

ANA PAULA DE AMORIM

Estudo Citogenético da População de *Characidium lanei*
do Rio Ribeirão da Bacia do Sul-Sudeste

Monografia apresentada à disciplina BG 014 do
Departamento de Genética do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Marta Margarete Cestari

Co-Orientador: Dr. José Marcelo Rocha Aranha

CURITIBA
2003

**Ao Carlos,
por todo o nosso amor.**

Agradecimentos

À Professora Margarete, minha orientadora, pela oportunidade, dedicação e pelos seus ensinamentos. Agradeço também pela sua paciência.

Ao Professor Marcelo Aranha, pela idéia e incentivo em desenvolver este trabalho. Agradeço a sua fundamental presença nas coletas.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Animal, Andréa, Cristina, Deborah, Eli, Fátima, Fernanda, Íris, Prof. Ives, Rafael (Polly) e Roxane. Em especial, agradeço muito aos meus 'tutores' nas técnicas e análises citogenéticas: Daniel, Rafael e Roger (sem vocês eu não teria conseguido!).

Ao Rodrigo, pela ajuda nas coletas e principalmente pelas conversas e conselhos!

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia de Rios, Jean, Marcelinho e em especial, ao Almir e à Karin, pela ajuda na identificação dos espécimes.

Aos meus Pais, Robles e Ecléia, pelo apoio, dedicação e amor durante todos os anos da minha vida. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos, Flávia, Mariana e Robinho, e a minha Avó Tida, pelo apoio e carinho. Agradeço também a todos da minha família, Eva, Márcio, Rê, Lê, Maurício e Rick, por tudo.

À minha sobrinha Amanda, por todo o seu carisma e sua alegria irradiante!

Aos meus amigos, Carla, Cynthia, Igor, Felipe, Fran, Jú, Lú, Raquel e Sú, por toda a nossa amizade.

À grande amiga e 'mãezona' Rô, da Coordenação da Bio, por todo o apoio e força sempre constantes durante a minha graduação.

Ao Carlos, pelo apoio, dedicação, amizade e carinho, pela fundamental presença e ajuda, enfim, pelo seu amor.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Citogenética de Peixes	1
1.2. Aspectos gerais da família Crenuchidae	4
1.3. Sistema Cromossômico Sexual	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos iniciais	9
2.2. Objetivos alcançados	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Área de Estudo	10
3.2. Material	11
3.3. Métodos	12
3.3.1. Procedimentos Metodológicos para Coleta e Transporte	12
3.3.2. Procedimentos Metodológicos para Obtenção de Metáfases Mitóticas	12
3.3.3. Procedimentos Metodológicos para Coloração Convencional - Giemsa	14
3.3.4. Procedimentos Metodológicos para Bandamento das RONS	14
3.3.5. Procedimentos Metodológicos para Bandamento C	15
3.3.6. Fotomicrografia	15
3.3.7. Identificação dos Cromossomos e Montagem dos Cariótipos	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Resumo

O Rio Ribeirão pertence à Bacia do Sul-Sudeste (estado do Paraná) e nasce a 766m de altitude em relação ao nível do mar, na Serra da Prata. Forma uma bacia isolada e deságua diretamente na Baía de Paranaguá. Situa-se em uma região bem conservada da Floresta Atlântica com as nascentes no Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange. O gênero *Characidium* pertence à família Crenuchidae e compreende peixes de tamanho pequeno com o corpo alongado, a boca pequena e a nadadeira anal curta, distribuído desde o Paraná até a Argentina. Apresentam uma taxa elevada de especiação, sendo possível a ocorrência de muitas espécies desconhecidas devido ao alto grau de endemismo geográfico nesses grupos de peixes. Apesar do considerável desenvolvimento da citogenética de peixes nos últimos 20 anos, informações sobre cromossomos e cariótipos deste grupo têm sido de aproximadamente 12% das espécies conhecidas do gênero. O objetivo deste estudo foi caracterizar citogeneticamente a população de *Characidium lanei*, do Rio Ribeirão, Bacia do Sul-Sudeste. O número diplóide observado para os 9 exemplares (4M, 4F e um de sexo indefinido) de *C. lanei* foi $2n=50$ cromossomos todos com dois braços, corroborando com os dados da literatura para as outras espécies que constituem o gênero *Characidium*. A espécie *Characidium lanei* apresentou um sistema cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW, onde o W se apresenta totalmente heterocromático. As Regiões Organizadoras de Nucléolos se apresentaram em apenas um par de cromossomos, o que corrobora com a maioria das espécies deste gênero. *Characidium lanei* do Rio Ribeirão mostrou uma macroestrutura cariotípica ($2n=50$ e NF=100) compatível com a maioria das espécies deste gênero.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citogenética de Peixes

As informações cromossômicas em peixes cobrem apenas 14% das espécies conhecidas (DOUCETTE & FITZSIMONS, 1988). Embora informações detalhadas concernentes à citogenética de espécies de peixes estejam cada vez mais disponíveis devido ao incremento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda bastante reduzido e muito inferior ao de mamíferos e de outros grupos de seres vivos. Há pelo menos duas razões para isto: primeiro, os cromossomos da maioria dos peixes são bem menores do que os de vários outros grupos animais; segundo, as técnicas de bandamento, que são altamente desenvolvidas em mamíferos, não são tão resolutivas no estudo de cromossomos de peixes (BRUM, 1995).

No início dos anos 70, a citogenética de peixes teve que adequar técnicas utilizadas em outros grupos de vertebrados, principalmente mamíferos, que devido ao natural interesse pela espécie humana, estava evidentemente bem adiantada. Os primeiros trabalhos desenvolvidos em citogenética de peixes, restringiram-se apenas a determinação do número cromossômico, haplóide e/ou diplóide de cada espécie. Conforme as técnicas foram sendo aprimoradas e adequadas aos estudos em peixes, vários trabalhos puderam ser desenvolvidos e vários grupos de peixes vêm sendo estudados desde então (MIYAZAWA, 1991).

Novas evidências sugerem que alterações no cariótipo podem ter um papel primário na especiação ao contrário do que se pensava antes, onde apenas a poliploidia e o isolamento geográfico acarretariam a formação de novas espécies (SOLA, CATAUDELLA & CAPANNA, 1981).

A citogenética pode representar um eficiente complemento nas investigações de taxonomia e sistemática (BERTOLLO *et al.*, 1986). Segundo BRUM (1995), os estudos citogenéticos têm avançado tanto, que têm sido utilizadas pelos

sistematas na formulação de hipóteses mais rigorosas relativas a filogenias de grupos sob investigação, tanto por citogeneticistas na dedução do tipo e número de rearranjos cromossômicos incorporados ao curso de evolução, como por geneticistas no que concerne às forças que atuam na fixação dos rearranjos cromossômicos.

