

PIERRE RAFAEL PENTEADO

DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR NO GÊNERO *Astyanax*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

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

T

P419d Penteadó, Pierre Rafael, 1984-
2011 Diversidade cromossômica e molecular no gênero *Astyanax*
(Characiformes: Characidae) / Pierre Rafael Penteadó. –
Viçosa, MG, 2011.
xi, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Rubens Pazza.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 47-58

1. Peixe - Filogenia. 2. Citogenética. 3. Marcadores
genéticos. 4. *Astyanax*. 5. Peixe - Brasil, Sudeste.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

PIERRE RAFAEL PENTEADO

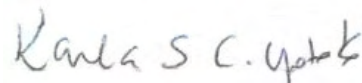
Diversidade cromossômica e molecular no gênero *Astyanax*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

Dissertação apresentada a
Universidade Federal Viçosa, como
parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Animal, para obtenção do Título de
Magister Scientiae.

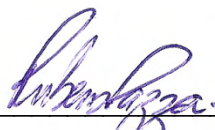
Aprovado: 31 de maio de 2011



Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Co-orientador)



Prof.^a. Karla Suemy Clemente Yotoko



Prof. Rubens Pazza
(Orientador)

*"Em algum lugar,
algo incrível está esperando
para ser descoberto."*

Carl Sagan

À minha mãe, Maria, pelo amor e por me ensinar desde cedo que o estudo rende os melhores frutos;

Meu irmão, Patrick, pela paciência durante minha infância que se transformou em companheirismo e em uma amizade sólida;

Meu pai, Dirceu, um grande responsável por eu gostar do campo e do mato.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho;

Ao REUNI/CAPES, pela bolsa concedida durante o segundo ano do mestrado;

Ao meu orientador, Rubens Pazza, por me apresentar à citogenética de peixes, ofertar um estágio e me orientar à distância durante a graduação, por me incentivar a vir para Minas Gerais para o mestrado, por todo o auxílio em Rio Paranaíba, pela paciência e pela amizade durante todos esses anos.

À minha co-orientadora, Karine Kavalco, por também me incentivar aos estudos com peixes, por disponibilizar seus materiais e dados prévios para essa dissertação, pelo auxílio, amizade e também pela incrível disposição de sempre ter uma piadinha sobre minha pessoa;

À minha mãe, pelo amor, carinho, auxílio e compreensão; meu irmão, pela amizade e companheirismo; à meu pai, que a seu modo, me deu todo o apoio possível; e à minha irmã;

Ao professor Jorge Abdala Dergam, pela coleta do material de Pandeiros, pelo suporte de seu laboratório e por sempre manter abertas as portas do Beagle;

À professora Karla Yotoko, pela participação na banca;

A todo o pessoal do LAGEEvo, pelo bom ambiente de trabalho e por todo auxílio que precisei: Dênis, Dinaíza, Rodrigo, Sabrina, Pallomah, Ana Laura, Cibele, André (parceiro do Rock com Ciência) e calouros.

Ao Adnilson, da administração do Programa da Pós-Graduação em Biologia Animal, pela prontidão em seu atendimento;

Ao pessoal do Beagle: Udson, pelo companheirismo e pela coleta do material em Pandeiros; Fred e Wagner, grandes amigos e parceiros de trabalho.

A meus amigos de Guarapuava - PR, por apoiarem a minha vinda para MG, por sempre serem grandes companheiros e também por *não* perguntar como vai a minha dissertação: Marcos, Gilson, Diego, Roberto, Bárbara, Kelin, Natália, Rodrigo, Elcio, Beto...

A meus tios e tias, por sempre me acolher com carinho, em especial tia Maria Lúcia, tio Elcio e tio Beto.

À minha namorada, querida Janaína, por saber lidar com meu mau humor na reta final do mestrado;

Às amigas Ana Bárbara e Leoni, pelo apoio e auxílio à minha mudança para MG;

Às repúblicas pelas quais passei: pessoal da “Largados”, que me além do período de convivência, me acolheu inúmeras vezes em minhas passagens por Viçosa: Diego, Bruno, Márcio, Bárbara, Dudu, Wagner, Patrícia, Christian. Pessoal do “Cafofo do Ozama”, pela breve estadia: Fred, Sebastião, Hilton, Lucas. Pessoal da república em Rio Paranaíba, no “Maleta”: Bráulio, Tchóla, Xucruts e Taiada.

Ao pessoal do Museu de Zoologia João Moojen, colegas e professores, pelo ótimo ambiente de aprendizado, que eventualmente também se transforma num ambiente bacana de churrascos.

BIOGRAFIA

Pierre Rafael Penteado, filho de Dirceu Moreira Penteado e Maria de Fátima Polli Penteado, nasceu em 06 de março de 1984, em Guarapuava, no Estado do Paraná. Residente na mesma cidade, concluiu o ensino Fundamental em 1998 e Ensino Médio em 2001, ambos no Colégio Estadual Padre Chagas.

Em 2003 iniciou a graduação em Geografia da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, mas completou apenas um ano.

Em 2004, ingressou no curso de Ciências Biológicas da mesma universidade, no qual graduou-se em dezembro de 2007.

Em agosto de 2008 ingressou no programa de pós-graduação em Biologia Animal, nível Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
Introdução Geral.....	x
Justificativa.....	5
Objetivos Gerais.....	7
Objetivos específicos	7
Material e Métodos.....	8
Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva	9
Extração de DNA	9
Reações de PCR	9
Microssatélites	9
DNA mitocondrial – ATPase 6/8	9
Análise dos dados.....	10
Hibridação Fluorescente in situ - FISH.....	9
Resultados	11
Diversidade citogenética de espécies alopátricas do gênero <i>Astyanax</i>	12
Amplificação cruzada de seis loci microssatélites isolados de <i>Astyanax</i> <i>mexicanus</i> para espécies do gênero com distribuição Sul-americana.....	26
Relações evolutivas entre espécies do gênero <i>Astyanax</i> de bacias costeiras brasileiras.....	34
Referências	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Espécies de <i>Astyanax</i> em drenagens costeiras. Árvore de MP consenso, Clado3	6
Figura 2.1 – Locais de coleta das populações estudadas: a) Rio Pandeiros b) Rio Ariró	16
Figura 2.2 a) Cariótipo de <i>Astyanax</i> aff. <i>hastatus</i> b) Heterocromatina constitutiva.....	18
Figura 2.3. Cariótipo de <i>A. aff. hastatus</i> com sítios de rDNA 18S.....	18
Figura 2.4 . Cariótipos <i>A. aff. hastatus</i> , localização do gene 5S.	18
Figura 2.5 a) Cariótipo em giemsa de <i>A. aff. fasciatus</i> . b) Heterocromatina constitutiva.....	19
Figura 2.6. FISH em <i>A. aff. fasciatus</i> a) Sítios de rDNA 5S. b) Sítios de rDNA 18S.....	19
Figura 3.1 - Pontos de coleta do material analisado.	30
Figura 4.1 – Dendrograma obtido através de Máxima Verossimilhança, pelo modelo de TAMURA & NEI (1993).....	40
Figura 4.2 – Rede de haplótipos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Locais de coleta das populações testadas.	30
Tabela 3.2 - Transferibilidade dos loci de microssatélites em 5 espécies do gênero <i>Astyanax</i>	31
Tabela 4.1 – Local de coleta das espécies/populações estudadas.....	38
Tabela 4.2 - Distâncias genéticas entre haplótipos do gênero <i>Astyanax</i> de distribuição costeira estimadas para cada população amostrada.....	39

RESUMO

PENTEADO, Pierre, Rafael, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Diversidade cromossômica e molecular no gênero *Astyanax* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)**. Orientador: Rubens Pazza. Co-orientadores: Karine Frehner Kavalco e Jorge Abdala Dergam dos Santos

A origem do gênero *Astyanax*, um dos gêneros mais especiosos da família Characidae é apontada como polifilética, sendo seu atual status taxonômico *Incertae sedis*. Esforços de diversas áreas, como morfologia, genética e filogeografia procuram contribuir com o conhecimento no gênero, que é considerado modelo biológico. Neste trabalho, várias espécies de localidades distintas são estudadas através de diferentes abordagens. Populações dos complexos de espécies *A. aff. fasciatus* (bacia do rio São Francisco) e *A. aff. hastatus* (sistema de drenagens costeiras, Atlântico sudeste) são investigados com o uso de citogenética convencional e molecular. Um novo citótipo com algumas características compartilhadas com bacias circunvizinhas é descrito para a população de *A. aff. fasciatus* da Bacia de São Francisco. No desenvolvimento de novas ferramentas para futuros estudos, seis *primers* de microssatélites, um marcador molecular bastante informativo, previamente isolado a partir de *Astyanax mexicanus*, foram testados em cinco espécies, distribuídas no sistema de drenagens costeiras do Oceano Atlântico. Um primer não amplificou através de reação de PCR, e pelo menos um *primer* se mostrou polimórfico para todas as espécies testadas. Uma população de *A. aff. hastatus* coletada em Angra dos Reis foi estudada citogeneticamente teve o fragmento de mtDNA do gene ATPase 6/8 sequenciado. Seus haplótipos foram incluídos em uma árvore filogenética com outras espécies de distribuição costeira. Os dados obtidos reforçam a hipótese de que esta população é na realidade é uma espécie distinta.

ABSTRACT

PENTEADO, Pierre, Rafael, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2011. **Chromosomal and molecular diversity in the genus *Astyanax* (Characiformes: Characidae)**. Advisor: Rubens Pazza. Co-Advisors: Karine Frehner Kavalco and Jorge Abdala Dergam dos Santos

The origin of the genus *Astyanax*, one of the most specious genera of the family Characidae is appointed as polyphyletic, with its current taxonomic status *Incertae sedis*. Morphologic, genetic and phylogeographic studies contribute to a better knowledge on the genus, which is considered a model. In this work, several species of different locations were studied using different approaches. Populations of the species complex *A. aff. fasciatus* (São Francisco River Basin) and *A. aff. hastatus* (Coastal streams, Atlantic southeast) were investigated with the use of classic and molecular cytogenetics. A new cytotype with some shared features with the surrounding basins is described for the population of *A. aff. fasciatus* from San Francisco Basin. Six SSR primers, a very informative molecular marker, previously isolated from *Astyanax mexicanus*, were tested in five species distributed in the system of coastal drainages of the Atlantic Ocean. No amplification was achieved with one primer, while at least one primer was polymorphic in all species. Finally, the same population of *A. aff. hastatus* cytogenetically studied, collected in Angra dos Reis had the gene fragment of mtDNA ATPase 6 / 8 sequenced and included in a phylogenetic tree previously proposed for other coastal species population. Our data supports the hypothesis previously proposed that this population is actually a distinct species.

INTRODUÇÃO GERAL

Ictiofauna Neotropical e grupo taxonômico de estudo

A ictiofauna neotropical é extremamente diversa, compreendendo cerca de 6000 das 13000 espécies de água doce no mundo (REIS *et al.* 2003). No Brasil, 2587 espécies de peixes pertencem a 39 famílias e 517 gêneros que ocorrem exclusivamente em ambientes de água doce. Entre os peixes teleósteos, o clado chamado superordem Ostariophysi compreende cinco ordens (Gonorynchiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes) (JAVONILLO *et al.*,2009).

