + 4 st/a; *G. paraguensis* presented $2n = 54$, being 50 m/sm + 4 st/a; and *Gymnotus* sp. presented $2n = 50$ (44 m/sm + 6 st/a) (Figures 1a, 2a and 3a, respectively). In *Gymnotus* sp., the first chromosome pair is clearly bigger than the second pair (Figure 3a). A secondary constriction was evidenced on the terminal position on the short arm of the 19th st chromosome pair in *G. sylvius* and in the same position on the first chromosome pair of the karyotype in *G. paraguensis* (Figures 1a and 2a, respectively).

Ag-NORs was located in the terminal region on the short arm of the 19th st pair of *G. sylvius* with an evident size heteromorphism (coinciding with the region of secondary constriction) (Figure 1, in the inset), on the same position on a st chromosome pair of *Gymnotus* sp. with size heteromorphism (Figure 3b), and on the short arm of the first chromosome pair also with size heteromorphism (coinciding with the region of secondary constriction) of *G. paraguensis* being observed additionally one sm chromosome with Ag-NOR below the centromere in about 5% of the cells of the two examples (Figure 2, in the inset).

With regard to C-band pattern, heterochromatic blocks were detected in the centromeric or pericentromeric regions of few chromosomes, and in the terminal position on the short arm of the pairs 10 and 19 on *G. sylvius* (Figure 1b). In *G. paraguensis* C-band blocks were located in the centromeric position of all chromosomes, in the short arm of the pairs 1 and 10, and in the long arm of the pair 3 (Figure 2b). It was not possible to obtain C-banding pattern from *Gymnotus* sp. samples.

Discussion

G. sylvius analyzed in the present study showed the chromosome number, morphology and C-banding pattern very similar to that described for *G. sylvius* collected from different sites of Upper Paraná system (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998). However, the Ag-NOR signals observed on other populations studied by Fernandes-Matioli *et al.* (1998) were always located on interstitial position on the short arm of one sm pair, while in the population from the Fundo stream, the Ag-NOR signals were detected on the terminal position. Since heterochromatic regions are known to contain highly repetitive DNA and to present heteromorphisms (Sumner, 1990), our observation reinforces the suggestion of Fernandes-Matioli *et al.* (1998) that heterochromatic regions bordering NOR tends to favor chromosome rearrangements in these particular chromosome areas.

In the same way, karyological data obtained on *G. paraguensis* from Fundo stream were similar to those observed on *Gymnotus carapo* (redescribed as *G. paraguensis*, Albert and Crampton, 2003) from other Southeastern Brazilian basins (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998) and indicate that they correspond to the same species. However, some individuals from Fundo stream showed a third NOR-bearing chromosome, not observed on other populations. The karyological data obtained from these two *Gymnotus* species from Fundo stream confirm

the high intraspecific karyotypic conservation of some *Gymnotus* species from different localities on Southeastern Brazilian basins observed by Fernandes-Matioli *et al.* (1998). Chromosome analysis of *Gymnotus* species/populations using FISH with rDNA probes could clarify whether heteromorphism of the NOR number represent a new feature to the *G. paraguensis* from the Fundo stream or corresponds only to technical artifacts related to NOR banding.

On the other hand, *Gymnotus* sp. from Fundo stream presented $2n = 50$ chromosomes, being 26 m/sm and 24 st/a. This chromosome number and morphology were never described for other *Gymnotus* species/populations cytogenetically studied and clearly show that this population represents a new *Gymnotus* species. This result reinforces the idea proposed by Nelson (1994) that many undescribed *Gymnotus* species probably still exist. The karyological data available in literature show that *G. pantherinus* from Upper Paraná system and from East basins, with $2n = 52$ chromosomes (46 m/sm + 6 st/a) and NOR sites also on one st chromosome pair (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998), is a *Gymnotus* species that presents karyotypic constitution more similar to this new species from Fundo stream. If this correlation is correct, and considering the proposition that $2n = 52$ could be considered a basal feature for *Gymnotus* group (Fernandes-Matioli and Almeida-Toledo, 2001), we may assume the hypothesis that a centric fusion involving two st/a chromosome pairs and pericentric inversions on some m/sm chromosomes could be responsible for the karyotypic diversification observed between *Gymnotus* sp. and *G. pantherinus*. The centric fusion proposed could also explain the big size of the first chromosome pair of *Gymnotus* sp. from Fundo stream, which is not observed on others *Gymnotus* species till now cytogenetically studied.