Segundo MIYAZAWA (1991), a citogenética pode ter várias funções no estudo dos peixes, podendo-se destacar: a caracterização cariotípica das espécies; evidências cromossômicas para suas relações evolutivas; suporte adicional para a identificação de espécies taxonomicamente problemáticas e de espécies crípticas. Assim sendo, diversos trabalhos têm dado subsídios para a taxonomia, evidenciando a necessidade da revisão em vários grupos de peixes, frente aos resultados já obtidos.

Os números de cromossomos, em peixes, distribuem-se nas espécies estudadas até o momento, de $2n=12$ até $2n=250$ (KIRPICHNIKOV, 1981 *apud* BRUM, 1995) com a maioria tendo números diplóides entre 40 e 60. Em relação ao grupo de peixes teleósteos, uma quantidade diversa de números cromossômicos tem sido encontrada, distribuindo desde 14 até 140, sendo que, de modo geral, as espécies não possuem microcromossomos no complemento cariotípico padrão. Os cariótipos deste grupo de peixes, também apresentam uma imensa variedade de fórmulas cromossômicas, com diferentes quantidades de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos (BRUM, 1995).

As investigações citogenéticas com os peixes de água doce mostram que estes possuem em geral, números diplóides maiores que 48 e uma maior variedade de composições cromossômicas, incluindo quantidades diferentes de metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (OLIVEIRA *et al.*, 1988).

O grupo de teleósteos de água doce mais importante, em termos de diversidade de espécies são os Ostariophysii. Estes peixes representam cerca de 90% de toda a ictiofauna neotropical, e compreendem cerca de 25% de todas as espécies de teleósteos. Um complemento diplóide com $2n=50$ tende a prevalecer

entre seus representantes, principalmente entre os Otophysi, cujo número fundamental, no entanto, é bem maior que 50, refletindo a presença de muitos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos no cariótipo de muitas espécies do grupo (BRUM, 1995).

Um outro grupo importante de Ostariophysi, os Characiformes, possui um número modal de cromossomos igual a $2n=54$. Várias de suas famílias, podem ser caracterizadas com base em seus números cromossômicos. Em algumas famílias, tais como Anostomidae, Parodontidae e Prochilodontidae, todas as espécies apresentam uma nítida estabilidade da macroestrutura do cariótipo ($2n=54$), o que parece sugerir que este cariótipo representa uma sinapomorfia para estes grupos, que podem assim, ser considerados como grupos-irmão. Isto mostra que, tomado junto com outras características, o número cromossômico pode ser de grande ajuda para determinação dos padrões de evolução neste grupo (BRUM, 1995).

1.2. Aspectos Gerais da família Crenuchidae

A ordem Characiformes é um dos três maiores grupos de peixes de água doce do mundo, com mais de 1343 espécies (NELSON, 1994). Entre os characiformes neotropicais, poucos grupos continuam desconhecidos quanto à citogenética (MAISTRO *et al.*, 1998). Entre eles está a subfamília Characidiinae, cuja posição filogenética entre os characiformes tem sido tratada como incerta por autores recentes, foi recentemente revisada por BUCKUP (MALABARBA *et al.*, 1998), que sugere que a subfamília pertença à família Crenuchidae, juntamente com Crenuchinae, ambas as subfamílias são monofiléticas, compreendendo um total de 67 gêneros. A maioria dos peixes que pertencem à família Crenuchidae, são habitantes de pequenos córregos que fluem rapidamente, onde pairam em torno dos seixos, da rocha e da vegetação (FISHBASE, 2001).

Exceto o gênero *Characidium*, a maioria das espécies pertencentes à família Crenuchidae são, relativamente, bem conhecidas. O gênero *Characidium*, entretanto é pouco conhecido, incluindo muitas espécies ainda não descritas. Compreende peixes de tamanho pequeno com o corpo alongado, a boca pequena e a nadadeira anal curta, distribuído desde o Paraná até a Argentina. (BUCKUP, 1991 *apud* MIYAZAWA & GALETTI JR, 1994). BUCKUP (1993) apresenta uma lista das espécies conhecidas para o gênero, incluindo novos sinônimos, e algumas espécies foram recentemente descritas (BUCKUP & REIS, 1997; BUCKUP & HAHN, 2000).

Poucos são os trabalhos realizados quanto à biologia de *Characidium*, mesmo tendo sido considerado, por BRITSKI (1972 *apud* MIYAZAWA, 1991), um grupo que tem despertado especial atenção, entre os peixes brasileiros. Recentemente, ARANHA, TAKEUTI & YOSHIMURA (1998) publicaram um estudo sobre o uso do habitat e alimentação de 26 espécies do Rio Mergulhão (Antonina, PR), dentre eles *C. lanei* e *C. pterostictum* e ARANHA, GOMES & FOGAÇA (2000) realizaram também um trabalho sobre alimentação das duas espécies *C. lanei* e *C. pterostictum*, consideradas simpátricas. BUCKUP & HANH

(2000) descreveram uma nova espécie para o gênero, *Characidium vestigipinne*, da Bacia do Alto Rio Uruguai e também apresentam uma chave atualizada de identificação das espécies de *Characidium* ocorrentes no sul do Brasil. SILVA *et al.* (2002) realizaram um estudo do uso do espaço em relação ao substrato por *Characidium* sp 1 na Serra da Bodoquena, MS. FEHLAUER (2002) descreve a estrutura da população e táticas reprodutivas de *C. lanei* no Rio Ribeirão (Paranaguá, PR). MAZZONI, CARAMACHI & FENERICH-VERANI (2002) analisaram alguns aspectos da reprodução de *Characidium* sp.n. e discutiram as possíveis relações de causalidade entre a estratégia adotada e a situação ambiental em um riacho costeiro, Rio Ubatiba (Marica, RJ).

Segundo MAISTRO *et al.* (1998), apesar do considerável desenvolvimento da citogenética de peixes nos últimos 20 anos, informações sobre cromossomos e cariótipos deste grupo têm sido de aproximadamente 12% das espécies conhecidas do gênero. Os primeiros estudos citogenéticos com o gênero foram realizados por MIYAZAWA (1991), que realizou o estudo cariotípico de espécies e populações, ressaltando considerações citotaxonômicas e evolutivas do trabalho. MIYAZAWA & GALETTI JR (1994), publicaram um estudo com as espécies *C. fasciatum*, *C. zebra*, *C. lagsantensis* e *C. pterostictum*, indicando que estes peixes apresentam um número diplóide modal $2n = 50$. MAISTRO *et al.* (1998) relatam a ocorrência de sistema cromossômico sexual ZZ/ZW e de cromossomos supranumerários em um estudo de duas populações de *Characidium fasciatum*, da Bacia do Rio São Francisco e da Bacia do Paranapanema. CARVALHO *et al.* (1998) realizaram estudo da quantidade de DNA em peixes neotropicais, incluindo a espécie *C. fasciatum*. VENERE, MIYAZAWA & GALETTI JR (1999), descreveu novos casos de cromossomos supranumerários em characiformes, relatando a presença em *C. zebra*. O mais recente trata-se de um estudo citogenético comparado de duas espécies simpátricas, *C. gomesi* e *C. zebra*, e a descrição do sistema cromossômico sexual e o registro de triploidia natural em *C. gomesi*, realizado por CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO (2001).