Characidae é a família de Characiformes com o maior número de espécies, e sua distribuição que se estende do sul dos Estados Unidos da América passando pela América Central até América do Sul. Segundo ESCHMEYER &FONG (2009), a família compreende mais de 1100 espécies, sendo que destas mais de 240 foram descritas na última década, e conta com uma vasta diversidade de formas corporais, tamanhos mínimo e máximo na maturidade e nichos ecológicos (WEITZMAN &MALABARBA, 1998). Popularmente, as espécies da família são conhecidas como lambaris, piabas, piranhas, pacus, dourados, tabaranas, matrinchãs, piabanhas, pirapitingas, piraputangas, piraicanjubas e peixes-cachorro. Desde a classificação do trabalho de sistemática original de LINNAEUS em 1758, algumas espécies pertencentes à família passaram por revisões taxonômicas, como por exemplo *Astyanax bimaculatus* e *Charax gibbosus*, originalmente inseridas no gênero *Salmo*(JAVONILLO *et al.*,2009). A revisão realizada por WEITZMAN

&MALABARBA (1998), aponta a origem polifilética para alguns grupos anteriormente válidos, como a subfamília Tetragonopterinae, no qual o gênero *Astyanax* estava tradicionalmente inserido.

Por sua vez, o gênero *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854, consiste de pequenos peixes, popularmente conhecidos como lambaris ou piabas. As características morfológicas que distinguem o gênero na família são: duas séries de dentes multicuspidados na pré-maxila, sendo a fileira interna consistindo de cinco dentes, pré-maxilar não protrátil, linha lateral completa e nadadeira caudal não coberta por escamas, nadadeira adiposa geralmente presente e altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão (BRITSKI *et al.*, 1988). As espécies não são migradoras, possuem fecundação externa e ausência de cuidado parental (VAZZOLER e MENEZES, 1992).

O gênero tem ampla distribuição, desde a região da Patagônia, no norte da Argentina, até o estado do Texas, no sul dos Estados Unidos da América (EIGENMANN, 1921). Esta vasta distribuição provavelmente deve-se a sua grande capacidade se ajustar as condições ambientais diferenciadas e também ao amplo espectro de interação nas assembléias de peixes (ORSI *et al.*, 2004). A revisão mais recente do gênero aponta 90 espécies consideradas válidas atualmente (LIMA *et al.*, 2003). Entretanto, esse número está subestimado, uma vez que várias novas espécies têm sido descritas (GARUTTI & VENERE, 2009; BERTACO & LUCINDA, 2005; VARI & CASTRO, 2007; HALUCH & ABILHOA, 2005, entre outros) seja por constituírem táxons ainda desconhecidos ou por fazerem parte de grupos maiores, mas com diferenciação morfológica, e que têm passado por revisões taxonômicas. *A. altiparanae*, por

exemplo, é uma designação recente dada às populações do Alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

GARUTTI (1995) afirma que o gênero *Astyanax* tem uma distribuição estruturada, sugerindo um grande nível de endemismo: mesmo dentro de uma mesma bacia hidrográfica há múltiplas formas com distribuição geográfica relativamente restrita, embora seja mais bem sucedido em habitats mais preservados (ORSI *et al.*, 2004). De fato, observa-se que populações deste gênero apresentem estruturação genética ao longo de um rio (LEUZZI *et al.*, 2004; PAIVA *et al.*, 2006; PAMPONET *et al.*, 2008), embora em estudos anteriores tenham observado baixa variabilidade entre populações dos rios Paraná e Iguazu, caso em que os autores sugerem que devam mantidas sob uma mesma denominação específica (PRIOLI *et al.*, 2002).

Marcadores Citogenéticos

O número diplóide no gênero *Astyanax* vai de $2n=36$ a $2n=50$ cromossomos, e a grande variabilidade cariotípica observada torna difíceis quaisquer inferências sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo nas espécies com alto grau de polimorfismos (PAZZA e KAVALCO, 2007). No gênero *Astyanax* são observados complexos de espécies, onde tanto os números diplóides quanto as fórmulas cariotípicas são variáveis, relativos a pelo menos três grupos: *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991); *A. fasciatus* (JUSTI, 1993; PAZZA *et al.*, 2006) e *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). Nos complexos de espécies *A.*

scabripinnis e *A. fasciatus* é observado alto grau de variabilidade citogenética, envolvendo aspectos como suas macroestruturas cariotípicas, números diplóides, presença de cromossomos supranumerários ou Bs e polimorfismos de blocos heterocromáticos e das regiões organizadoras nucleolares (RONS) (KAVALCO, 2008), assim como triploidias (PAZZA e KAVALCO, 2007).

Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são proteínas ou seqüência de DNA polimórficos que podem ser usados como indicadores de variação do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os microssatélites (SSR ou STR) consistem de pequenas seqüência de 1 a 4 nucleotídeos repetidos em *tandem*. São marcadores codominantes e altamente polimórficos (ELLEGREN, 2004), que apresentam como aspecto limitante a grande quantidade de trabalho necessária para o desenvolvimento prévio dos marcadores (CHISTIAKOV, *et al.*, 2006). Por esse motivo, pode-se tirar proveito de loci de microssatélites previamente isolados em uma espécie, e usá-los em outro táxon proximoamente relacionado. A amplificação cruzada de SSRs possibilita sobrepor a informação genética de uma espécie para outra e conseqüentemente o uso desses marcadores para genética de populações, análise de parentesco e outras aplicações sem a necessidade de investimento no isolamento de microssatélites polimórficos (CAIRNEY *et al.* 2000).

Justificativa

A bacia hidrográfica do rio São Francisco é uma das mais importantes do país, primariamente pela sua extensão e riqueza de ictiofauna. Apesar da relevância dessa bacia hidrográfica, estudos citogenéticos no complexo de espécies *Astyanax aff. fasciatus*, distribuída por toda a sua extensão, são escassos. A literatura apresenta dois citótipos, de estudos distintos, ambos realizados na década de 90 (JUSTI, 1993; HERAS, 1998). Porém, estes estudos não incluíram análises de citogenética molecular.

As características físicas da costa sudeste brasileira podem ter ajudado na fixação das características genéticas observadas nos lambaris que habitam a região. Estudos recentes de utilizando seqüenciamento de DNA demonstram que esta abordagem pode ser especialmente relevante para a compreensão da evolução das espécies que ocorrem nessa região. Assim, KAVALCO (2008), usando a região mitocondrial da ATPase 6/8, obteve uma árvore evolutiva que indica que algumas espécies de *Astyanax* precisam passar por estudos mais refinados para que possamos compreender melhor as suas relações evolutivas (Figura 1.1). Situações de polifilia entre diferentes citótipos de *A. hastatus* indicam que seqüências de outros genes mitocondriais e outros marcadores de DNA nuclear, como os microssatélites (amplamente empregados em estudos filogeográficos), precisam ser empregados para a obtenção de dados mais robustos sobre a historia natural do grupo.

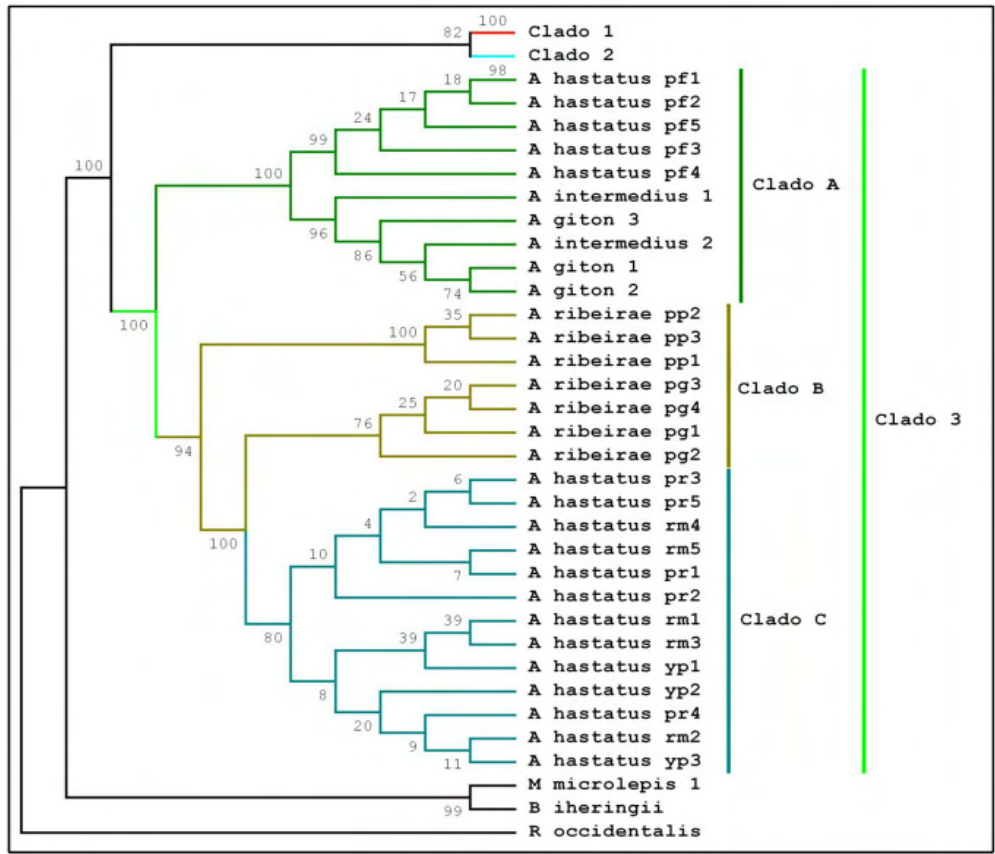


Figura 1.1 - Espécies de *Astyanax* em drenagens costeiras. Árvore de MP consenso, Clado3 KAVALCO *et al.* (2008)

Objetivos Gerais

Contribuir com o conhecimento da diversidade genética de populações de peixes pertencentes ao gênero *Astyanax*, procedente de diferentes bacias hidrográficas, através de metodologias citogenéticas e moleculares.

Objetivos específicos

- Realizar estudos citogenéticos das espécies de *A. aff hastatus* e *A. aff fasciatus* coletadas no sistema de bacias dos rios costeiros e bacia do Rio São Francisco, respectivamente;
- Testar e padronizar reações de PCR de loci de microssatélites previamente isolados de *Astyanax mexicanus* em amplificações cruzadas em outras espécies do gênero distribuídas em bacias brasileiras;
- Sequenciar o fragmento mitocondrial ATPase6/8 de uma população de *A. hastatus* proveniente de Angra dos Reis e analisar seu parentesco filogenético em relação a outras populações.

Material e Métodos

Seis exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* provenientes do rio Pandeiros, bacia do rio São Francisco no município de Januária – MG, e 6 indivíduos de *Astyanax aff. hastatus* provenientes do rio Ariró, bacia dos rios costeiros, no município de Angra dos Reis – RJ foram coletados utilizando-se tarrafas e anzóis. Após a captura foram levados ao laboratório onde permaneceram em aquários aerados e com alimentação disponível até o momento de estudo, quando foram anestesiados e dissecados para a obtenção dos cromossomos mitóticos (para a análise citogenética) e extração de DNA (para as análises moleculares). Todos os exemplares foram enumerados, fixados em formol 10%, lavados e transferidos para etanol 70%. Alguns exemplares foram enviados para identificação por especialistas e depósito em Museu de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A obtenção de cromossomos a partir da porção anterior do rim foi realizada de acordo com BERTOLLO *et al.* (1978), pela técnica de *air drying*, que consiste no tratamento com colchicina, hipotonização e fixação de células em divisão celular e posterior armazenamento em freezer (-20°C). Gotas da suspensão celular foram pingadas em lâminas de vidro e observadas em microscópio óptico de luz após coloração com Giemsa. As melhores metáfases foram capturadas em um microscópio óptico Olympus BX 41®, através do sistema QColor 3®, também da Olympus, e o cariótipo foi montado de acordo com o tamanho e tipo cromossômico segundo LEVAN *et al.* (1964).

As seguintes metodologias foram seguidas para a execução do trabalho:

Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva foi realizada segundo de acordo com SUMNER, 1972.

Hibridação Fluorescente *in situ* - *FISH* realizada de acordo com PINKEL *et al.*, (1986), com modificações baseadas em PAZZA *et al.*, (2006).

