

FREDERICO MACHADO DE PINHO

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM DUAS ESPÉCIES DO
GÊNERO *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854 (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) NAS BACIAS DOS RIOS PARAÍBA DO
SUL E ITABAPOANA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

P654a Pinho, Frederico Machado de, 1980-
2017 Análises citogenéticas em duas espécies do gênero
Astyanax Baird & Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes) nas
bacias dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana / Frederico Machado
de Pinho. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Astyanax* (Peixe). 2. Citogenética. 3. Animais costeiros.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.

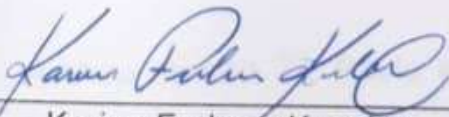
CDD 22 ed. 639.37

FREDERICO MACHADO DE PINHO

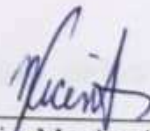
**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Astyanax BAIRD & GIRARD, 1854 (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) NAS BACIAS DOS RIOS PARAÍBA DO SUL
E ITABAPOANA**

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

APROVADA: 16 de outubro de 2017



Karine Frehner Kavalco



Natália Maria de Freitas Vicente



Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eliane e Carlos Alberto, meus irmãos Rafael e Aninha, meu primo-irmão Guilherme e familiares pelo apoio e suporte de sempre.

A Sarah, pelo amor, companheirismo, confidências, paciência, pranchas e principalmente pela Maria Flor.

Ao Professor Jorge Dergam pela orientação, confiança e conselhos.

Aos amigos do Beagle, Sanely, Bruno, Manu, Késsia, Cinthia, Christian, Nat, Ariana, Cássia, Mariane, Filipe, pela disponibilidade. A Marininha e Fred, por serem meus “coorientadores” nesse projeto, Nat Tranvezoli pela ajuda com o Photoshop.

Aos amigos de mestrado, Professor Renato Feio, Douglas, Henrique, Fernandinho, Jonas, Pedro Soneca, Carlinha, Sofia, Marcelão, Anderson Tibeijo pelo companheirismo, as telas azuis nas disciplinas, botecos, churrascos.

Aos amigos do Izabela, da UFV e aos amigos do campo, Gabriel Alkmin, João Carlos, Gustavo Mascarenhas (Bradock), Giancarlo, Alexandre Pirani, Sassá, Thaís Porfírio, Gabriel Arvelino (Sorin), Felipe Borges, Márcio Batista, Bertoldo, que de várias formas influenciaram na minha formação.

A meu mestre Zé Paulo e amigos da capoeira, pelos ensinamentos nas “rodas da vida”.

Ao Raul e equipe da Vert Ambiental pela disponibilização dos peixes usados nesse trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro, à Universidade Federal de Viçosa pela estrutura oferecida e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
4. RESULTADOS	10
5. DISCUSSÃO.....	13
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos das espécies: a) <i>Astyanax intermedius</i> ; b) <i>Astyanax taeniatus</i>	38
Figura 2. Mapa de localização de coleta dos espécimes.....	39
Figura 3. a) Cariótipo de <i>Astyanax intermedius</i> corado com Giemsa; b) FISH com sonda GA ₍₁₅₎ em <i>A. intermedius</i> ; e c) FISH com sonda CA ₍₁₅₎ em <i>A. intermedius</i>	40
Figura 4. a) Cariótipo de <i>Astyanax taeniatus</i> corado com Giemsa; b) Banda C em <i>A. taeniatus</i> ; c) variação de Ag-Nor em <i>A. taeniatus</i> ; d) variação de AgNor em <i>A. taeniatus</i> ; e) FISH 18S rDNA em <i>A. taeniatus</i> ; f) FISH 5S rDNA em <i>A. taeniatus</i> ; g) FISH com sonda GA ₍₁₅₎ em <i>A. taeniatus</i> ; h) FISH com sonda CA ₍₁₅₎ em <i>A. taeniatus</i>	43
Figura 5. Filogenia sugerida por Silva (2017), evidenciando a existência de dois grandes grupos de lambaris.....	44