Segundo CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO (2001), o gênero *Characidium* apresenta um padrão cariotípico estável, demonstrando um número diplóide $2n = 50$ e $NF=100$, e cromossomos com dois braços, normalmente meta-submetacêntricos. Em amostras da Bacia do Paraná, foram verificadas tanto a presença de sistema cromossômico sexual, quanto à presença de cromossomos supranumerários.

Segundo BOHLKE *et al.* (1978, *apud* MIYAZAWA, 1991), os pequenos characídeos como os do gênero *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus* e *Characidium* apresentam uma taxa elevada de especiação, sendo possível a ocorrência de muitas espécies desconhecidas devido ao alto grau de endemismo geográfico nesses grupos de peixes.

1.3. Sistema Cromossômico Sexual

A determinação do sexo, nos peixes, é tida como poligênica, visto que a existência de cromossomos sexuais heteromórficos não é regra nestes animais. Apesar disso, a ocorrência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados já foi relatada em 40 espécies e/ou populações locais (5,7% do total de espécies analisadas) (OLIVEIRA, ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1996).

Nos peixes neotropicais foram encontrados diversos sistemas cromossômicos sexuais simples e múltiplos, destacando-se o “complexo de espécies” *Hoplias malabaricus* que apresenta 3 tipos diferentes destes sistemas.

Dentre os sistemas simples, o de maior incidência foi o XX/XY em *Hoplias lacerdae* (BERTOLLO, TAKAHASHI & MOREIRA-FILHO, 1979); *Hoplias malabaricus* do Vale do Ribeira e do Vale do Rio Doce (BERTOLLO, TAKAHASHI & MOREIRA-FILHO, 1979), da Chácara da Paz (município de São José dos Pinhais - PR) (LEMOS *et al.*, 2002); *Salvelinus namaycush* (PHILLIPS & IHSEN, 1985); *Proterorhinus marmoratus* (RAB, 1985), entre outros.

Este é seguido pelo sistema sexual ZZ/ZW, descrito em várias espécies, como: *Colisa fasciatus* (Perciformes) (RISHI, 1979); *Poecilia sphenops* var. *melanista*; *Leporinus obtusidens* e *Leporinus elongatus* (GALETTI & FORESTI, 1987); *Leporinus reinhardi* e *Leporinus* sp (GALETTI JR *et al.*, 1981); *Poecilia latipinna* (SOLA, MONACO & RASHI, 1990); *Triportheus guentheri* (BERTOLLO & CAVALLARO, 1992); *Parodon hilarii* (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI JR, 1993). Aproximadamente 50% das ocorrências de cromossomos sexuais relatadas para a ictiofauna neotropical, correspondem a fêmeas heterogaméticas (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI JR, 1993; BERTOLLO *et al.*, 2000).

Duas espécies do gênero *Characidium* apresentam o par cromossômico heteromórfico observado em fêmeas, indicando a ocorrência do sistema cromossômico de determinação sexual ZZ/ZW. São elas: a população de *Characidium fasciatum* do Quinta e Rio Pardo, SP (MAISTRO *et al.*, 1998) e a

população de *Characidium gomesi* de São Bento Sapucaí, SP (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001).

Com o intuito de estudar o cariótipo da espécie *Characidium lanei* dos rios da Bacia do Sul-Sudeste no Estado do Paraná, o presente trabalho analisou esta população pertencente ao Rio Ribeirão (Paranaguá, PR), sob o ponto de vista citogenético.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos iniciais

- Caracterizar e comparar o cariótipo de *Characidium lanei*, provenientes das populações dos Rios Ribeirão e Cabral;
- Caracterizar e comparar os padrões de bandamento RONS e banda C de *Characidium lanei*, provenientes das populações dos Rios Ribeirão e Cabral com outras espécies do mesmo gênero;
- Analisar os dados citogenéticos no contexto da biologia evolutiva, buscando colaborar para o melhor conhecimento da biogeografia da espécie.

2.2. Objetivos alcançados

- Caracterização cariotípica de *Characidium lanei* proveniente do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR);
- Caracterização dos padrões de bandamento RONS e C;
- Análise dos dados citogenéticos no contexto da biologia evolutiva, buscando colaborar para o melhor conhecimento da biogeografia da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

O clima na região a que pertence o rio Ribeirão é tropical, super úmido, sem estação seca e isento de geadas (KOEPPEN *in* IAPAR, 1978). A temperatura média anual varia de 17°C a 21°C (MAACK, 1981).

O Rio Ribeirão (25°35'S; 48°37'O) pertence à Bacia do Sul-Sudeste (estado do Paraná) e nasce a 766m de altitude em relação ao nível do mar, na Serra da Prata (figura 1). Este rio é caracterizado por água clara, variado sombreamento pela vegetação marginal, correnteza moderada e substrato composto por areia, folhiço e cascalho. Forma uma bacia isolada e deságua diretamente na Baía de Paranaguá (TAKEUTI, 1997 *apud* FEHLAUER, 2002).

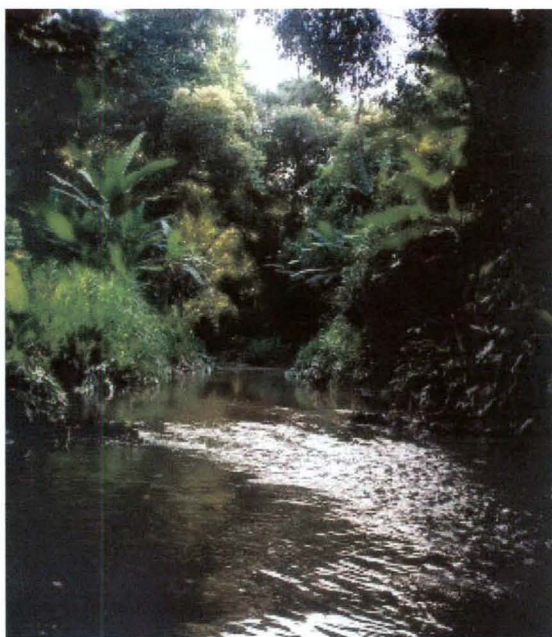


Foto cedida por Célio Roberto Jonck

Figura 1 – Rio Ribeirão (Paranaguá, PR)

Situa-se em uma região bem conservada da Floresta Atlântica com as nascentes no Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange. Apesar de ser utilizado

esporadicamente para recreação e de um dos trechos situar-se próximo à uma rodovia, a influência antrópica não é significativa (FEHLAUER, 2002).