As sondas disponíveis (rDNA 18S e rDNA 5S) foram marcadas fluorescentemente com uridina biotilada (BdUTP) segundo o protocolo do Kit de Nick Translation Bionick Labeling System, da Invitrogen®.

O DNA genômico foi extraído com kit de extração de DNA INVITEK® de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas num termociclador Palm Cycler (CorbettR), de acordo com o marcador molecular desejado:

Microsatélites:

Foram usados primers para seis loci de microsatélites previamente isolados de *Astyanax mexicanus* (STRECKER, 2003)

DNA mitocondrial – ATPase 6/8:

O segmento ATPase 6/8 foi amplificado usando os primers ATP 8.2_L8331 (5' AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC) e CO3.2_H9236 (5' GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC) (SIVASUNDAR, 2001).

Análise dos dados

Após checagem da amplificação via gel de agarose 1%, o produto de reação foi encaminhado para serviço de purificação e seqüenciamento. As seqüências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o software MEGA 5 (TAMURA *et al.* 2011), e verificadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa "Blastn", com o objetivo de confirmar sua similaridade com seqüência mitocondriais de outros peixes. Em seguida, as seqüências de DNA foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (Thompson *et al.*, 1994), pelo software Mega 5 (TAMURA *et al.*, 2011) utilizando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos para abertura de *gaps* (20) e extensão de *gaps* (6,66).

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA 5, utilizando-se

Para o estabelecimento de comparações com a literatura foi estimada distancia p , utilizando-se para tal o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.* 2011), e para construção de rede de haplótipos foi usado o software TCS 1.21, (CLEMENT *et al.*, 2000), sendo o limite de conexões calculado em 95%

Resultados

Os resultados são apresentados em três capítulos:

Capítulo 1 – Diversidade citogenética de espécies alopátricas do gênero *Astyanax*

Capítulo 2 – Amplificação cruzada de seis *loci* microssatélites isolados de *Astyanax Mexicanus* para espécies do gênero com distribuição Sul-Americana

Capítulo 3 - Relações evolutivas entre espécies do gênero *Astyanax* de bacias costeiras brasileiras

Diversidade citogenética de espécies alopátricas do gênero *Astyanax*

Cytogenetic diversity of allopatric species of genus *Astyanax*

Pierre Rafael Penteado, Karine Frehner Kavalco e Rubens Pazza

Resumo

Astyanax é um dos gêneros mais amplamente distribuídos ao longo da região Neotropical, devido a sua estrutura e densidade populacional. Essas características fazem o gênero ser extremamente especioso, contando com mais de cem espécies descritas atualmente. O objetivo do presente trabalho é auxiliar no levantamento da diversidade genética no gênero, analisando 2 populações de diferentes espécies (*Astyanax* aff. *hastatus*, *Astyanax* aff. *fasciatus*), encontradas nas bacias de rios costeiros, Bacia do Rio São Francisco, respectivamente. As análises citogenéticas constituem de cariotipagem convencional, detecção de heterocromatina constitutiva e localização de genes ribossômicos 5S e 18S. *Astyanax* aff. *hastatus* apresentou $2n=50$ (6M+8SM+4+32A), heterocromatina escassa distribuída em regiões pericentroméricas de poucos cromossomos. Hibridização *in situ* revelou que rDNA 18S está distribuído em regiões pericentroméricas de seis cromossomos acrocêntricos e em região intersticial em um par de cromossomos submetacêntricos. Em relação aos sítios de rDNA 5S, foram encontrados em dois cromossomos submetacêntricos, e em quatro cromossomos acrocêntricos. Adicionalmente, também foi verificando hibridização bitelomérica em um par de cromossomos acrocêntricos. *Astyanax* aff. *fasciatus* apresentou

$2n=48$ (8M+22SM+12ST+6A), heterocromatina também distribuída em regiões pericentroméricas de poucos cromossomos. A FISH evidenciou sítios de rDNA 5S intersticiais em um par de cromossomos metacêntricos e na região pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos. A situação taxonômica dos diferentes complexos de espécies é discutida.

Abstract

Astyanax is one of the genus most widely distributed throughout the Neotropical region, due to its structure and population density. These features make the genus is extremely specious, with over one hundred species currently described. The objective of this work is to assist in the survey of genetic diversity in the genre, analyzing two populations of different species (*Astyanax* aff. *hastatus*, *Astyanax* aff. *fasciatus*), found in Coastal River basins, São Francisco River Basin, respectively. Cytogenetic analysis constitute of conventional karyotyping, detection of constitutive heterochromatin and the location of ribosomal genes 5S and 18S. *Astyanax* aff. *hastatus* showed $2n = 50$ (6M +8 +4 SM +32 A), sparse heterochromatin distributed in pericentromeric regions of a few chromosomes. In situ hybridization revealed that 18S rDNA is distributed in the pericentromeric regions of acrocentric chromosomes and in six interstitial region in a pair of submetacentric chromosomes. For sites of 5S rDNA were found in two submetacentric chromosomes, and four acrocentric chromosomes. Additionally, bitelomeric hybridization has also been verified in a pair of acrocentric chromosomes. *Astyanax* aff. *fasciatus* showed $2n = 48$ (8M +22 SM +12 ST +6 A), heterochromatin distributed in pericentromeric regions of few

chromosomes. In situ hybridization showed interstitial 5S rDNA sites in a pair of metacentric chromosomes and the pericentromeric region of one pair of acrocentric chromosomes. The taxonomic status of the both complex species is discussed.

Introdução

O gênero *Astyanax* tem ampla distribuição na região neotropical (EIGENMANN, 1921), e a revisão mais recente do gênero aponta 90 espécies consideradas válidas atualmente (LIMA *et al.*, 2003). Entretanto, esse número está subestimado, uma vez que várias novas espécies têm sido descritas (GARUTTI & VENERE, 2009; BERTACO & LUCINDA, 2005; VARI & CASTRO, 2007; HALUCH & ABILHOA, 2005, entre outros) seja por constituírem táxons ainda desconhecidos ou por fazerem parte de grupos maiores, mas com diferenciação morfológica, e que têm passado por revisões taxonômicas (KAVALCO *et al.*, 2011). O número diplóide no gênero *Astyanax* vai de $2n=36$ a $2n=50$ cromossomos, e a grande variabilidade cariotípica observada torna difíceis quaisquer inferências sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo nas espécies com alto grau de polimorfismos (PAZZA e KAVALCO, 2007). Ainda no mesmo gênero são observados complexos de espécies, onde tanto números diplóides quanto fórmulas cariotípicas são variáveis, relativos a pelo menos três grupos: *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991); *A. fasciatus* (JUSTI, 1993; PAZZA *et al.*, 2006) e *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). Nos “complexos” *A. scabripinnis*

e *A. fasciatus* é observado alto grau de variabilidade, sobretudo no tocante às suas macroestruturas cariotípicas, números diplóides, presença de cromossomos supranumerários ou Bs e polimorfismos de blocos heterocromáticos e das regiões organizadoras nucleolares (RONs) (KAVALCO, 2008). Outro grupo numa situação taxonômica semelhante e recém proposto é *A. hastatus*, formado por distintas espécies crípticas, “uma vez que é possível identificar diferenças em cada citótipo e limites biológicos entre os exemplares, pela ausência de hibridismo detectado pelos marcadores citogenéticos empregados” (KAVALCO *et al*, 2009).

No presente estudo, realizamos análises citogenéticas de duas “espécies”, provenientes de 2 bacias hidrográficas, a fim de contribuir com a compreensão da evolução cariotípica no grupo.

Material e Métodos

A população de *A. aff. hastatus* foi coletada Rio Ariró, Bacia dos Rios Costeiros, município de Angra dos Reis -RJ. *A. aff. fasciatus* foi coletado no Rio Pandeiros, Bacia do Rio São Francisco, no município de Januária – MG (Figura 2.1). Para as preparações citogenéticas foi utilizada a metodologia de GOLD *et al.* (1990). Para determinação do número e morfologia dos cromossomos foi utilizada a coloração convencional por Giemsa, com análise em microscópio óptico, separando cromossomos em grupos de acordo com a razão de braços proposta por LEVAN *et al.* (1964). A caracterização das heterocromatinas foi feita pelo bandamento C (SUMNER, 1972). A identificação dos loci de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI JR., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI Jr., 1999)

e de DNA repetitivo As-51, isolado a partir de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000), foi realizada através do protocolo de FISH modificado segundo PAZZA *et al.* (2006).

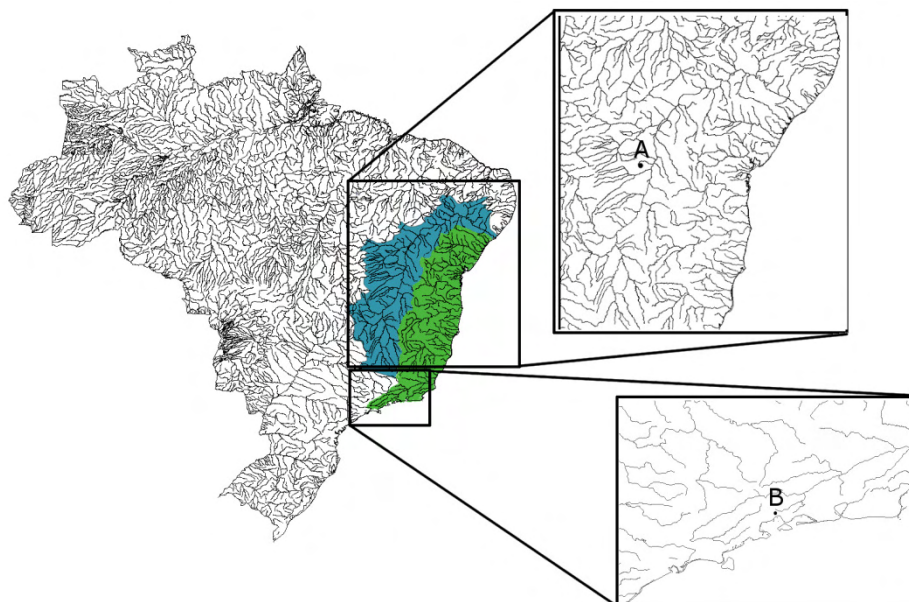


Figura 2.1 – Locais de coleta das populações estudadas: a) Rio Pandeiros b) Rio Ariró

Resultados

A. aff. hastatus

A análise da população de *Astyanax aff. hastatus* evidenciou $2n = 50$, com fórmula cariotípica igual a $6M+8SM+4ST+32A$) e número fundamental (NF) igual a 68 (Figura 2.2a). A técnica de banda-C revelou pequenas marcações, principalmente em regiões pericentroméricas de vários cromossomos (Figura 2.2b). Em relação ao rDNA 18S, foram obtidas marcações pericentroméricas nos pares nº 12, 15 e 23 de cromossomos acrocêntricos; no par nº 7 de cromossomos submetacêntricos, foi observada marcações instersticiais (Figura

2.3). Múltiplos sítios de rDNA 5S foram encontrados: no braço menor do cromossomo nº 9, e em regiões pericentroméricas dos pares de cromossomos acrocêntricos 11 e 15. Adicionalmente, também foi verificando hibridização bitelomérica no par de cromossomos acrocêntricos nº13 (Figura 2.4).

A. aff. fasciatus

O número diplóide encontrado foi de 48 cromossomos (8M+22SM+12ST+6A), com NF= 90 (Figura 2.5a). A heterocromatina encontrou-se distribuída principalmente em regiões pericentroméricas de poucos cromossomos, bem como em regiões subteloiméricas de um par de subteloimétricos, provavelmente associado com as Ag-RONs (Figura 2.5b). A FISH evidenciou sítios de rDNA 5S intersticiais em um par de cromossomos metacêntricos e na região pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos (Figura 2.6a). Sítios de rDNA 18S foram encontrados em apenas um par de cromossomos subteloimétricos, no braço menor (Figura 2.6b).