RESUMO

PINHO, Frederico Machado de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Análises Citogenéticas em Duas Espécies do Gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes) nas Bacias dos Rios Paraíba do Sul e Itabapoana.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

O gênero *Astyanax*, o mais diverso da família Characidae, possui 146 espécies válidas que constituem um grupo bastante complexo do ponto de vista taxonômico e citogenético. Dentro deste táxon, dados morfológicos, citogenéticos e moleculares sugerem a existência de complexos de espécies, exemplificados nos grupos *Astyanax fasciatus*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax hastatus*. Esses complexos são caracterizados por grandes variações nas suas fórmulas cariotípicas, números diploides, morfologias cromossômicas, padrões de bandeamento C e regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Esse trabalho caracterizou citogeneticamente duas populações de *Astyanax* de bacias costeiras: uma população de *Astyanax intermedius* proveniente da sub-bacia rio Preto, bacia do rio Paraibuna na bacia do rio Paraíba do Sul, em Minas Gerais e *Astyanax taeniatus* proveniente da bacia do rio Itabapoana nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Foram utilizadas técnicas de citogenética clássica: coloração convencional (Giemsa), Banda C e AgNOR, além de técnicas citogenéticas moleculares: hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas 18S e 5S rDNA e de DNA repetitivo GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎. Ambas as espécies analisadas apresentaram número diploide $2n = 50$; o estado de caráter mais comum dentro do gênero; *Astyanax intermedius* apresentou fórmula cariotípica $6m + 8sm + 4st + 32a$ e *Astyanax taeniatus* apresentou $6m + 8sm + 36a$. Em *Astyanax taeniatus*, a banda C evidenciou pouca heterocromatina e as marcações foram predominantemente nas regiões subteloméricas em cromossomos meta e sub-metacêntricos, e na região pericentromérica de alguns cromossomos acrocêntricos; características que a diferenciam de outras espécies do gênero, as quais em geral apresentam

marcações nas regiões distais dos braços longos e nas regiões pericentroméricas dos cromossomos. As marcações com AgNOR, nesta espécie, foram múltiplas e variáveis, variando entre quatro e dez marcações, padrão também observado em outras espécies de *Astyanax*, mesmo que, em algumas espécies essa marcação se apresente em apenas um par. Os padrões de FISH obtidos com sondas 18S e 5S rDNA, apresentaram marcações múltiplas em *Astyanax taeniatus*, acumuladas em quatro e cinco pares cromossômicos, respectivamente, uma característica comum em *Astyanax*. Dez marcações com a sonda 5S rDNA também foram observadas em outras espécies do gênero, embora que um número menor de marcações também aconteça com outros *Astyanax*. Ocorreu sintenia entre essas duas sondas no par 12, um caráter compartilhado com outras espécies do gênero. As marcações da sonda 18S rDNA confirmaram parcialmente as marcações AgNOR, uma vez que com o tratamento com o nitrato de prata foram evidenciadas marcações adicionais. As sondas de DNA repetitivo GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎ ocorreram predominantemente nas regiões subteloméricas e pericentroméricas em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos; nos cromossomos acrocêntricos, as marcações ocorreram nas regiões subteloméricas e pericentroméricas em ambas as espécies, além de marcações intersticiais em *Astyanax taeniatus*, padrão similar ao observado em *Astyanax taeniatus* da bacia do rio Doce. Estes resultados corroboram a grande diversidade citogenética e grande complexidade existente dentro do gênero *Astyanax* nas bacias costeiras do sudeste brasileiro.