3.2. Material

Foram coletados nove exemplares de *Characidium lanei* (quatro machos, quatro fêmeas e um de sexo indefinido) pertencentes ao rio Ribeirão (figura 2). Os exemplares mediam em média 6 cm de comprimento. Destes, oito apresentavam metáfases mitóticas em condições de análise em Giemsa e aplicação das técnicas de Bandamento C e RONS.

Foram também coletados sete exemplares de *Characidium lanei* pertencentes ao Rio Cabral. Infelizmente não obtivemos resultados para discutirmos nesta monografia.



Foto cedida por Carlos Werner Hackradt

Figura 2 – *Characidium lanei*

3.3. Métodos

3.3.1. Procedimentos Metodológicos para Coleta e Transporte

A coleta foi realizada ao longo do Rio Ribeirão, com rede de mão e peneira. Os peixes foram colocados em um isopor com água do próprio rio e levados ao laboratório de Citogenética Animal ainda com vida. No laboratório, foram mantidos em tanques, aerados até o momento do sacrifício.

3.3.2. Procedimentos Metodológicos para Obtenção das Metáfases Mitóticas

Os animais foram processados através do método indireto “in vitro” de cultura de tecidos sólidos de curto tempo, utilizando a porção anterior do rim, descrito por FENOCCHIO *et al.* (1991), com algumas modificações.

Os peixes foram abertos com tesoura de ponta fina, a partir do ânus até as brânquias, ainda com vida. As vísceras são descartadas.

Retira-se a porção anterior do rim, (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991), no caso específico do *Characidium lanei*, por ser um animal de proporções diminutas, foi utilizado todo o rim (porção anterior e posterior). O tecido foi transferido para uma placa de Petri contendo 7 ml de meio de cultura RPMI e 20% de soro bovino fetal.

Em seguida, o material foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior aspensão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha.

A solução de células obtida foi incubada em estufa a 29 °C por sete horas em média.

Os exemplares foram devidamente numerados, segundo o Livro de Registros de Citogenética de Peixes do laboratório de Citogenética Animal, e em seguida fixados em formol por 24 horas e colocados em álcool 70%.

O procedimento de processamento do material foi o seguinte:

- 25 minutos antes de completar o tempo de cultura, foram pingadas duas gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. A placa de Petri foi então gentilmente agitada para homogeneizar o material e este foi mantido em estufa até completar o tempo necessário (7 horas e meia).

- Passado os 25 minutos, a cultura foi sacrificada e transferida para um tubo de ensaio que foi centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.

- O sobrenadante foi descartado e completou-se o tubo de ensaio com 8 ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). A solução foi ressuspensa e ficou por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

- O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração.

- Dado o tempo de hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo. A solução foi ressuspensa até ficar homogêneo (por volta de 30 vezes), e centrifugada por 10 minutos a 800-900 rpm.

- O sobrenadante foi descartado e em seguida o tubo foi completado até o volume de 8 ml com fixador. Novamente o material foi ressuspensa e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.

- Esta última etapa foi repetida por mais duas vezes.

- Após a terceira e última centrifugação com fixador, o sobrenadante foi descartado. Foi colocado 1,0 ml de fixador e o material foi ressuspensa por mais uma vez. Esta solução foi armazenada em tubo de micropipeta do tipo Eppendorf (1,5ml) em freezer a - 20° C.

3.3.3. Procedimentos Metodológicos para Coloração Convencional - GIEMSA

Para análise do número e morfologia dos cromossomos, lâminas foram lavadas e em seguida receberam 3 gotas do material preparado anteriormente. Este material foi pingado em banho-maria a 60°C e seco ao ar. As lâminas foram coradas com solução de corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) a 5% durante aproximadamente 10 minutos. Em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.3.4. Procedimentos Metodológicos para Bandamento das RONS

A técnica do bandamento das RONS, descrita por HOWELL & BLACK (1980), foi realizada com lâminas envelhecidas por pelo menos um dia, em estufa à 42° C.

- Foram pingadas duas gotas de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada + 0,5 ml de ácido fórmico) e uma gota da solução de nitrato de prata (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina.

- Em seguida foi colocada uma lamínula sobre a lâmina e imediatamente levada à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcançasse uma coloração marrom-dourada.

- Em seguida a lâmina foi lavada em água corrente, deixada secar ao ar.

- Para diminuir o brilho da lâmina, pode-se colocá-la em Giemsa, bastante diluída em tampão fosfato pH 6,8 por 10 segundos.

3.3.5. Procedimentos Metodológicos para Bandamento C

Os estudos de heterocromatina foram realizados segundo a técnica de SUMNER (1972).

- O material acondicionado no freezer foi pingado sobre a lâmina e em seguida, a lâmina foi colocada em solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente por 15 minutos.

- A lâmina foi então lavada com água destilada e seca ao ar. Em seguida, a lâmina foi colocada em solução de Bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 42°C por aproximadamente 15 segundos.

- Rapidamente a lâmina foi inserida no HCl, apenas para remover o excesso de Bário, e então lavada com jato de água destilada.

- A lâmina foi colocada em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + água deionizada) a 60°C por uma hora.

- Após este tempo, a lâmina foi novamente lavada com água destilada e seca ao ar.

A lâmina foi corada com Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

3.3.6. Fotomicrografia

As lâminas foram analisadas em Microscópio óptico, Olympus, com objetiva de imersão. As metáfases foram analisadas e as que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram fotografadas em microscópio óptico Olympus, em campo claro com objetiva de imersão e também foi realizada a captura de imagem através do fotomicroscópio Zeiss da sala de microscopia do Setor de Ciências Biológicas.

3.3.7. Identificação dos Cromossomos e Montagem dos Cariótipos

Após a escolha das melhores metáfases, a montagem dos cariótipos e ordenação dos pares cromossômicos foi em ordem decrescente em tamanho. As medidas cromossômicas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, a fim de determinar a relação entre os braços. A classificação dos cromossomos foi realizada conforme os valores da relação de braços (RB), estabelecida por LEVAN, FREGDA & SANDBERG (1964), e os tipos cromossômicos:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| - Metacêntricos (M) | RB = 1,00 a 1,70 |
| - Submetacêntricos (SM) | RB = 1,71 a 3,00 |
| - Subtelocêntricos (ST) | RB = 3,01 a 7,00 |
| - Acrocêntricos (A) | RB = maior do que 7,01. |

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Characidium* apresenta um padrão cariotípico estável, através de um número diplóide $2n=50$ e cromossomos bibráquiais, freqüentemente meta-submetacêntricos (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001). O número diplóide modal observado para a população de *Characidium lanei*, do Rio Ribeirão, foi de 50 cromossomos, sendo este o mais freqüente em espécies do gênero *Characidium* até então estudadas, *C. zebra*, *C. lagsantensis*, *C. pterostictum*, *Characidium sp.*(MIYAZAWA & GALETTI JR, 1994), *C. gomesi* (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001), *C. fasciatum*. (MAISTRO *et al.*, 1998). O resultado de 50 cromossomos para *C. lanei* corrobora com os dados de outros autores mostrando que os peixes deste grupo parecem compartilhar uma estrutura cariotípica estável, um caráter ancestral para o grupo (MIYAZAWA & GALETTI JR, 1994).