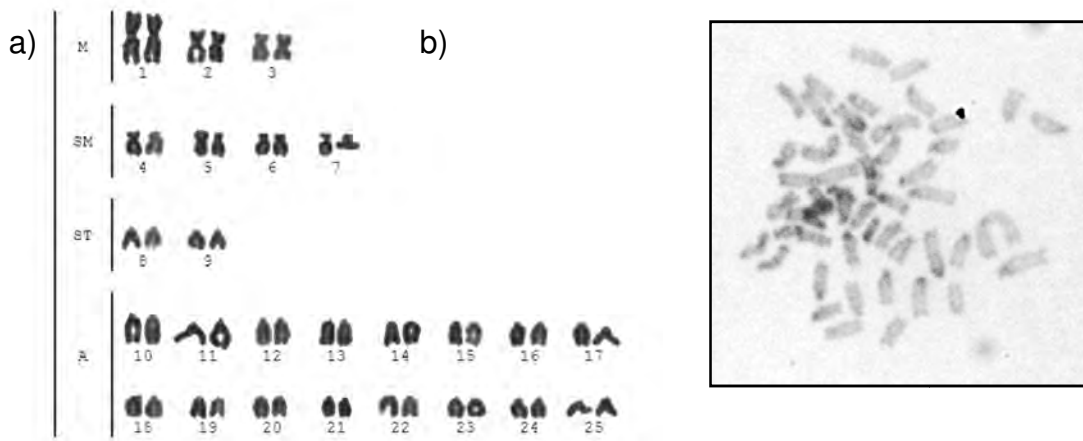


Figura 2.2 a) Cariótipo de *Astyanax aff. hastatus* b) Heterocromatina constitutiva

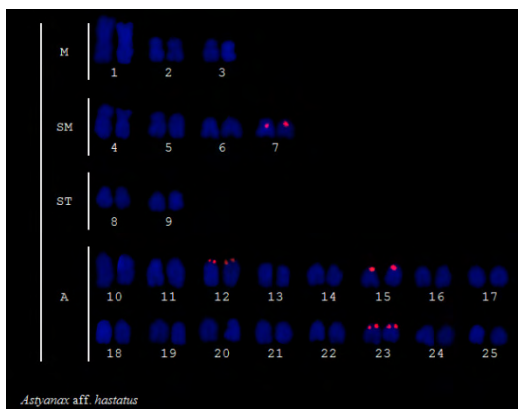


Figura 2.3. Cariótipo de *A. aff. hastatus*, evidenciando sítios de rDNA 18S.

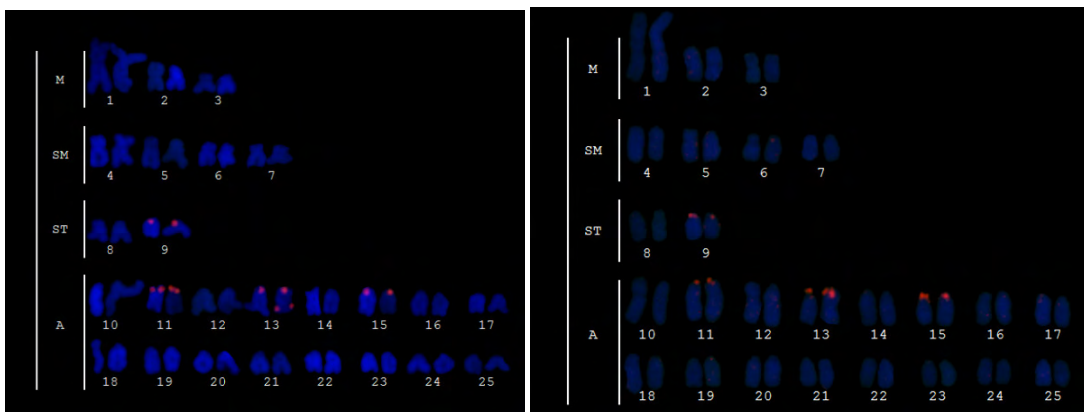


Figura 2.4 . Cariótipos *A. aff. hastatus*, localização do gene 5S. O primeiro, com marcação bitelomérica no par nº 13.

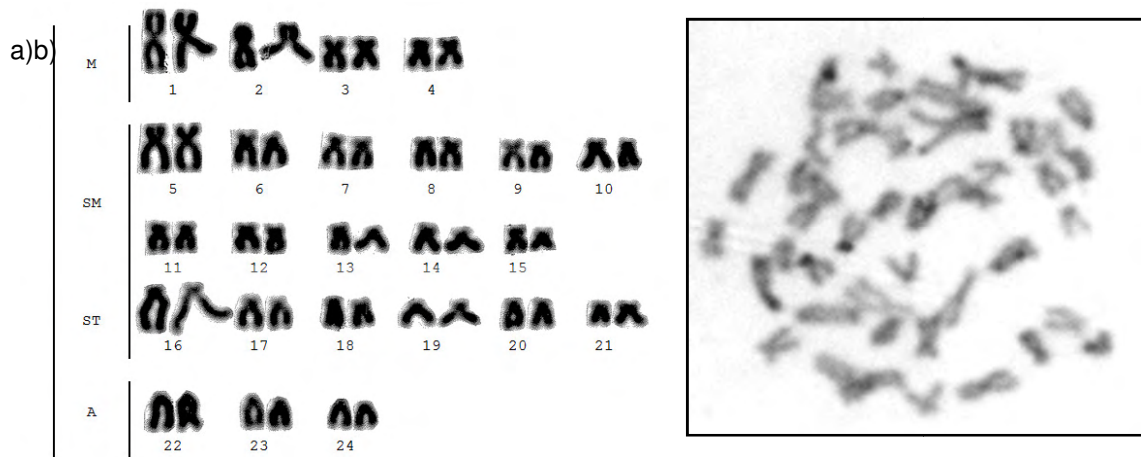


Figura 2.5 a) Cariótipo em giemsa de *A. aff. fasciatus*. b) Heterocromatina constitutiva

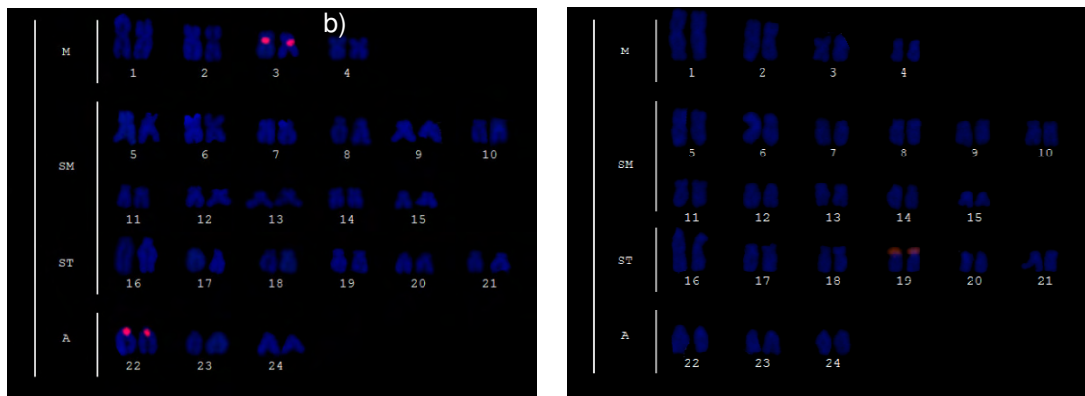


Figura 2.6. FISH em *A. aff. fasciatus*) Sítios de rDNA 5S. b) Sítios de rDNA 18S

Discussão

Sistemas de rios tropicais de grande porte, como a Bacia do Rio São Francisco, permitem que algumas espécies de peixes se isolem geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras intrapopulacionais físicas, químicas ou bióticas, permitindo que estas evoluam dentro do próprio sistema (LOWE-MCCONNELL, 1969).

GARUTTI (1995) afirma que o gênero *Astyanax* tem uma distribuição estruturada, sugerindo um grande nível de endemismo: mesmo dentro de uma mesma bacia hidrográfica há múltiplas formas com distribuição geográfica relativamente restrita. Em vista disso, supõe-se que os lambaris não formem um grupo uniforme, havendo variações de população para população, provavelmente por este grupo habitar uma grande variedade de microambientes (GARUTTI & BRITSKI, 2000), embora seja mais bem sucedido em habitats melhor preservados (ORSI *et al.*, 2004).

JUSTI (1993), estudando populações de *Astyanax fasciatus* ao longo do Rio São Francisco, encontrou os seguintes citótipos: $2n=48$ (8M+10SM+24ST+6A) no córrego da Porta, à jusante da barragem de Três Marias, e $2n=46$ (6M+24SM+8ST+8A), na calha principal, no município de Três Marias. HERAS (1998) descreve dois diferentes citótipos para a mesma bacia: $2n=48$ (10M+14SM+14ST+10A), também coletado no local previamente estudado por JUSTI (1993), em Córrego da Porta, e um citótipo proveniente de um único indivíduo, sendo $2n=46$ (8M+22SM+8ST+8A). Quanto aos citótipos obtidos na calha principal pelos autores, ambos possuem $2n=46$, mas com

fórmula diferente, provavelmente resultado da classificação de cromossomos M/SM (HERAS, 1998).

Adicionalmente, em relação aos citótipos $2n=48$, com fórmulas distintas, HERAS (1998), destaca que provavelmente os cromossomos analisados possuem uma relação de braços que encontra-se próxima ao limite dos intervalos estabelecidos na literatura, ocasionando diferenças nas análises. A alternativa encontrada para as comparações se tornarem viáveis foi agrupar os cromossomos, com um grupo constituído por metacêntricos e submetacêntricos, e outro constituído por subtelocêntricos e acrocêntricos. Porém, esse tipo de abordagem pode dificultar ainda mais estudos de distintos citótipos pertencentes à mesma bacia ou bacias distintas (HERAS, 1998). Comparativamente, não é o caso desse terceiro citótipo descrito no presente trabalho, uma vez que o seu local de coleta (Rio Pandeiros) é consideravelmente distante da barragem de Três Marias. Desse modo, os dados indicam que este é um citótipo distinto dos demais, a despeito da dificuldade nas classificações; considerando que as populações permaneceram isoladas geograficamente, mas que mantiveram seus números diplóides constantes, pode-se inferir que suas diferenças se devem a rearranjos não-robertonianos, do tipo inversões pericêntricas, como já descrito no gênero (PAZZA & KAVALCO, 2007), ao longo do tempo decorrido de um ou mais eventos vicariantes.

Astyanax fasciatus, que foi primeiramente descrito por Cuvier (1819), tem como localidade tipo “Rios do Brasil”. Desse modo, a distribuição inicialmente proposta para a espécie é extremamente vasta, e como se mostrou posteriormente à descrição original, através de análises morfométricas e

citogenéticas, de fato representa um “complexo de espécies” (JUSTI, 1993; CENTOFANTE *et al.*, 2003; ARTONI *et al.* 2006; PAZZA *et al.*, 2008), que tem distintos citótipos distribuídos em várias bacias hidrográficas. ARTONI *et al.*, (2006), analisando populações da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, encontraram 3 citótipos, sendo um $2n=48$, e dois com $2n=50$, com diferentes fórmulas cariotípicas. Os locais de coleta, as Furnas do Parque Estadual de Vila Velha, são bastante conspícuos, por terem se formado no Pleistoceno com nenhuma ligação com outros corpos de água, consideradas regiões endêmicas para *Astyanax*.