ABSTRACT

PINHO, Frederico Machado de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Cytogenetic Analysis in two Species from Genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes) from the Paraíba do Sul and Itabapoana River Basins.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The genus *Astyanax* is the most diverse one within the Characidae family. It currently comprises 146 described species and consists in a fairly complex group from the taxonomic and cytogenetic perspectives. The genus includes several complex groups such as the *Astyanax fasciatus*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax scabripinnis* and *Astyanax hastatus* groups. These groups have great variation in their karyotype formula, ploidy number, chromosomal morphology, C banding pattern and nucleolus organizer region (NORs). This work aims to provide the cytogenetic characterization of *Astyanax* populations from two coastal basins of Brazil: *Astyanax intermedius* from Rio Preto sub-basin, Rio Paraibuna basin within Rio Paraíba do Sul basin, Minas Gerais State; and *Astyanax taeniatus* from Rio Itabapoana basin, Rio de Janeiro and Minas Gerais States. Characterization consisted in classical methods of cytogenetic study: conventional coloration (Giemsa), C Banding, and AgNOR. In addition, we also performed molecular cytogenetic methods: *in situ* fluorescence (FISH) with probes of rDNA 18S and 5S, and repetitive DNA GA₍₁₅₎ and CA₍₁₅₎. Both analyzed species presented diploid number of chromosomes $2n = 50$, which is the most common character state within the genus. *Astyanax intermedius* presented caryotypical formula $6m + 8sm + 4st + 32a$, whereas *Astyanax taeniatus* had formula $6m + 8sm + 36a$. In the C banding, *Astyanax taeniatus* shows little heterochromatine with blocks located predominantly in the subtelomeric regions of meta and sub-metacentric chromosomes, and in the pericentromeric region of some acrocentric chromosomes. These later characters help distinguishing *Astyanax taeniatus* from the remaining species of the genus, which generally present heterochromatic blocks on the distal regions of the long arms and on the pericentromeric positions of chromosomes. AgNORs sites varied from four to ten, pattern also observed in other species of *Astyanax* (although in

some species this marking can also be seen on a single pair). The pattern from the FISH using 18S and 5S rDNA presented multiple sites in the pairs four and five of *Astyanax taeniatus*, respectively. Multiple sites from 18S are characteristic among *Astyanax*. Ten sites of 5S rDNA have already been observed in other species of the genus, even though fewer sites may also occur in some species. We observed synteny between these two probes on pair 12. Markings from 18S partially confirmed the ones acquired from AgNOR, given that silver nitrate treatment evidenced additional markings. Probes of repetitive DNA GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎ occurred predominantly on subtelomeric and pericentromeric regions of metacentric and submetacentric chromosomes. Additionally to the interstitial markings observed in *Astyanax taeniatus*, the acrocentric chromosomes presented markings on subtelomeric and pericentromeric regions of the chromosomes, a pattern also observed in the *A. taeniatus* from Rio Doce basin. Our results corroborate the great cytogenetic diversity and complexity observed in the genus *Astyanax* from the coastal basins of Southeast Brazil.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes fazem parte do grupo mais numeroso entre os vertebrados, representados por mais de 32000 espécies descritas (NELSON *et al.*, 2016). Desse total, 41% habitam estritamente ambientes de água doce. A região Neotropical possui a mais diversa e rica ictiofauna de água doce do mundo, com cerca de 50% da fauna conhecida (REIS *et al.*, 2003). A ictiofauna de água doce da América do Sul é a mais rica do mundo; Schaeffer (1998), baseado na compilação do número de espécies nominais descritas nas últimas décadas do século XX, considera que o número total de espécies dessa região biogeográfica possa chegar a 8000.

De acordo com Ribeiro (2006), a ictiofauna de drenagens costeiras do leste do Brasil é de grande significado biogeográfico. Essas drenagens são independentes, pequenas ou médias (CASTRO, 1999), isoladas das bacias hidrográficas continentais pela Serra do Espinhaço e da Mantiqueira (RIBEIRO, 2006; BUCKUP, 2011). Essas drenagens apresentam uma grande heterogeneidade ambiental em extensões relativamente curtas, caracterizadas por uma baixa riqueza de espécies de peixes continentais e elevado endemismo (BUCKUP, 1999).