O cariótipo encontrado nos machos de *C. lanei* é constituído por 8 pares de cromossomos metacêntricos e 17 pares de cromossomos submetacêntricos (16M + 34SM) (figura 3). Enquanto que nas fêmeas, o cariótipo é constituído por 8 pares mais um cromossomos metacêntricos e 16 pares mais um cromossomos submetacêntricos (17M + 33SM) (figura 4). Nota-se que há diferença entre os resultados relatados para as outras espécies do gênero. Conforme demonstrado por CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO (2001), a macroestrutura cariotípica das espécies estudadas do gênero, é 32M; 18SM, com exceção de *C. pterostictum* que apresenta 32M+16SM+2ST, no qual a presença deste par de subtelocêntricos parece ser uma condição derivada, pois não ocorre em nenhuma das outras espécies estudadas até então (MIYAZAWA & GALETTI JR, 1994). Portanto, o que parecia ser estável para o gênero, não foi demonstrado para a espécie *C. lanei*, já que esta possui um número maior de submetacêntricos do que de metacêntricos. Segundo MAISTRO *et al.* (1998), as diferenças entre as estruturas cariotípicas quando comparadas entre espécies e entre populações de *Characidium*

podem estar relacionados ao seu modo de vida, uma vez que habitam cabeceiras de rios, possuem baixa mobilidade e formam populações locais, atributos estes que podem facilitar a fixação de rearranjos cromossômicos.

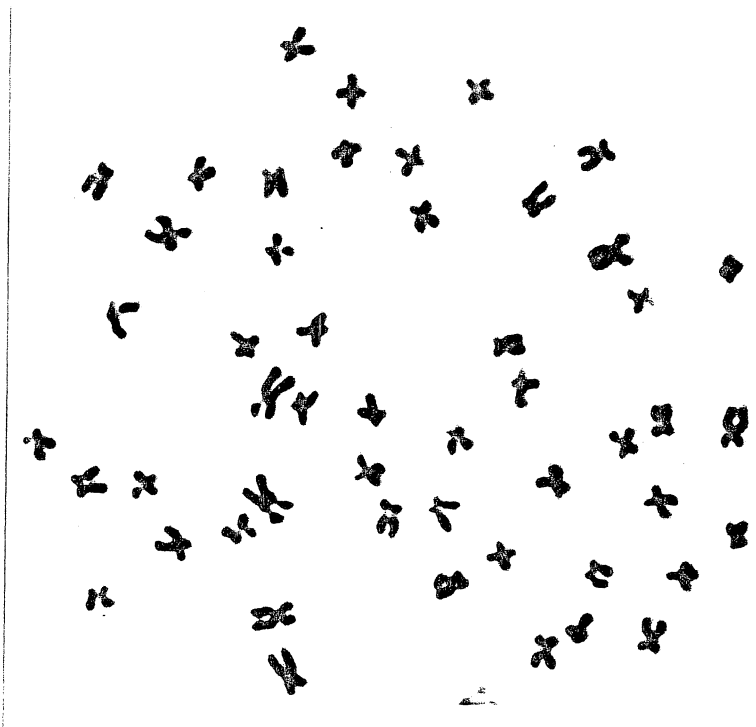
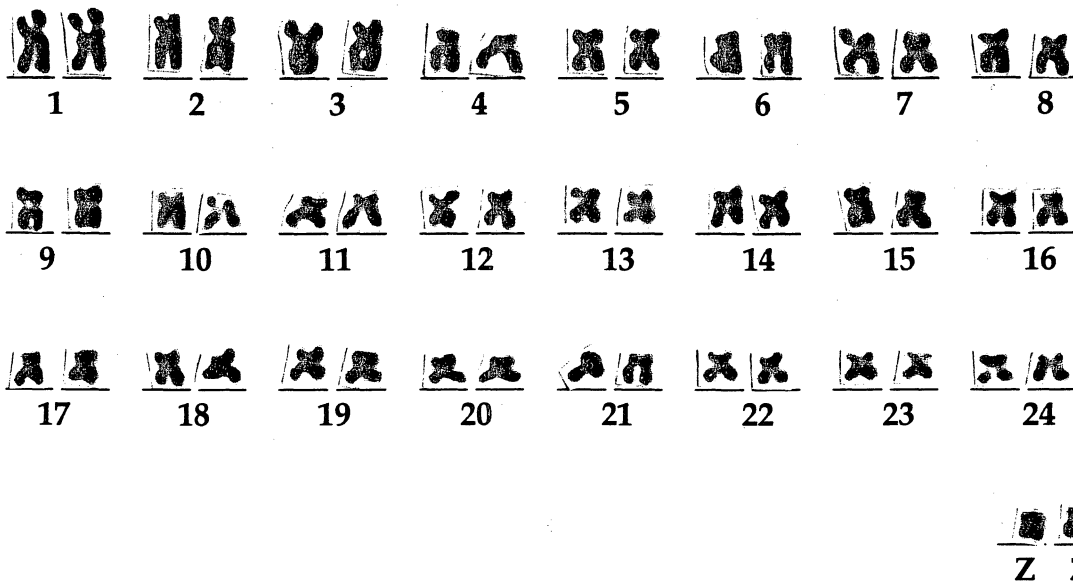


Figura 3 - Cariótipo de macho (n° 1195 - 11) de *Characidium lanei* do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR), 2n = 50 (16 M; 34 SM); NF = 100, e respectiva metáfase. Coloração: Giemsa.