PAZZA *et al.* (2008b), analisando populações das bacias do rio Paranapanema (Angatuba-SP), e do Rio Mogi-Guaçu (Araras-SP), encontraram citótipos com $2n=46$ e $2n=48$, respectivamente. Este segundo citótipo (8M+22SM+12ST+6A) é semelhante ao encontrado no presente trabalho, na população de Pandeiros. Apesar de iguais, as fórmulas cariotípicas poderiam ser resultados de convergência, devido ao grande isolamento geográfico entre os pontos de coleta. A outra hipótese seria a conservação dos caracteres cromossômicos, que é suportada pela localização dos sítios 5S, que é a mesma em ambas as populações. A conservação dos sítios também pode ser observada na população de Angatuba, que possui $2n=46$. Esse é um padrão constante em várias espécies do gênero (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002), especialmente em relação aos sítios do par de cromossomos metacêntricos. Tal padrão também foi observado por PAZZA *et al.*, (2006), em que a localização dos sítios obtidos pela FISH se mostrou constantes, mesmo com a variação cromossômica numérica ao longo da bacia. PAZZA *et al.* (2008a), estudando populações de *A. aff. fasciatus*, citótipos de acordo com

PAZZA *et al.*, (2006), (citótipo A, $2n = 48$ cromossomos (8M+22SM+12ST+6A - NF=90) e citótipo B, $2n = 46$ cromossomos (12M+20SM+10ST+4A - NF=88), observaram blocos heterocromáticos conspícuos em regiões teloméricas de vários cromossomos. Este padrão diverge do observado na população de Rio Pandeiros, que apresenta pouca heterocromatina, distribuída em regiões pericentroméricas dos cromossomos.

MORELLI *et al.*,(1983), realizou estudo anterior de uma população de *Astyanax fasciatus* na bacia do Rio Mogi-Guaçú, estabelecendo $2n=46$, sem fórmula cariotípica definida. Além dessa população, outra coletada no Rio Juquiá, possivelmente (devido à incertezas taxonômicas) de *A. fasciatus*, foi observado $2n=48$. Os autores evidenciaram que provavelmente a evolução cariotípica ocorreu de uma maneira não conservadora, já que existem espécies com $2n=46$ a $2n=50$ em um grupo (*A. fasciatus*, *A. bimaculatus* e *A. scabripinnis*) e *A. schubarti*, com $2n=36$ em outro. Historicamente, é possível observar a evolução da taxonomia do gênero, como a revisão de *A. bimaculatus*, estabelecimento de complexos de espécies para *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, além de estudos que apontaram a origem polifilética de *Astyanax* (WEITZMAN & MALABARBA, 1998),

Astyanax aff. hastatus, recentemente considerado um grupo de espécies crípticas, têm 3 citótipos válidos atualmente (KAVALCO *et al.*, 2009), sendo todos descritos para a Bacia do Rio Guapimirim. Dos 3 citótipos, o tipo “B” se destaca dos demais, por possuir um NF fundamental maior em relação aos outros, devido a presença de poucos cromossomos acrocêntricos, numa análise comparativa(B = 9 pares, A=14 pares e C=16 pares). Adicionalmente, os autores sugerem que essa população é parte de uma espécie distinta,

dados que também são suportados por análises moleculares (KAVALCO, 2008). O citótipo apresentado no presente trabalho, equivale ao “citótipo tipo C” previamente descrito, porém é de uma bacia hidrográfica distinta, com considerável distância geográfica. Apesar de mesmo citótipo e heterocromatina constitutiva, a população do Rio Ariró apresentou 8 sítios de rDNA 18S, em contraste com 6 sítios observados por KAVALCO *et al* (2009), diferença essa que pode ter sido resultado de translocações envolvendo loci do rDNA 18S. Entretanto, esse padrão é observado em outros sítios rDNA 18S no gênero, com sítios teloméricos e também intersticiais. Quanto aos loci rDNA 5S, ainda não há comparativos no grupo *A. aff. hastatus* por se tratar da primeira descrição para a espécie. Porém, nas espécies de *Astyanax* com distribuição continental, pelo menos o locus situado na região pericentromérica de um par metacêntrico parece ser conservado (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2007). Para espécies costeiras, o padrão é outro, já que para o marcador 5S característico é ausente (KAVALCO *et al.*, 2004). KAVALCO *et al.* (2004) postulam que é possível que esses sítios tenham se perdido ao longo do tempo, na formação deste subgrupo. Os dados obtidos contrastam com o que já foi descrito para o subgrupo, sendo quatro sítios a mais do que o comumente observado para *A. ribeirae* (KAVALCO, 2010) e dois sítios a menos que *A. intermedius* e *A. giton*, ambos com 10 sítios (KAVALCO *et al.*, 2004). Porém, a ausência de dados sobre rDNA 5S em outras populações de *A. aff. hastatus*, dificulta inferências sobre as relações com demais espécies baseadas nesse marcador citogenético.

A presença de NOR bitelomérica é um fenômeno ainda não completamente compreendido na citogenética de peixes, e pode ser observada

em alguns taxa não relacionados, como *Hoplías* (BORN E BERTOLLO, 2000), *Poecilia* (GALETTI JR & RASCH, 1993), *Astyanax* (PACHECO *et al.*, 2001) entre outros. Esses dados, no entanto, representam apenas o rDNA 18S ou 28S. Para 5S, ainda não foi observado em nenhuma espécie, sendo provavelmente produto de uma inversão pericêntrica, de caráter intra-individual, uma vez que não foi observada em outros indivíduos ou outras metáfases.

Referências

Encontram-se no final do trabalho.

Amplificação cruzada de seis loci microssatélites isolados de *Astyanax mexicanus* para espécies do gênero com distribuição Sul-Americana

Cross-amplification of six microsatellite loci isolated from *Astyanax mexicanus* to species of genus with south american distribution

Pierre Rafael Penteado, Karine Frehner Kavalco, Rubens Pazza

Resumo

Microssatélites, marcadores moleculares que consistem de sequências de nucleotídeos repetidos em tandem, são amplamente usados em estudos genéticos e populacionais. Uma desvantagem desse marcador é a respeito da prospecção dos primers para os loci desejados, que são caras e trabalhosas. Uma alternativa viável é utilizar loci previamente isolados de espécies proximamente relacionadas, chamada amplificação cruzada. No presente estudo, primers isolados de *Astyanax mexicanus* foram testados em cinco espécies do gênero *Astyanax*. As reações de PCR seguiram protocolo previamente descrito. Apenas o loci Ast1 amplificou em todas as espécies, e mostrou-se polimórfico em pelo menos uma espécie, *A. hastatus*. Demais aspectos específicos e potenciais aplicações são discutidos.

Abstract

Microsatellites, molecular markers that consist of sequences of nucleotides repeated in tandem, are widely used in genetic studies and population. A disadvantage of this marker is about the development of the primers for the desired loci, which are expensive and laborious.

A viable alternative is to use loci previously isolated from closely related species, called cross-amplification. In this study, primers isolated from *Astyanax mexicanus* were tested in five species of the genus *Astyanax*. PCR reactions followed the protocol previously described. Only AST1 loci amplified in all species, and were polymorphic in at least one species, *A. hastatus*. Other specific aspects and potential applications are discussed.

Introdução

Marcadores moleculares são proteínas ou seqüência de DNA polimórficos que podem ser usados como indicadores de variação do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os microssatélites (SSR ou STR) consistem de pequenas seqüência de 1 a 4 nucleotídeos repetidos em *tandem*. São marcadores codominantes e altamente polimórficos (ELLEGREN, 2004), que apresentam como ponto negativo a grande quantidade de trabalho necessária para o desenvolvimento prévio dos marcadores (CHISTIAKOV, 2006). Alternativamente, pode-se tirar proveito de loci de microssatélites previamente isolados em uma espécie, e usá-los em outro táxon proximoamente relacionado. A amplificação cruzada de STR's possibilita sobrepor a informação genética de

uma espécie para outra e conseqüentemente o uso desses marcadores para genética de populações, análise de parentesco e outras aplicações sem a necessidade de investimento no isolamento de microsatélites polimórficos (CAIRNEY *et al.* 2000).

Astyanax é um dos gêneros de peixes com maior distribuição pela região neotropical, que abrange desde a região da Patagônia, no norte da Argentina, até o estado do Texas, no sul dos Estados Unidos da América (EIGENMANN, 1921). Adicionalmente, é um gênero extremamente especioso, sendo que a revisão mais recente do gênero aponta 90 espécies consideradas válidas atualmente (LIMA *et al.*, 2003). *A. mexicanus*, popularmente conhecido como tetra cego mexicano ou tetra cego das cavernas, têm sido alvo de estudos aprofundados abordando suas características biológicas e genéticas (DOWLING *et.al*, 2002; STRECKER *et. al*, 2003b; PROTAS *et. al*, 2007). Em *Astyanax*, a única espécie a ter loci de microsatélites descritos é *A. mexicanus*, (STRECKER, 2003a) que posteriormente teve aplicações em estudos de populações cavernícolas e de superfície na América do Norte (STRECKER, 2003b). Como o gênero *Astyanax* é extremamente especioso, testes de amplificação cruzada podem abrir caminhos para estudos aprofundados em populações do gênero na América do Sul.

Material e Métodos

Para o presente trabalho, foram realizados testes de transferibilidade de *primers* para seis loci de microsatélites previamente isolados de *Astyanax mexicanus* (STRECKER, 2003). As reações de PCR foram realizadas num

termociclador Palm Cycler (Corbett®), com um volume total de com volume total de 30 µl, contendo 70ng de DNA molde, 3µl de solução tampão (20 mM Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.1 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl, 2.5 µM de cada *primer*, 1.0 U Taq-polimerase. As condições das reações foram: desnaturação inicial 95°C por 1 minuto (1 repetição), seguidos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), anelamento a 50-57°C por 30 segundos e alongamento 72°C por 30 segundos (40 repetições) e extensão final a 72°C por 1 minuto. Para o anelamento, foi usado de gradiente de temperatura, a fim de obter a temperatura ideal para cada *primer* em cada espécie. Para extração do DNA genômico foi usado Kit de extração de DNA INVITEK®, de acordo com as instruções do fabricante. As espécies escolhidas para os testes têm distribuição costeira: *A. hastatus* (2 populações), *A. ribeirae*, *A. giton*, *A. intermedius* e *A. parahybae* (figura 3.1)(Tabela 3.1). Para controle positivo, foi usado DNA de *A. mexicanus*. Após a reação os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose 3%.

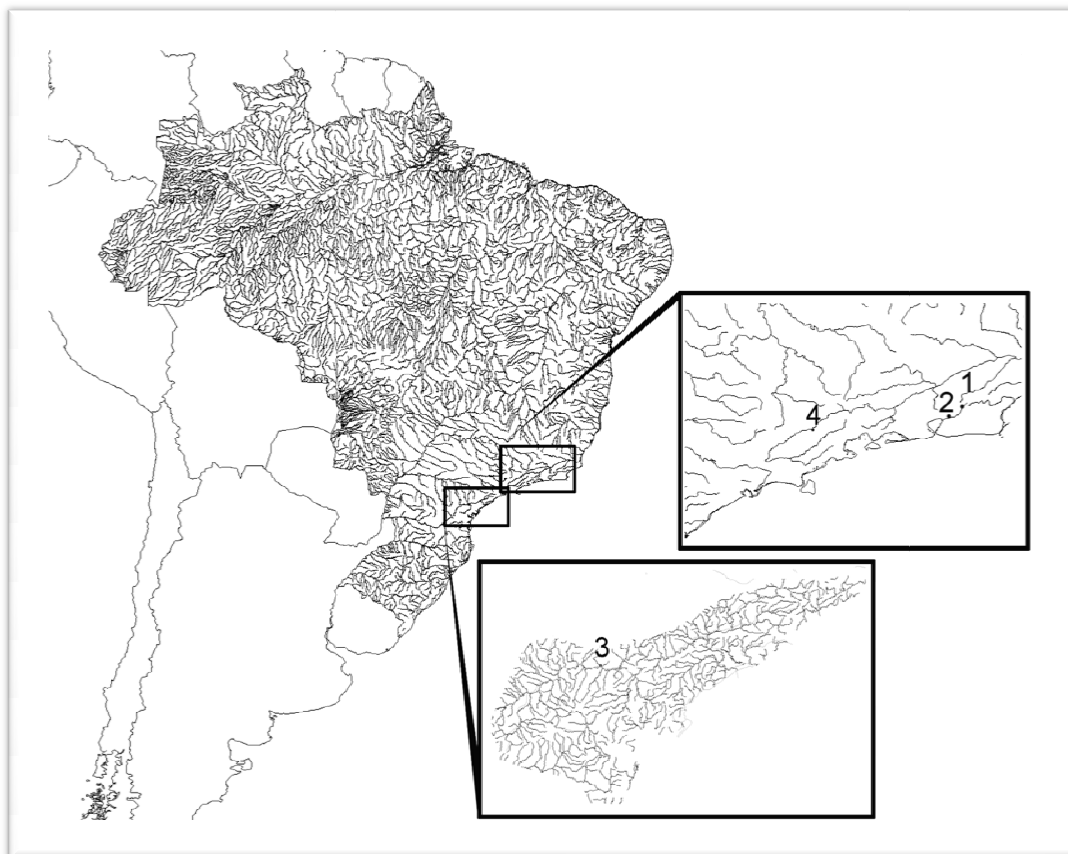


Figura 3.1 - Pontos de coleta.