A elevada diversidade de espécies endêmicas possivelmente foi determinada por processos geológicos locais, grandes mudanças climáticas e sucessivas transgressões e regressões marinhas durante o Quaternário (WEITZMAN *et al.*, 1988). Bizerril (1994) relatou que 95% das espécies de peixes pertencentes às bacias costeiras são endêmicas, sendo 23,4% de gêneros endêmicos. Pouco se conhece sobre a ictiofauna destas drenagens, as poucas e esparsas contribuições, geralmente, são sobre descrições de novas espécies (SARMENTO-SOARES *et al.*, 2005; BERTACO *et al.*, 2007) ou tratam-se de inventários taxonômicos englobando poucas drenagens ou pequenos trechos destas (SARMENTO-SOARES & MARTINS-FILHO, 2009; SARMENTO-SOARES & MARTINS-FILHO, 2014) e escassos e restritos trabalhos de citogenética (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2007; ALVES-SILVA & DERGAM, 2015; COUTINHO-SANCHES & DERGAM, 2015; TRAVENZOLI *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016). Fazem parte das bacias costeiras do leste brasileiro os

rios situados entre a foz do rio São Francisco (BA) e o rio Cubatão (SC) (RIBEIRO, 2006).

A fauna neotropical de peixes de água doce é composta em sua maioria por peixes da superordem Ostariophysi. Essa superordem compreende cinco ordens: Gonorynchiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes. Aproximadamente 77% das espécies pertencem às ordens Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes. Dentre essas ordens, as famílias mais diversificadas são Characidae, Loricariidae e Gymnotidae, respectivamente (JAVONILLO *et al.*, 2009).

A ordem Characiformes compreende 23 famílias com 2166 espécies descritas (ESCHEMEYER & FONG, 2017) e abrange quase um terço da ictiofauna sul-americana, apresentando grande diversificação de habitats e regimes alimentares (VAZ *et al.*, 2000). Os exemplares dessa ordem possuem notável diversidade de tamanhos, variando de espécies com poucos milímetros até espécies com mais de um metro de comprimento (WEITZMAN & VARI, 1988). A família Characidae é a mais complexa e diversa, abrangendo aproximadamente 52% das espécies desta ordem (ESCHEMEYER & FONG, 2017). Essa família conta com 145 gêneros e 1112 espécies válidas, porém, este número pode estar subestimado, em virtude do grande e crescente número de descrições de novas espécies. Somente nos últimos 10 anos (2007-2017) 221 novas espécies foram descritas nesta família (ESCHEMEYER & FONG, 2017). Seus representantes contam com uma vasta diversidade de formas e nichos ecológicos (WEITZMAN & MALABARBA, 1998), geralmente são de pequeno porte e apresentam uma grande variedade de regimes alimentares (SAZIMA, 1983), sendo encontrados em diversas drenagens nas principais bacias hidrográficas brasileiras e em populações isoladas em riachos (BUCKUP *et al.*, 2007).

Dentre os representantes da família Characidae, o gênero *Astyanax* destaca-se como o mais diverso, possuindo 146 espécies válidas (ESCHEMEYER & FONG, 2017). Popularmente conhecidos como lambaris ou piabas, essas espécies são vastamente distribuídas na América do Sul, ocorrendo do sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (EIGENMANN, 1921), desde pequenas lagoas com águas paradas até rios

de grande porte com áreas de correnteza e em diferentes altitudes (FROESE & PAULY, 2017). São animais onívoros e importantes como substrato trófico para espécies maiores (ANDRIAN *et al.*, 2001) e possuem grande capacidade de se ajustarem às condições ambientais e ao amplo espectro de interações nas assembleias de peixes (ORSI *et al.*, 2004). Além da importância na cadeia alimentar e no equilíbrio ecológico, também são apontados como dispersores de sementes (VILELLA *et al.*, 2002), demonstrado pela capacidade considerável de locomoção ao longo do rio e pela ampla dispersão e variedade de habitats que ocupam (LÓPEZ, 1978; UIEDA, 1984; MESCHIATTI, 1995; BERTACO *et al.*, 1998). Vilella *et al.* (2002) comprovaram a presença de sementes vegetais aparentemente intactas presentes no conteúdo estomacal de diferentes espécies de *Astyanax* provenientes do rio Maquié, bacia do rio Tramandaí (RS).