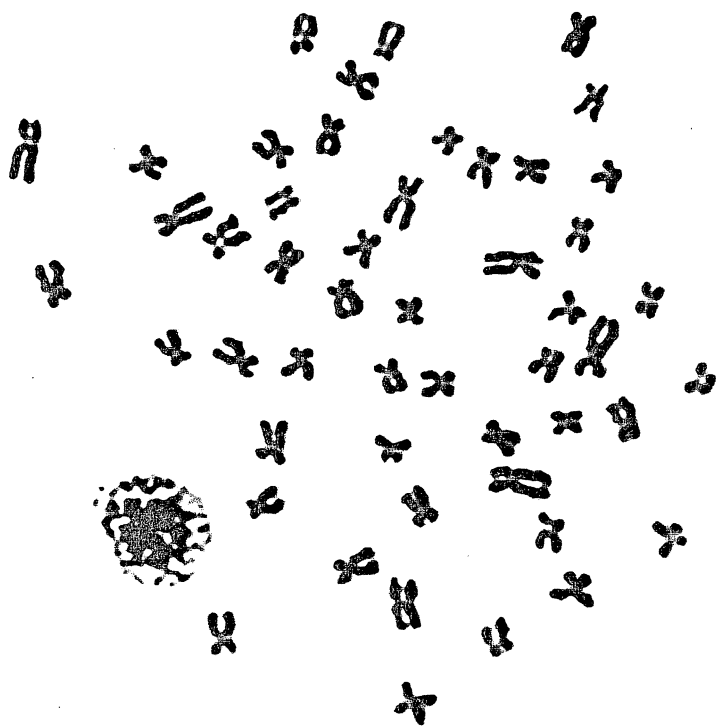
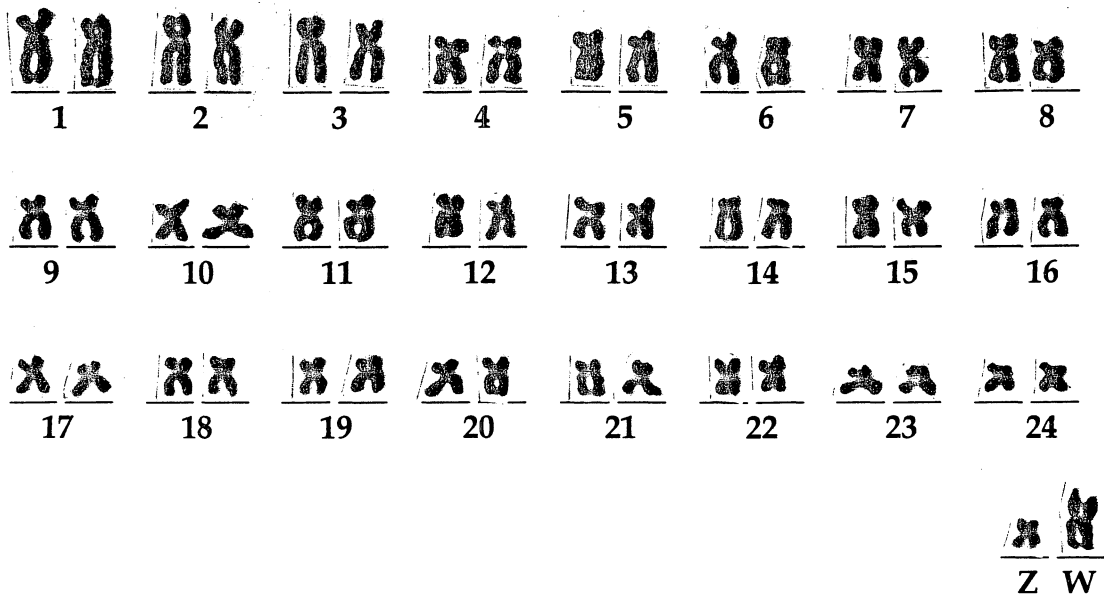


Figura 4 - Cariótipo de fêmea (nº 1196 - 4) de *Characidium lanei* do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR), $2n = 50$ (17 M; 33 SM); NF = 100, e respectiva metáfase. Coloração: Giemsa.

Entre os Characiformes, vários grupos apresentam uma tendência estável quanto à macroestrutura cariotípica, tais como Anostomidae, Prochilodontidae e Curimatidae (GALETTI JR. *et al.* 1981; PAULS & BERTOLLO, 1983; VENERE & GALETTI JR, 1989). Portanto os dados encontrados até o momento para Crenuchidae corroboram com uma macroestrutura estável onde todos os cromossomos são de dois braços.

Foi detectado dimorfismo cromossômico sexual em *Characidium lanei*, coletado no Rio Ribeirão. O cariótipo das fêmeas mostra claramente o heteromorfismo cromossômico sexual, onde um cromossomo metacêntrico grande pode ser considerado o W e um submetacêntrico menor, o cromossomo Z. Portanto, este heteromorfismo caracteriza um sistema cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW. Em uma população de *C. gomesi*, o mesmo sistema sexual foi encontrado (ZZ/ZW), sendo o cromossomo Z, um metacêntrico grande e o W, caracterizado como submetacêntrico pequeno. A maioria das espécies pertencentes ao gênero, não apresentam sistema cromossômico sexual. Este dado faz nos supor que *Characidium lanei* do Rio Ribeirão pode ter um cariótipo mais derivado do que as outras espécies deste gênero que possuem uma macroestrutura cariotípica mais uniforme entre machos e fêmeas.

A heterocromatina detectada pela técnica do bandamento C, corroborou com a identificação dos cromossomos relacionados com o sistema sexual. Enquanto o cromossomo Z apresenta apenas um bloco heterocromático na região proximal ao centrômero, o cromossomo W é completamente heterocromático (figura 5). Bandas C também foram visualizadas nas regiões centroméricas de alguns cromossomos, mas através de marcações pequenas e fracas. Tais marcas não foram observadas em todos os cromossomos, como descrito para as outras espécies de *Characidium*. Este fato pode estar relacionado a uma pequena quantidade de heterocromatina em *C. lanei* ou a qualidade do material submetido a esta técnica.

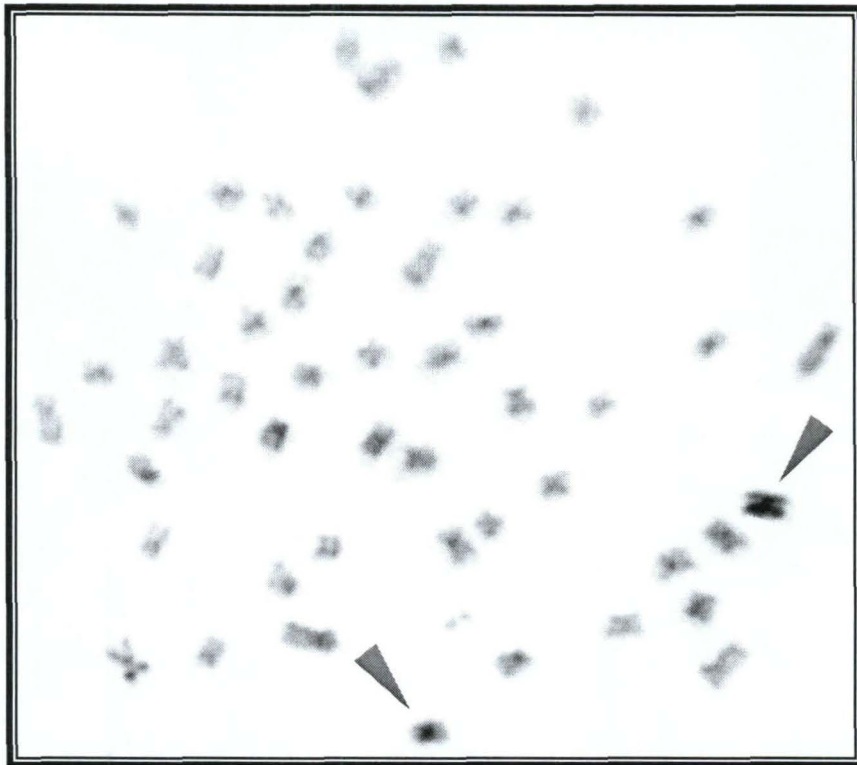


Figura 5 - Banda C de fêmea (nº 1196) de *Characidium lanei*, do Rio Ribeirão (Paranaguá-PR). As setas indicam o cromossomo W, (totalmente heterocromático) e o cromossomo Z.