Ponto	Localidade	Espécie coletada	Coordenadas geográficas
1	Santana do Japuíba - RJ	<i>A. hastatus</i>	22 33 39,9 S 42 40 51,1 W
2	Cachoeira do Macacu-RJ	<i>A. hastatus</i>	22 29 06,1 S 42 39 40,3 W
3	Cunha - SP	<i>A. intermedius</i> <i>A. giton</i> <i>A. parahybae</i>	22 52,225 S 44 51,041 W
4	Iporanga - SP	<i>A. ribeirae</i>	24 32 29 S 48 30 09 W

Tabela3.1 – Locais de coleta das populações testadas.

Resultados

As reações de PCR evidenciaram que apenas o locus Ast1 amplificou em todas as espécies e mostrou-se polimórfico em pelo menos uma delas (*A. hastatus*). Todos os *primers* amplificaram com temperatura de anelamento um

grau acima do descrito por STRECKER (2003). Os resultados por locus por espécie estão resumidos na tabela 3.2 abaixo. O locus Ast1 mostrou-se polimórfico em pelo menos 1 espécie (*A. hastatus*). O locus Ast9 apresentou problemas de amplificação, inclusive no controle (DNA de *Astyanax mexicanus*) exigindo novas tentativas que evidenciaram a ausência de amplificação nas cinco espécies de distribuição costeira, porém com amplificação em 3 espécies de distribuição continental.

Locus	<i>A. hastatus</i>	<i>A. intermedius</i>	<i>A. giton</i>	<i>A. ribeirae</i>	<i>A. paraguayae</i>
Ast1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ast2	Sim	Sim	-	Sim	Sim
Ast4	Sim	-	Sim	Sim	-
Ast9	-	-	-	-	-
Ast10	Sim	Sim	-	-	-
Ast13	-	Sim	Sim	Sim	Sim

Tabela 3.2 - Transferibilidade dos loci de microssatélites em 5 espécies do gênero *Astyanax*. "Sim" indica homologia dos loci.

Discussão

Apesar da vasta diversidade observada na ictiofauna neotropical, loci de microssatélites têm sido isolados e descritos para poucas espécies de peixes neotropicais nos últimos anos: SANCHES & GALLETI JR, 2006 para *Brycon hilarii*; BARROSO *et al.*, 2003, para *Brycon opalinus*; CALCAGNOTTO *et al.*, 2001, para *Piaractus mesopotamicus*; BEHEREGARAY *et al.*, 2004, para

Paracheirodon axelrodi e BEHEREGARAY *et al.*, 2005 para *Hemigrammus bleheri*, entre outros). Em geral, são espécies que têm potencial econômico na alimentação humana, aquariorfilia ou necessitam de ferramentas mais refinadas para auxiliar em estudos que visam conservação.

Adicionalmente, a amplificação cruzada entre espécies intimamente relacionadas proporciona a possibilidade de sobrepor à informação genética de uma espécie para outra, e conseqüentemente o uso dos marcadores microssatélites para estudos populacionais, análises populacionais sem a necessidade de se investir no desenvolvimento de microssatélites polimórficos para cada espécie (CHISTIAKOV *et al.*, 2010). Nesse esforço, pode-se citar o isolamento de marcadores microssatélites para *Prochilodus argenteus*, com conseqüentes testes de amplificação cruzada em *P. costatus* e *P. lineatus* (BARBOSA *et al.*, 2008); mesmo entre gêneros distintos, como o estudo desenvolvido em populações de *Brycon moorei sinuensis*, realizado com loci isolados previamente em *Piaractus mesopotamicus* (LÓPEZ, 2006).

Os loci testados nas espécies de *Astyanax* tiveram resultados diversos, sendo que AST1 demonstrou amplificação em todas as espécies testadas. Entretanto, como outros loci tiveram resultados diversos na amplificação nas mais variadas espécies, futuros estudos deverão levar em conta a viabilidade dos marcadores em relação às espécies. O tamanho dos alelos, que ultrapassou a variação observada por STRECKER (2003), provavelmente pode ser explicada pela distância genética entre o grupo das espécies testadas e *Astyanax mexicanus*.

É necessário cautela para realizar inferências procurando explicar relações entre *A. mexicanus* e demais espécies sul-americanas baseadas apenas na amplificação cruzada aqui apresentada. Os resultados, mesmo agrupando as espécies por bacias hidrográficas, ainda não permitem vislumbrar possíveis rotas de colonização das espécies na América do Sul. Porém, futuros estudos usando estes mesmos marcadores devem desvendar mais sobre as estruturas das populações do gênero, admitindo abordagens filogeográficas a fim de se entender a distribuição inicial do gênero.

Referências

Encontram-se no final do trabalho.

Relações evolutivas entre espécies do gênero *Astyanax* de bacias costeiras brasileiras

Evolutionary relationships among species of *Astyanax* from Brazilian coastal basins

Pierre Rafael Penteado, Karine Frehner Kavalco e Rubens Pazza

Resumo

O conhecimento sobre a taxonomia do gênero *Astyanax* distribuído em bacias costeiras brasileiras ainda é escasso, e estudos recentes revelaram a presença de um complexo de espécies, *A. aff. hastatus*, indicando que ainda há muito a se investigar na região. No presente estudo, o fragmento do gene ATPase 6/8, de uma população de *A. aff. hastatus* coletada no Rio Ariró, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, é seqüenciado, e incluído no dendrograma proposto para outras espécies com distribuição em bacias circunvizinhas. Adicionalmente, as distâncias genéticas foram estimadas, através do algoritmo de distância p e também através do algoritmo proposto pelo teste de evolução molecular. Foram analisadas 781 bases, e o modelo de evolução molecular que melhor explica os dados é TN93+G. A recém estudada população incluída no dendrograma trata-se de uma espécie distinta, situada como grupo irmão das demais espécies do complexo. Outra população, com mesma denominação mostra-se bastante divergente do complexo, sendo agrupada com as espécies *A. intermedius* e *A. giton*. Adicionalmente, uma população de *A. ribeirae* surge agrupada com três populações de *A. aff. hastatus*, o que pode enriquecer o conhecimento sobre o complexo de espécies.

Abstract

The knowledge about the taxonomy of the genus *Astyanax* distributed in Brazilian coastal basins is still scarce, and recent studies revealed the presence of a species complex, *A. aff. hastatus*, indicating that much remains to be investigated in the region. In this study, the gene fragment of ATPase 6 / 8 of a population of *A. aff. Hastatus*, collected in Rio Ariró, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, is sequenced, and included in the dendrogram proposed for other species with distribution in surrounding basins. Additionally, the genetic distances were estimated using distance p algorithmal, through the proposed algorithm for the test of molecular evolution and also through the proposed algorithm by the test of molecular evolution. Were analyzed 781 bases, and the model of molecular evolution that better explain the data is TN93 + G. The newly studied population included in the dendrogram comes up for an distinct species, situated as sister group to other species within the complex. Another population with the same name appears to be quite divergent from the complex, being clustered with the species *A. intermedius* and *A. giton*. Additionally, an population of *A. ribeirae* appear clustered with three populations of *A. aff. hastatus*, data that can enrich the knowledge of the species complex.

Introdução

Considerado modelo para estudos citogenéticos e evolutivos (STRECKER *et. al*, 2003b; PAZZA & KAVALCO, 2007; PROTAS *et. al*, 2007) o gênero *Astyanax*, ainda apresenta lacunas no conhecimento da sua diversidade sendo taxonômicamente considerado como *Incertae sedis*, devido à sua origem polifilética WEITZMAN & MALABARBA (1998). Possui uma ampla distribuição

pela região Neotropical, incluindo a costa Sudeste brasileira, que através de suas características físicas pode ter ajudado na fixação das características genéticas observadas nos lambaris que habitam a região. Entretanto, estudos recentes de seqüenciamento de DNA demonstram que ainda há muito a ser estudado neste grupo, sobretudo com relação às espécies que ocorrem exclusivamente em rios que drenam para costa brasileira. KAVALCO (2008), usando a região mitocondrial da ATPase 6/8, obteve uma árvore evolutiva que indica que algumas espécies de *Astyanax* precisam passar por estudos mais refinados para que possamos compreender melhor as suas relações evolutivas. Situações de polifilia entre diferentes citótipos de *A. aff. hastatus* indicam, parafilia entre populações de *A. ribeirae* indicam que as relações evolutivas do gênero ainda não estão esclarecidas para essa região. Adicionalmente, ainda existem populações desconhecidas, que podem enriquecer o conhecimento sobre o gênero.

Material e Métodos

Uma população de *A. aff. hastatus* foi coletada no Rio Ariró, Bacia dos Rios Costeiros, e para a análise foram escolhidos aleatoriamente 6 indivíduos. Os tecidos usados para extração de DNA encontram-se depositados na coleção de tecidos do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva. As espécies previamente analisadas encontram-se na tabela 4.1. Para isolamento do DNA, foi usado Kit de extração de DNA INVITEK® acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação, este foi diluído para concentração final de 10ng/ µl. O segmento ATPase 6/8 foi amplificado usando os primers ATP 8.2_L8331 (5' AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC) e CO3.2_H9236 (5'

GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC) (SIVASUNDAR, 2001), assim como os demais indivíduos previamente estudados (KAVALCO, 2008). As reações de PCR foram realizadas num termociclador Palm Cycler (Corbett®), contendo 3 µl de solução tampão - (20 mM Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.1 mM de dNTP (cada dNTP), 2 µM de cada *primer*, 1.0 U de *Taq*-polimerase, 1.5 mM de MgCl e 80 DNA, num volume final de 25 µl. O perfil de PCR usado foi baseado em três etapas: primeiramente, desnaturação a 95°C, por 4 minutos, anelamento a 54°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos (1 repetição); seguidos de 95°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos (39 repetições); e por fim, 95°C por 15 minutos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 10 minutos (1 repetição). Após checagem da amplificação via gel de agarose 1%, o produto de reação foi encaminhado para serviço especializado de purificação e seqüenciamento. As seqüência obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o software MEGA 5 (TAMURA *et al.* 2011), e verificadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa "Blastn", com o objetivo de confirmar sua similaridade com seqüência mitocondriais de outros peixes. Em seguida, as seqüência de DNA foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994), pelo software MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011) utilizando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos para abertura de *gaps* (20) e extensão de *gaps* (6,66).