Several *Gymnotus* species represent cryptical species with hard identification by conventional taxonomic parameters (Nelson, 1994). The three sympatric *Gymnotus* species

studied in the present work could be discriminated by the Ag-NOR-bearing chromosomes showing that NOR sites are species/specific for them. This point of view demonstrates that NOR-banding is a good cytotaxonomic tool for this fish group as well as observed on *Leporinus* species, when different species presenting $2n = 54$ m/sm chromosomes can be differentiated by NOR sites location (GALETTI JUNIOR-Jr. *et al.*, 1984; Pereira *et al.*, 2002).

The cytogenetic data obtained in the present study shows the existence of three species of *Gymnotus* living in sympatry, one of them still undescribed. This is not a new situation on fishes. Maistro *et al.* (2000), analyzing specimens of *Astyanax scabripinnis* from the Tamanduá stream, State of São Paulo, Brazil, observed specimens with $2n = 50$ and $2n = 48$ chromosomes, also with differences in the chromosome morphology. Paintner-Marques *et al.* (2002) observed the presence of 2 cytotypes on specimens of *Bryconamericus aff. exodon* from Três Bocas stream, Paraná State, Brazil, where the samples not differentiated taxonomically presented clear differences in the chromosome morphology.

The data presented here and others from the literature clearly show the importance of association of cytogenetic, molecular and other parameters with the morphological analysis for a better understanding of phylogenetic and chromosome evolution relationship, specially on groups that present taxonomic complexity like *Gymnotus*.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Francisco Langeani Neto for the taxonomic identification of the species and to Lucimara M. Silva for his technical assistance. Funds supporting this study were provided by FAPEMIG and UNIFENAS.

References

- Albert JS (2001) Species diversity and phylogenetic systematics of American Knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 190: 1-127.
- Albert JS, Fernandes-Matioli FMC and Almeida-Toledo LF (1999) A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia* 1999:410-421.
- Albert, JS, Crampton, WGR, Thorsen, DH and Lovejoy, NR (2005) Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity* 2(4): 375-417.
- Almeida-Toledo LF (1978) Contribuição à citogenética de Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi). Doctoral Thesis. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brazil.
- Fernandes FMC, Albert JS, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Crampton WGR and Almeida-Toledo LF (2005) A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa* 933: 1-14.
- Fernandes-Matioli FMC (1996) Análises citogenéticas e dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brazil.
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF (2001) A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces, Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. *Caryologia* 54:23-30.

- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho SA (1997) Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytogen Cell Genet* 78:236-239.
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho SA (1998) Natural triploidy in the Neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces, Gymnotiformes). *Caryologia* 51:319-322.
- Fernandes-Matioli FMC, Matioli SR and Almeida-Toledo LF (2000) Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genet Mol Biol* 23:803-807.
- Fernandes-Matioli FMC, Marchetto MCN, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho SA (1998) High intraspecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian basins. *Caryologia* 51:221-234.
- Foresti F (1987) Estudos cromossômicos em Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi). Livre Docência thesis. Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita”, Botucatu, SP, Brazil.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo-Filho AS (1984) Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia* 37:141-146.
- 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.
- Galetti-Jr PM, Foresti F, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (1984) Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia* 37: 401-406.
- 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.

- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Lundberg JG, Lewis WM, Saunders JF and Mago-Leccia F (1987) A major food web component in the Orinoco River Channel: evidence from planktivorous electric fishes. *Science* 237:8183.
- Maistro, EL, Oliveira, C and Foresti, F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol* 23: 365-369.
- Nelson JS (1994) *Fishes of the World*. 3rd edn. John Wiley & Sons, Inc.. New York, pp. 172-175.
- Paintner-Marques, TR, Giuliano-Caetano, L and Dias, AL (2002) Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae).
- Sánchez S, Laudicina A and Jorge LC (2004) A new report of multiple sex chromosome system in the order Gymnotiformes (Pisces). *Cytologia* 69: 155-160.
- Silva EB and Margarido VP (2005) An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73: 293-297.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Expl Cell Res* 75:304-306.

Figure Legends

Fig. 1. Karyotypes of *Gymnotus sylvius* from the Fundo stream after conventional Giemsa staining (a) and C-banding (b). In the inset, NOR-bearing chromosomes.

Fig. 2. Karyotypes of *Gymnotus paraguensis* from the Fundo stream after conventional Giemsa staining (a) and C-banding (b). In the inset, NOR-bearing chromosomes.

Fig. 3. Karyotype of *Gymnotus* sp. from the Fundo stream after conventional Giemsa staining (a), and (b) somatic metaphase showing NOR-bearing chromosomes (arrows).

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Complex Sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). Genetica, 64, p165-169, 1984.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TRAJANO, E. A.; FORESTI, F. Análise citogenética comparativa entre o peixe cego *Pimelodella kronei*, 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.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. An early stage of sex chromosome differentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (sternopygidae). In: XVI CONGRÉS INTERNAT. DE GÉNÉTIQUE, Toronto, Canadá. Resumos...Toronto, 1988, p.258.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Técnicas de bandamento na análise citogenética de peixes. In: SIMPÓSIO DE CITOGÉNÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, Botucatu. Instituto de Biociências. São Paulo: UNESP, 1994. Anais... 1994, p.74-77.
- ALVES-LUIZ, L. et al. Ocorrência de espécies e populações de *Gymnotus* (pisces: Gymnotiformes) em território Brasileiro: levantamento de 1977 a 2002 utilizando dados citogenéticos, moleculares e morfológicos. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGÉNÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 2002. Anais...Maringá, PR: Editora da UEM, 2002, p.147.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations of *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, L. A. C. et al. The X₁X₂Y 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 cytotypes and Cytotaxonomic considerations. Chromosome Res., 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.
- BORDENAVE, S. et al. Levantamento citogenético em peixes do rio Paraná (Chaco, Argentina III, *Gymnotus carapo* (Pisces, Gymnotidei). IV SIMPÓSIO DE CITOGÉNÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1992. Resumos...São Carlos, SP, Editora da UFSCar, 1992. p.42.
- BORIN, L. A.; JÚLIO-JR, H. F. Ocorrência de um novo citótipo de *Gymnotus carapo* (Siluriformes, Gumnotoidei) no alto Paraná. V SIMPÓSIO DE CITOGÉNÉTICA

EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1994. Resumos... Botucatu, SP, Editora da UNESP, p.43.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A.; 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, 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, p.102, 1971.

DENTON, T. E. Fish chromosome methodology. USA, Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1973. 166p.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. Caryologia, v.56, 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., v.17, 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, p.369-383, 1992.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. Análises citogenéticas dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae), 1996, 79p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnoidei, Gymnotidae). Cytogen Cell Genet., v.78, p.236-239, 1997.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. and TOLEDO-FILHO, S. A. Natural Triploidy in the neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces, Gymnotiformes). Caryologia, v.51, p.319-322, 1998.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; MATIOLI, S. R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) by nuclear (GGAC) microsatellite analysis. Genet Mol Biol., v.23, p.803-807, 2000.

FERNANDES_MATIOLI, F. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. Caryologia, v.54, p.23-30, 2001.

- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenet. Cell Genet., v.31, p.137-144, 1981.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces Gymnotidae). Caryologia, v.37, n.1-2, p.141-146, 1984.
- FORESTI, F. Estudos cromossômicos em Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi). 1987. 171p. Tese (Livre docência). Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 1987.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method of chromosome preparatios from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. Experimentia, v.49, p.810-813, 1993.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S. A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausiae sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica, v.79, p.107-117, 1989.
- FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. 2ª ed., Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1993. 631p.
- GALETTI, P. M. Tendências da evolução cromossômica dos nossos peixes. (uma síntese) In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1994, Botucatu. Anais... São Paulo: UNESP, 1994. p.31-32.
- GALETTI, P. M. et al. Karyotypic cimilarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus* and *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). Rev. Brasil. Genet., v.4, p.11-15, 1981.
- GUIA ILUSTRADO DE PEIXES DA BACIA DO RIO GRANDE. Companhia Energética e Minas Gerais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEMIG; CETEC, 2000. 144p.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. Introdução à Genética. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. 856p.
- 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. Experimentia, 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, Characiforme). 1996. Dissertação (Mestrado), São Carlos, 1996.
- JESUS, C. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. Genetica, v.105, p.63-67.

- JONES, R. N. B-Chromosomes drive. Am. Nat. v.137, p.430-442, 1991.
- KAVALCO, K. F., PAZZA, R.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. Caryologia, v.56, p.453-461, 2003.
- KLINHKHARDT, M.; TESCHE, M.; GREVEN, H. Database of fish chromosomes. Magdeburg: Westarp-Wiss., 1995. 237p.
- LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. Cytogen. Cell Genet. v.26, p.36-40, 1980.
- LEITE, M. F.; MAISTRO, E. L. The karyotype of *Apareiodon affinis* (Pisces, Teleostei, Characiformes) from Sapucaí River, Minas Gerais, Brazil. Cytologia, v.69, p.319-322. 2004.
- LEVAN, A. ; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v.52, p.201-220, 1964.
- MAISTRO, E. L. Caracterização Citogenética e Morfológica de Populações de *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae) das bacias dos rios Tietê e Paranapanema. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 1991. 143p.
- MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). Genetica, v.87, p.101-106. 1992.
- MAISTRO, E. L. et al. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Caryologia, v.47, p.233-239, 1994.
- MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Genetics and Molecular Biology, v.21, p.201-206, 1998.
- MAISTRO, E. L.; MATA, E. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). Genetica, 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.; JESUS, C. M.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes and ZZ/ZW Sex Chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). Cytologia. v.69, n.2, p.181-186, 2004.
- MALABARBA, L. R. et al. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 1998. 603p.
- 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, v.109, p.161-168, 2000.
- 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 de Vertébrés. Lausanne: Rouge, 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 Jr, 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). 1995. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 1995.
- 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 Jr, 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.; GALETTI Jr, 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.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr, P. M. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. Cytogenet Genome Res., v.106, p.230-234, 2004.
- 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.
- NELSON, J. S. Fishes of the world. 3 rd ed., John Wiley e Sons, Inc. 1994. 600p.
- 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, v.108, p.211-215, 2000.
- NOGUSA, S. A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution. Memories of the Hyogo University of Agriculture, v.3, 1960.
- 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.

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

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

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

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. 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. 1999. 90p. Dissertação (Mestrado). Alfenas, UNIFENAS, 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.

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

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, p.345-350, 2003.

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

SWANSON, C. P. ; MERZ, T.; YOUNG, W. J. Citogenética. Editora da Universidade de São Paulo, Editora Polígono, 1969. 255p..

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, p.589-593, 2000.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome 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.

WAGNER, R. P.; MAGUIRE, M. P.; STALLINGS, R. L. Chromosomes: a synthesis. Wiley-Liss, Inc., 1993. 523p.

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