O gênero *Astyanax* pertencia à subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977), porém, por não apresentar evidências consistentes sobre seu monofiletismo, atualmente é classificado como gênero *incertae sedis* (LIMA *et al.*, 2003), sendo um grupo amplamente estudado em trabalhos de citogenética e evolução (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA & MOREIRA-FILHO, 1995; PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; TENÓRIO *et al.*, 2013; ABELINI *et al.*, 2014). *Astyanax* se apresenta com um grupo complexo taxonomicamente e citogeneticamente, revelando espécies muito semelhantes morfologicamente e com grande variabilidade cariotípica.

No gênero *Astyanax*, o número diploide varia de $2n = 36$ cromossomos em *Astyanax schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001) e *Astyanax correntinus* (PAIZ *et al.*, 2015) a $2n = 50$ cromossomos em *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax hastatus*, entre diversos outros (PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; KAVALCO *et al.*, 2009). Neste gênero são observados complexos de espécies em alguns grupos, que são caracterizados por grandes variações nas fórmulas cariotípicas, números diploides, morfologia cromossômica, padrão de bandeamento C, localização e variação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) (PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2012). Esses complexos acontecem ao

menos em quatro grupos: *A. fasciatus* (PAZZA *et al.*, 2006), *A. bimaculatus* (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2004), *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991) e *Astyanax hastatus* (KAVALCO *et al.*, 2009). No complexo *fasciatus*, é observada heterogeneidade cromossômica, diversidade na morfologia cromossômica e grande variação no número diploide ($2n = 45-50$) (MORELLI *et al.*, 1983; PAZZA *et al.*, 2008). Porém no complexo *bimaculatus* não são observadas variações numéricas, o número diploide se matem constate ($2n = 50$), no entanto apresentam citótipos diferentes, número e localização diferentes das NORs e variações na heterocromatina (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2004; PAZZA & KAVALCO, 2007; FERREIRA-NETO *et al.*, 2009).

O complexo *scabripinnis* é formado por um grupo de peixes que compreende ao menos 17 espécies (VICARI *et al.*, 2008), incluindo *Astyanax intermedius*. Com relação a caracteres morfológicos e cromossômicos, as espécies do complexo são bastante diversificadas (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991). Nesse complexo, o número diploide possui variação entre $2n = 46$ (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991), $2n = 48$ (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; SOUZA *et al.*, 1996; MIZOGUCHI & MARTINS-SANTOS, 1998; MAISTRO *et al.*, 2000; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002, FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2003; VICARI *et al.*, 2008) e $2n = 50$, sendo $2n = 50$ o mais comum (MORELLI *et al.*, 1983; MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991; MAISTRO *et al.*, 1998; FERRO *et al.*, 2001, ALVEZ & MARTINS-SANTOS, 2002; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005; KAVALCO *et al.*, 2007; PERES *et al.*, 2008; VICARI *et al.*, 2008). O caráter $2n = 50$ cromossomos é considerado ancestral nesse complexo e rearranjos do tipo translocação robertsoniana estariam relacionados com a origem de números diploides menores (VICARI *et al.*, 2008). As populações do complexo *scabripinnis* geralmente estão restritas a pequenos riachos ou cabeceiras de pequenos tributários (BRITSKI, 1972), constituindo populações isoladas.

Astyanax scabripinnis intermedius, foi descrita originalmente por Eigenmann em 1908, através de exemplares coletados nas bacias dos rios Paraíba do Sul, Mucuri, Itapemirim e Velhas (LEZAMA *et al.*, 2011). É considerada morfologicamente intermediária entre *Astyanax scabripinnis* e

Astyanax taeniatus. Sua localidade tipo são os rios Paraíba e Santa Clara (LIMA *et al.*, 2003). Sua distribuição é descrita para as bacias do rio Paraíba do Sul, rios costeiros do estado do Rio de Janeiro (BUCKUP, 2003) e rio Doce (LEZAMA *et al.*, 2011). O número diploide encontrado nessa espécie é $2n = 50$ (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003, Kavalco *et al.*, 2004; Kavalco *et al.*, 2007).