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011), que incluem teste para modelo de evolução molecular, construção de dendrograma através da abordagem de Máxima Verossimilhança e cálculo da distância genética, no qual foi usada a distância *p* não corrigida, e também através do método de TAMURA & NEI (1993), de

acordo com o teste de modelos de substituição nucleotídica. Para a construção de rede de haplótipos mitocondriais foi utilizado o software TCS v.1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000), sendo o limite de conexões calculado em 95%.

Espécies	Localidade	Bacia Hidrográfica	ponto	Coordenadas geográficas
<i>A. aff hastatus</i>	Distrito de Ypiranga/RJ	Guapimirim/Rios Costeiros	yp	22 38 11,6 S 42 42 42,3 W
	Santana do Japuíba/RJ	Guapimirim/Rios Costeiros	pf	22 33 39,9 S 42 40 51,1 W
	Rio Macacu/RJ	Guapimirim/Rios Costeiros	pr	22 29 06,1 S 42 39 40,3 W
	Cachoeiras de Macacu/RJ	Guapimirim/Rios Costeiros	rm	22 29 06,1 S 42 39 40,3 W
	Angra dos Reis	Rio Ariró/Rios Costeiros	agr	22 54 14,2 S 44 19 59,2 W
<i>A. ribeirae</i>	Registro/SP	Ribeira de Iguape	pp	24 36 01 S 47 52 32 W
	Poço Grande/SP	Ribeira de Iguape	pg	24 32 29 S 48 30 09 W
<i>A. intermedius</i>	Cunha - SP	Paraíba do Sul	-	22 52,225 S 44 51,041 W
<i>A. giton</i>	Cunha - SP	Paraíba do Sul	-	22 52,225 S 44 51,041 W

Tabela 4.1 – Local de coleta das espécies/populações estudadas

Resultados

O sequenciamento do fragmento da ATPase 6/8 permitiu a análise de 781 bases, e o modelo de evolução molecular que melhor explicam os dados foi o TN93+G. As distâncias evolutivas entre e dentro dos grupos encontra-se na tabela 4.2. O dendrograma de máxima verossimilhança encontra-se na Figura 4.1, e a rede de haplótipos na Figura 4.2.

Tabela 4.2 - Distâncias genéticas entre haplótipos do gênero *Astyanax* de distribuição costeira estimadas para cada população amostrada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	d (p)	d (TN)
1		0,1049	0,1003	0,1005	0,0981	0,0996	0,0366	0,0214	0,1013	0,0006	0,0006
2	0,0957		0,0062	0,0058	0,0106	0,0598	0,1180	0,1049	0,0605	0,0107	0,0109
3	0,0918	0,0061		0,0014	0,0062	0,0557	0,1135	0,1004	0,0568	0,0020	0,0021
4	0,0920	0,0058	0,0014		0,0049	0,0544	0,1138	0,1006	0,0555	0,0006	0,0006
5	0,0900	0,0104	0,0061	0,0049		0,0523	0,1113	0,0982	0,0560	0,0031	0,0031
6	0,0918	0,0569	0,0532	0,0519	0,0501		0,1118	0,1025	0,0539	0,0020	0,0020
7	0,0356	0,1075	0,1038	0,1040	0,1020	0,1028		0,0272	0,1107	0,0348	0,0357
8	0,0210	0,0962	0,0923	0,0925	0,0905	0,0946	0,0266		0,1004	0,0138	0,0139
9	0,0926	0,0573	0,0539	0,0527	0,0532	0,0516	0,1015	0,0923		0,0005	0,0005

1- *A. hastatus* pf 2- *A. hastatus* rm 3- *A. hastatus* yp 4- *A. hastatus* pr 5- *A. ribeirae* pg
6- *A. ribeirae* pp 7- *A. giton* 8- *A. intermedius* 9- *A. hastatus* agr.

Valores abaixo da diagonal correspondem à distância p. Valores acima da diagonal correspondem à distância obtida pelo método de TAMURA & NEI (1993).



Figura 4.1 – Dendrograma obtido através de Máxima Verossimilhança, pelo modelo de TAMURA & NEI (1993)

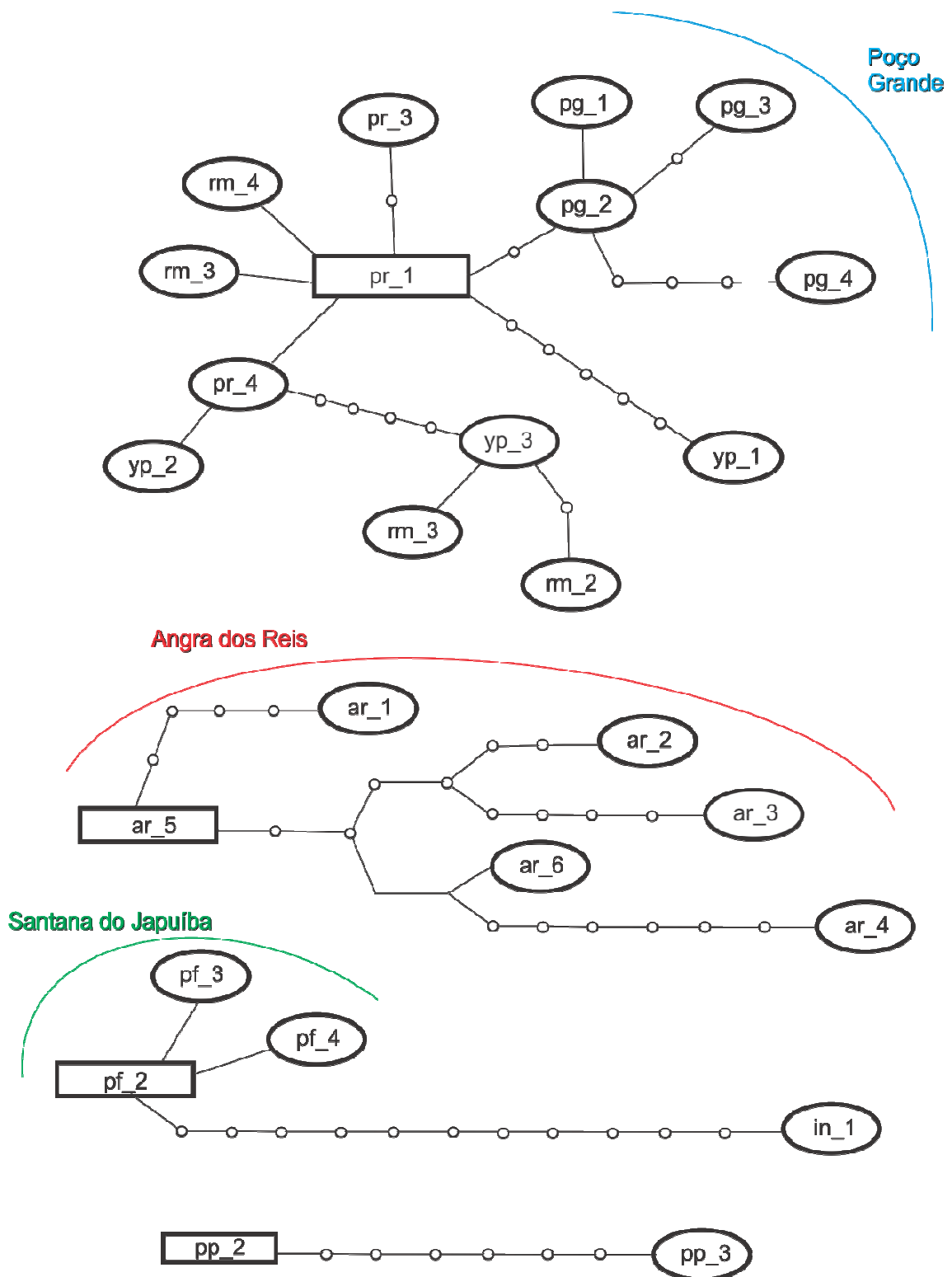


Figura 4.2 – Redes de haplótipos. Cada linha representa um passo mutacional. Ovais representam haplótipos amostrados. Pequenos círculos representam haplótipos não amostrados. Limite de similaridade igual a 12 passos mutacionais ou 95%.

Discussão

O dendrograma construído através do método de máxima Verossimilhança demonstra que a população de *A. aff. hastatus* proveniente de Angra dos Reis (ponto agr), trata-se de uma espécie distinta das demais, posicionando-se como grupo irmão do clado contendo as outras populações de *A. aff. hastatus* (pontos pr e rm). Também nesse mesmo clado encontram-se ambas as populações amostradas de *A. riberae*, que são parafiléticas entre si, sendo que a população do ponto pg provavelmente pertence ao grupo *A. aff. hastatus*. Em outro ramo, no grupo irmão do clado citado que abriga as demais populações *A. aff. hastatus* está a população pf, considerada previamente como parte do mesmo complexo, mas que se assemelha mais aos espécimes de *A. giton* e *A. intermedius*, no que diz respeito a caracteres citogenéticos. Apesar dessa proximidade, dados provenientes da citogenética podem ser usados para distinguir as populações situadas neste clado (KAVALCO, 2004; KAVALCO, 2008). A população pf tem um citótipo diferenciado em relação a *A. giton* e *A. intermedius*, e também com as demais populações do mesmo complexo; possui o citótipo “B” (KAVALCO, 2010), e apresenta número fundamental elevado em comparação aos demais, que se deve a presença de poucos cromossomos do tipo acrocêntrico (PENTEADO *et. al*, capítulo 1 deste volume).

Por fim, as situações de parafilia envolvendo *A. giton* e *A. intermedius* podem refletir incertezas na seqüência analisada ou ainda problemas no próprio seqüenciamento, sendo necessário futuros esforços para resolver a questão.

As redes de haplótipos, que foram construídas com 33 haplótipos, não agrupou sete deles, representando indivíduos de *A. giton*, *A. ribeirae* e *A. aff. hastatus*. Uma sub-rede é formada exclusivamente pelos indivíduos da população ag, (*A. aff. hastatus*), com até onze passos mutacionais entre os haplótipos (limite de até 12 passos mutacionais). O maior agrupamento reflete o grande clado observado no dendrograma, com passos mutacionais variando de um a oito, com formação de dois subgrupos, um formado apenas por indivíduos do ponto pg (*A. ribeirae*), enquanto que no outro por indivíduos de três pontos, pr, yp, rm (*A. aff. hastatus*), o que sugere uma recente diferenciação entre as populações, sendo que estes dois subgrupos estão separados por apenas três passos mutacionais. Por outro lado, a população pp (*A. ribeirae*), representada por apenas dois haplótipos não ficou conectada à este grupo por estar acima do limite de conexões estabelecido de 95%. Finalmente, haplótipos representando a população pf (*A. aff. hastatus*), estão correlacionados a um haplótipo formado por um indivíduo de *A. intermedius*, mesmo que no limite máximo de doze passos mutacionais, reforçando a formação de grupos irmãos entre a população pf e a população de *A. intermedius* evidenciados pelo dendrograma de máxima verossimilhança.

HEBERT *et. al* (2004), estudando aplicações de DNA barcoding em aves, questiona qual é o limite que poderia ser adequado para sinalizar geneticamente espécimes como espécies provisórias, na análise das distâncias genéticas. Atenta que deve ser um limiar suficientemente alto para separar apenas espécimes que provavelmente pertencem a espécies diferentes. A proposta para esse limite é que a variação interespecífica deve ser dez vezes maior que a variação intraespecífica da média para o grupo em estudo. Em seu

grupo de estudo (aves), os autores demonstram que a definição de um limite como critério vai ignorar espécies com curtas histórias evolutivas, ainda expostas a eventos de hibridização, mas será uma ferramenta de rastreamento útil especialmente para grupos que ainda necessitam que uma intensa análise taxonômica, como diversos taxa de peixes neotropicais.