A maioria dos estudos referentes a heteromorfismo cromossômico sexual demonstram que as mudanças ocorrem devido à presença de segmentos heterocromáticos (MAISTRO *et al.*, 1998). Em *C. fasciatum* (MAISTRO *et al.*, 1998) e em *C. gomesi* (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001), o cromossomo W também é encontrado totalmente heterocromático.

Aproximadamente 50% das ocorrências de cromossomos sexuais descritas para a ictiofauna tropical correspondem a fêmeas heterogaméticas (MOREIRA-FILHO, BERTOLLO & GALETTI JR, 1993; BERTOLLO *et al.*, 2000). Segundo CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO (2001), dois padrões básicos foram postulados para explicar a origem e a diferenciação de cromossomos sexuais. O primeiro propõe que a não ocorrência de permuta entre os homólogos durante a meiose, provavelmente ocorre devido aos rearranjos cromossômicos (BEÇAK & BEÇAK, 1969), e o segundo propõe que o estágio inicial de diferenciação sexual cromossômica pode ocorrer, independentemente dos rearranjos, iniciando-se a partir da origem e acumulação de algumas classes de DNA satélite em um dos homólogos do par ancestral, portanto, associado a heterocromatinização dos cromossomos (SINGH, PURDOM & JONES, 1980).

Em alguns peixes, a diferenciação dos cromossomos sexuais parece ser um fato relacionado a segmentos de heterocromatina exclusivos dos cromossomos Y ou W. Na maioria dos casos, uma heterocromatinização primária, parece ter sido seguida por um processo de acúmulo de heterocromatina, com o conseqüente aumento do tamanho dos cromossomos Y ou W em relação aos seus homólogos originais (X ou Z), como observado em *Characidium lanei*. Por outro lado, em várias espécies, este processo fora acompanhado pela redução no tamanho do cromossomo W, o qual é menor que Z (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001).

Entre os peixes neotropicais, diferentes tipos de sistemas sexuais podem ser encontrados. A diversidade destes sistemas indica origens distintas, da mesma forma, como podem ter surgido em diferentes épocas. Portanto, os diferentes

sistemas cromossômicos sexuais foram capazes de se fixar independentemente entre os membros de uma mesma família, ou até de um mesmo gênero provenientes de bacias diferentes, contribuindo para o processo de especiação (CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO, 2001).

A análise das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação de prata (Ag-NOR) demonstrou RONS simples, evidenciadas pela presença de um par de marcas em cada núcleo. As regiões organizadoras de nucléolo estão localizadas no par de cromossomos submetacêntricos, na porção terminal do braço curto (figura 6). Pela presença de uma marcação mais evidenciada em um dos cromossomos do par, acredita-se que possivelmente ocorra heteromorfismo de tamanho para esta espécie.

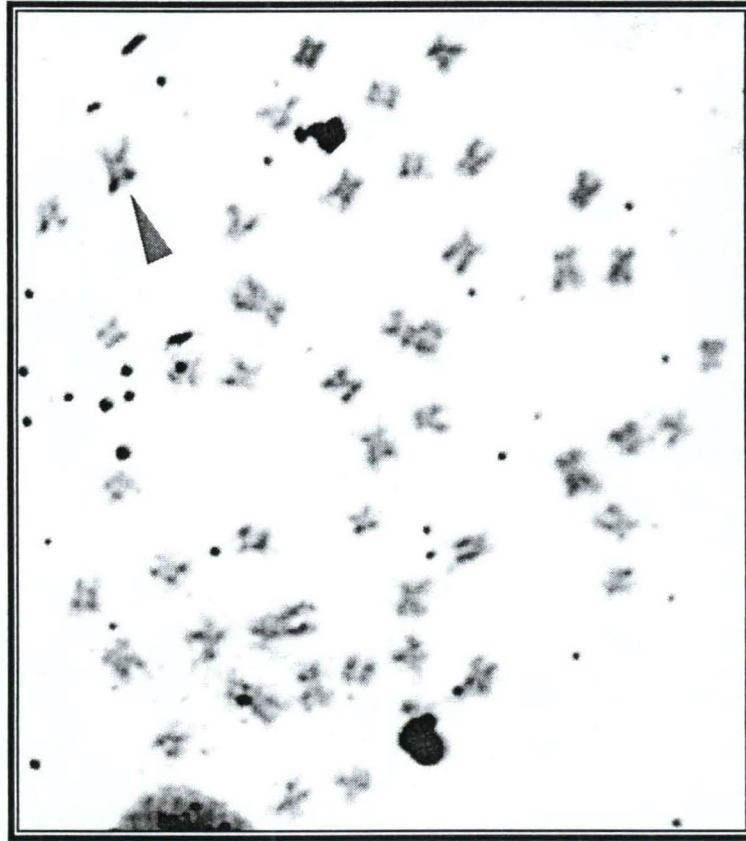


Figura 6 - Regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em macho (nº 1195) de *Characidium lanei*, do Rio Ribeirão (Paranaguá-PR). A seta indica um cromossomo com o braço curto marcado pelo AgNO₃.

Para a maioria das espécies do gênero *Characidium* analisadas, houve a impregnação da prata no par de submetacêntricos pequeno. Em *C. fasciatum*, foi citado a presença da marcação na posição terminal do braço longo do par de submetacêntricos grandes (MAISTRO *et al.*, 1998). Em um estudo realizado com duas populações de *C. zebra*, uma das populações apresentou apenas um par

submetacêntrico marcado, enquanto na outra foram identificados três pares cromossômicos (MIYAZAWA & GALETTI JR, 1994).

Poucas espécies de *Characidium* foram estudadas até agora. Entretanto, tais dados sugerem algumas tendências para este grupo. Enquanto, o número diplóide $2n=50$ e o Número Fundamental (NF = 100) tendem a ser mantidos, há uma diversidade complementar referente à distribuição das bandas-C, às regiões organizadoras de nucléolos e aos cromossomos sexuais.

Segundo CENTOFANTE, BERTOLLO & MOREIRA-FILHO (2001), a diversidade deste grupo de peixes deve ser analisado em um contexto geral maior, incluindo seu modo de vida, a origem da bacia hidrográfica, juntamente com os eventos geomorfológicos que ocorreram no continente sul-americano.