A análise das distâncias genéticas baseadas na sequência do gene ATPase 6/8 das populações analisadas revela basicamente o mesmo cenário exibido pelo dendrograma de Máxima Verossimilhança. Para os valores de diversidade genética intraespecífica, apenas as populações rm (*A. aff. hastatus*) e *A. intermedius* apresentaram valores superiores ou igual a 1%. Os valores de diversidade intraespecífica de *A. giton*, provavelmente são devidos a problemas resultantes do seqüenciamento, sendo relativamente altos (3% a 4%). A população de *A. aff. hastatus*(pf), que aparece isolada na árvore filogenética, tem um percentual de diferenciação das demais populações em torno de 9 a 10%, exceto em relação a *A. giton* e *A. intermedius*, com diferenciação intraespecífica de 0,06%. Segundo o critério estabelecido por HEBERT *et. al* (2004), seguramente trata-se de uma espécie distinta das demais populações do grupo *A. aff. hastatus*. A população ag, de *A. aff. hastatus*, também com um diferenciação intraespecífica baixa (0,05%), mostra-se distante das demais populações contidas no clado de seu grupo irmão, com uma diferença média de 5,4%. De forma análoga, as populações de *A. riberae*, que tem origem polifilética na árvore filogenética, possuem grande distância entre si (5 a 5,2%), enquanto a distância intraespecífica apresentada é muito baixa (0,2% e 0,3%). A população pg, previamente considerada como *A. riberae*, apesar das análises moleculares indicarem que pertence ao grupo

A. aff. hastatus, possui um cariótipo distinto, composto por 4M+10SM+6ST+30A. (KAVALCO *et. al*, 2010). Considerando-a como pertencente ao grupo, representa assim um quarto citótipo para o complexo.

Por fim, as 3 populações restantes permanecem próximas entre si. Desse modo, o complexo *A. aff. hastatus*, proposto através de análises citogenéticas (KAVALCO *et. al*, 2010), continua válido mesmo quando ferramentas moleculares são empregadas. Contudo, duas populações analisadas previamente consideradas pertencentes à *A. aff. hastatus*, (pf, Santana do Japuíba; ar, Angra dos Reis) destoam dessa condição, devendo ser alvos de estudos morfológicos para futuras revisões taxonômicas.

Conclusões Gerais

O presente estudo apresenta um terceiro citótipo do grupo *A. aff. fasciatus*, para a bacia do São Francisco, e analisa marcadores citogenéticos moleculares até então não usados na mesma, permitindo inferências taxonômicas em relação à bacias hidrográficas circunvizinhas.

Para *A. aff. hastatus*, apresenta análises já realizadas com outras populações do mesmo complexo, e apresenta sítios biteloméricos para rDNA 5S, um fenômeno até então não observado em peixes.

A riqueza da biodiversidade é constantemente renovada com descobertas sobre espécies até então desconhecidas, porém também se dá através da revisão da taxonomia. Estas análises entram nessa segunda categoria, enriquecendo a diversidade já reconhecida do grupo *A. aff. fasciatus*, e corroborando o recém status proposto para *A. aff. hastatus*.

Referências

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ C.; FORESTI F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v.97, p.229-233, 2002

ALMEIDA, F.F.M.; CARNEIRO, C. D. R.; Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências** v.28, p. 135-150, 1998.

ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A.; GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; ALMEIDA, M, C. VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4(2), p. 197-202, 2006

BARBOSA, A. C. D. R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T.C.; GALETTI-JUNIOR, P. M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.357-360, 2008.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M. GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 297–298, 2003.

BEHEREGARAY, L. B.; MÖLLER, L. M.; SCHWARTZ, T. S., CHAO, N. L.; CACCONE, A. Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 330–332, 2004.

BEHEREGARAY, L. B.; CHAE, J.; CHAO, N. L.; CACCONE, A. Characterization of microsatellite loci for the amazonian rummy-nose tetra, *Hemigrammus bleheri* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 536–537, 2005

BERTACO, V. A.; LUCINDA, P. H. F. *Astyanax elachylepis*, a new characid fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3(3), p. 389-394, 2005

BRITSKI H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S.; **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1998.

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

CAIRNEY, M, TAGGART, J. B.; HOYHEIM, B. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. **Mol. Ecol.** v.9, p. 2175–2178, 2000.

CALCAGNOTTO D, RUSSELLO M, DESALLE R. (2001), Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, 1: 245–247. doi: 10.1046/j.1471-8278.2001.00091.x

CENTOFANTE L, BERTOLLO LAC, JUSTI AJ, MOREIRA-FILHO O. . Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 14, n. 4, p. 361-368, 2003.

CHISTIYAKOV DA, HELLEMANS B, VOLCKAERT FAM, 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture** 255, 1–29.

DOWLING TE, MARTASIAN DP, JEFFERY WR, (2002). Evidence for Multiple Genetic Forms with Similar Eyeless Phenotypes in the Blind Cavefish, *Astyanax mexicanus* **Mol Biol Evol** 19(4): 446-455

EIGENMANN CH. (1921) The American Characidae. Part 3. **Cambridge -Mem Mus Comp Zool** 43: 209-310.

ELLEGREN H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat. Rev. Genet.**, 5, 435–445.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Species of Fishes by family/subfamily, ver. 13
March 2009. **World Wide Web electronic
publication:** <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.html>>

FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC. (2004) Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanaxaltiparanae*(Pisces, Characiformes). **Hereditas** 141:328 332.

FERREIRA ME, e GRATTAPAGLIA D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN**, 220p.

GALETTI JR PM, RASCH EM. NOR variability in diploid and triploid forms of the Amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A3 staining. **Genetics and Molecular Biology**. 1993;16 (4):927-938.

GARUTTI V. (1995) Revisão taxonômica dos *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE), com mancha umeral ovalada e mancha do pedúnculo caudal estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônia. **Tese** (Livre docência em Zoologia – Vertebrados). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP.

GARUTTI V, BRITSKI HA. (2000). Descrição de uma espécie nova de *ASTYANAX* (TELEOSTEI:CHARACIDAE) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências** 13: 65-88.

GARUTTI V, VENERE PC. (2009) *Astyanax xavante*, a new species of characid from middle rio Araguaia in the Cerrado region, Central Brazil (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) **Neotropical Ichthyology**, 7(3):377-383, 2009

GOLD JR, LI C, SHIPLEY NS, POWERS PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **J Fish Biol** 37: 563-575.

HALUCH CF, ABILHOA V. *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei: Characidae) from the upper rio Iguazu basin, southeastern Brazil. **Neotrop.ichthyol.** [online]. 2005, vol.3, n.3, pp. 383-388. ISSN 1679-6225.

HATANAKA T, GALETTI PM JR (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829(Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239-244.

HEBERT PDN, STOECKLE MY, ZEMLAK TS, FRANCIS C.M (2004) Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**. 2,1657–166. doi:10.1371/journal.pbio.0020312.

HERAS MP. (1998). Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de rios do Brasil. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.

JAVONILLO R, MALABARBA LR, WEITZMAN SH, BURNS JR. (2009). Relationships among major lineages of characid fishes (TELEOSTEI: OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, doi:10.1016/j.ympev.2009.08.026

JUSTI, AJ. (1993). Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. São Carlos – SP: **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de São Carlos.

MELO FAG, BUCKUP PA, (2006). *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (TELEOSTEI: CHARACIFORMES). **Neotrop. ichthyol.** [online]., vol.4, n.1, pp. 45-52. ISSN 1679-6225.

KAVALCO KF, MOREIRA-FILHO O, (2003). Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**56: 453-461.

KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O, (2004). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **CytogenetGenomeRes** 106: 107-110.

KAVALCO KF. Estudos Evolutivos No Gênero *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE). **Tesededoutorado**, Universidade de São Paulo, 196pp, 2008

KAVALCO KF, BRANDÃO KO, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF.. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 477-483, 2010

KAVALCO, KF; PAZZA, R; ALMEIDA-TOLEDO LF..Molecular cytogenetics of *Astyanaxribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest.**Nucleus**, v. 53, p. 51-54, 2010. Doi: 10.1007/s13237-010-0006-9, 2010

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA.**Nomenclature for centromeric position on Chromosomes**.Hereditas 52: 201-220, 1964

LIMA FCT, MALABARBA LR, BUCKUP PA, SILVA JFP, VARI RP, HAROLD A, BENINE R, OYAKAWA OT, PAVANELLI CS, MENEZES NA, LUCENA CAS, MALABARBA MCSL, LUCENA ZMS, REIS RE, LANGEANI F, CASSATI L, BERTACO VA, MOREIRA C, LUCINDA PHF. **Genera Incertae Sedis In Characidae** In: Reis RE, Kullander SO, FERRARIS JR CJ, (2003). Check list of

the freshwater fishes of South and Central America EDIPUCRS, Porto Alegre, 106-169, 2003.

LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, M.L.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the River Paranapanema. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.355-362, 2004

LÓPEZ L. Genetic variability and population structure of dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl) in the Sinú River, Córdoba, Colombia. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, 11: 1–7. doi: 10.1111/j.1440-1770.2006.00289.x, 2006.

LOWE-MCCONNELL RH. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biol J Linnean Soc** 1: 51-75, 1969

MARTINS C, GALETTI JR. PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (ANOSTOMIDAE, CHARACIFORMES). **Chromosome Res** 7: 363-367, 1999

MESTRINER CA, GALETTI JR. PM, VALENTINI SR, RUIZ IRG, ABEL LDS, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JPM, (2000). **Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome**. *Heredity* 85: 1-9.

MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO, LAC, (1991). ***Astyanax scabripinnis*** (Pisces, Characidae): a species complex. Brazilian Journal of Genetics 14: 331-357.

MORELLI S, BERTOLLO LAC, FORESTI F, MOREIRA-FILHO O, E TOLEDO FILHO AS, (1983). **Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability.** Caryologia 36: 235-244.

ORSI ML, CARVALHO ED, FORESTI F, (2004). Biologia populacional de *A. altiparanae* Garutti & Britski (TELEOSTEI, CHARACIDAE) do médio Paranapamena, Paraná, Brazil. **Rev Bras Zool** 21: 207-218.

PAIVA, S. R., DERGAM, J. A. & MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia** 560: 393-404, 2006

PAMPONET, V. C. C.; P. L. S. CARNEIRO, P. R. A. M. AFFONSO, V. S. MIRANDA, J. C. SILVA JUNIOR, C. G. OLIVEIRA & F. A. GAIOTTO. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 6(4): 621-630. 2008

PAZZA, R.; KAVALCO. K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 -Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenet Genome Res** 112: 313-319, 2006

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The Nucleus** 50: 519-543, 2007

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 61-66, 2008

PAZZA, R.; KAVALCO, S. A. F.; PENTEADO, P. R.; KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 2002-2010, 2008.

PRIOLI S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr, H. F., PAVANELLI, C. S.; Oliveira, A. V. CARRER, H.; CARRARO, D. M. PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genet Mol Biol** 25:421-430, 2002

PROTAS M, CONRAD M, GROSS JB, TABIN C, BOROWSKY R, (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. **Curr Biol** 17: 452–454.

ALMEIDA, F. F. M.; CARNEIRO, C. D. R.; Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências** v.28, p. 135-150, 1998.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, 6: 1045–1046. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01427.x, 2006.

STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Mol Ecol Notes** 3:150-151, 2003.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exp Cell Res** 75: 304-306, 1972.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** 10:512-526, 1993.

TAMURA, K, PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (In Press), 2011.

VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C.; New species of *Astyanax* (OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES: CHARACIDAE) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. **Copeia**, v-18, p 150-162, 2007.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, 52(4):627–640, 1992.

WEITZMAN, S, H.; MALABARBA, L. R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (TELEOSTEI: CHARACIFORMES) In: MALABARBA LR, REIS RE, VARI RP, LUCENA ZMS, LUCENA CA. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.