Vemos que com os dados obtidos no presente trabalho se torna necessário ampliarmos a amostra e utilizarmos técnicas mais elaboradas como fluorocromos base específicos e a enzima de restrição *AluI*. A primeira por detectar regiões ricas em CG e a segunda por mostrar a maioria dos peixes estudados até hoje um padrão compatível com o da banda C. Além disso, como era intuito do presente trabalho estudar a mesma espécie de outro rio, podemos ver que isto seria extremamente interessante para verificarmos, se apenas neste Rio ocorre a diferenciação cromossômica sexual ou se ela pode estar presente em outros Costeiros do Estado do Paraná.

5. CONCLUSÕES

- A espécie *Characidium lanei* apresentou um sistema cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW, onde o W se apresenta totalmente heterocromático.
- As Regiões Organizadoras de Nucléolos se apresentaram em apenas um par de cromossomos, o que corrobora com a maioria das espécies deste gênero.
- *Characidium lanei* do Rio Ribeirão mostrou uma macroestrutura cariotípica ($2n=50$ e $NF=100$) compatível com a maioria das espécies deste gênero.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANHA, J.M.R.; TAKEUTI, D.F.; YOSHIMURA, T.M. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Rev. Biol. Trop.**, v. 46, n. 4, p. 951-959, 1998.

ARANHA, J.M.R.; GOMES, J.H.C.; FOGAÇA, F.N.O. Feeding of two sympatric species of *Characidium*, *C. lanei* and *C. pterostictum* (Characidiinae) in a coastal stream of Atlantic Forest (Southern Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 527-531, 2000.

BEÇAK, W. & BEÇAK, M.L. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes. **Cytogenetics** 8: 247-262, 1969.

BERTOLLO, LCA; TAKAHASHI, CS; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic structure of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.**, 1: 17-37, 1979.

BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI, P.M.Jr. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish Biol.** 28: 153-159, 1986.

BERTOLLO, L.C.A. & CAVALLARO, Z.I. A highly differentiated ZZ/Zw sex chromosome system in Characidae fish, *Triporthus guentheri*. **Cytogenet. Cell. Genet.** 60: 60-63, 1992.

BERTOLLO, L.C.A.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S. & MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic

- distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research** 8: 603-613, 2000.
- BRUM, M.J.I. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. **Sociedade Brasileira de Genética - Série Monografia** 2: 5-42, 1995.
- BUCKUP, P.A. Review of characidiin fishes (Teleostei: Characiformes), with description of four new genera and ten new species. **Ichth. Explor. Freshw.**, 4 (2): 97-154, 1993.
- BUCKUP, P.A. & REIS, R.E. Characidiinae genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in Southern Brazil, with description of three new species. **Copeia** 1997 (3): 531-548, 1997.
- BUCKUP, P.A. & HAHN, L. *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. **Copeia** 2000 (1): 150-155, 2000.
- CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. **Genetics and Molecular Biology** 21(1), 1998.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative Cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 253-260, 2001.
- DOUCETTE JR., A.J. & FITZSIMONS, J.M. Karyotypic of Elopiform and Clupeiform Fishes. **Copeia** (1): 124-130, 1988.

- FEHLAUER, K.H. Estrutura da população e táticas reprodutivas de *Characidium lanei* no Rio Ribeirão (Paranaguá, Paraná, BR). Curitiba, 2002. 42 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*, v. 44, n. 2, p. 161-166, 1991.
- FISHBASE, 2001. Fishbase: A global information system on fishes. Disponível em: <http://www.fishbase.org>, acesso em março/2003.
- GALETTI JR., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Heteromorphic sex chromosome in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 29: 138-142, 1981.
- GALETTI, P.M. & FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationships in the phylogeny of the group. *Braz. J. Genet.* X (1): 135-140, 1987.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- LEMOS, P.M.M.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; CESTARI, M.M. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguazu River basin (Paraná State, Brazil). *Caryologia* 55(3): 193-198, 2002.

- LEVAN, A.; FREGDA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 210-220, 1964.
- MAACK, R. *Geografia Física do estado do Paraná*. 2ª ed, Rio de Janeiro: J. Olimpio, 1981. 450 p.
- 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.
- MALABARBA, R.E.R.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. x, 603p.
- MAZZONI, R.; CARAMACHI, E.P. & FENERICH-VERANI, N. Reproductive Biology of a Characidiinae (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá - RJ. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62 (3): 487-494, 2002.
- MIYAZAWA, C.S. *Estudo cariotípico comparativo de espécies e populações distintas do gênero Characidium (Characidiinae, Characidae). Considerações citotaxonômicas e evolutivas*. São Carlos, 1991. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.
- MIYAZAWA, C.S.; GALETTI JR, P.M. First cytogenetically studies in *Characidium* Species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Citologia*, v. 59, p. 73-79, 1994.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 4, p. 1085-1090, 1991.

MOREIRA-FILHO, P.; 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** 46 (2-3): 115-125, 1993.

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

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Rev. Brasil. Genet.** 11 (3): 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, 1996, São Carlos. **Resumos**. São Carlos, 1996. p. 104.

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

PHILLIPS, R. B. & IHSEN, P.E. Identification of Sex Chromosome in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenet. Cell. Genet.** 39: 14-18, 1985.

RAB, P. Karyotype of the Danube Goby, *Proterorhinus marmoratus* (Pisces, Gobiidae). **Folia Zoológica** 34 (4): 329-334, 1985.

RISHI, K.K. Somatic G-banded chromosomes of *Colisa fasciatus* (Perciformes, Belontiidae) and confirmation of female heterogamety. *Copeia* 1: 146-149, 1979.

SILVA, D. da; FROELHICH, O.; INOCENCIO, L.S.; CAVALLARO, M. Uso do espaço por *Characidium* sp.1 (Characiformes, Crenuchidae) em relação ao tipo de substrato na Serra da Bodoquena - MS. In: 24º CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 1 f., 2002, Itajaí. Livro de Resumos (nº 12167). Itajaí: Univali - CTTMar, 2002. p. 327.

SINGH, L.; PURDOM, I.F. & JONES, K.W. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma* 79: 137-157, 1980.

SOLA, L.; CATAUDELLA, S. & CAPANNA, E. New developments in vertebrate cytotaxonomy: III. Karyology of bony fishes. *Genetica* 54: 285-328, 1981.

SOLA, L.; MONACO, P.J. & RASHI, E.M. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I C-bands, Ag-Nor polymorphisms, and sex chromosome in three populations of *Poecilia latipinna*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 53: 148-154, 1990.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, v. 74, p. 304-306, 1972.

VENERE, P.C.; GALETTI JR, P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Brazil. J. Genet.* 12: 17-25, 1989.

VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.S.; GALETTI JR, P.M. New cases of supernumerary chromosomes in Characiformes fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 345-349, 1999.