Astyanax taeniatus foi descrito em 1842 por Jenyns, sendo sua localidade tipo o tributário costeiro Socego, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Também ocorre na Bacia do rio Paraíba do Sul, na drenagem dos rios costeiros do Rio de Janeiro e Espírito Santo (LIMA *et al.*, 2003), na bacia do rio Doce (VIEIRA, 2006) e nas bacias dos rios São Mateus e Mucuri (POMPEU, 2010). O número diploide encontrado nessa espécie é $2n = 50$, porém, um estudo preliminar indica fórmulas cromossômicas diferentes para esta espécie (CUNHA *et al.*, 2016).

Considerando o grande e crescente número de estudos citogenéticos com populações de *Astyanax*, a importância biológica e biogeográfica das bacias costeiras e também o grande número de incertezas e dúvidas ainda existentes nesse gênero, este estudo visou contribuir com informações de citogenética clássica e molecular nas espécies *Astyanax intermedius* e *Astyanax taeniatus* coletados nas bacias dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana respectivamente, visando integrar os padrões de variação aqui levantados com outros trabalhos publicados no gênero e contribuir para uma compreensão mais objetiva das espécies do gênero nas bacias costeiras do sudeste brasileiro.

ARTIGO

ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854 (TELEOSTEI: CHARACIFORMES) DAS BACIAS DOS RIOS PARAÍBA DO SUL E ITABAPOANA

Frederico Machado de Pinho, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Frederico
Fernandes Ferreira, Marina Souza da Cunha

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia
Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa,
36570-900, Minas Gerais, Brasil.

2. INTRODUÇÃO

De acordo com Ribeiro (2006), a ictiofauna de drenagens costeiras do leste do Brasil é de grande relevância biogeográfica. Essas drenagens são independentes, de pequeno ou médio porte (CASTRO, 1999) e apresentam uma grande heterogeneidade de ambientes em extensões relativamente curtas, caracterizadas por uma baixa riqueza de espécies de peixes e elevado endemismo (BUCKUP, 1999). Bizerril (1994) relata que 95% das espécies de peixes pertencentes às bacias costeiras são endêmicas, sendo 23,4% de gêneros endêmicos. Este elevado endemismo é atribuído principalmente às espécies de peixes de pequeno porte, como peixes do gênero *Astyanax*, as quais de modo geral possuem baixa capacidade de deslocamento, não realizando migrações extensas durante suas vidas (BIZERRIL, 1994).

Pouco se conhece sobre a ictiofauna destas drenagens, as poucas e esparsas contribuições, geralmente, são sobre descrições de novas espécies (SARMENTO-SOARES *et al.*, 2005; BERTACO *et al.*, 2007) ou tratam-se de inventários taxonômicos englobando poucas drenagens ou pequenos trechos destas (SARMENTO-SOARES & MARTINS-FILHO, 2009; SARMENTO-SOARES & MARTINS-FILHO, 2014). Nesta região, os estudos citogenéticos são escassos e restritos a poucas espécies (KAVALCO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2013, COUTINHO-SANCHES & DERGAM, 2015; ALVES-SILVA & DERGAM, 2015; TRAVENZOLI *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016).

Astyanax é um grupo altamente complexo taxonomicamente e citogeneticamente, revelando espécies morfologicamente muito semelhantes e com grande variabilidade cariotípica. Neste gênero, o número diploide varia de $2n = 36$ em *A. schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001) e *A. correntinus*; (PAIZ *et al.*, 2015) a $2n = 50$ cromossomos em *A. scabripinnis*, *A. bimaculatus*, *A. hastatus*, dentre vários outros (VICARI *et al.*, 2006; PAZZA & KAVALCO, 2007; KAVALCO *et al.*, 2009). O número diploide $2n = 50$, se apresenta como o padrão mais observado entre as espécies do gênero (FERNANDES & MARTINS-

SANTOS, 2006; PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; FERREIRA NETO *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2016).

A diversidade cariotípica também ocorre entre indivíduos da mesma espécie, com variações numéricas e estruturais. No gênero *Astyanax*, são observados complexos de espécies em alguns táxons, onde fórmulas cariotípicas, números diploides, morfologia cromossômica, padrão de bandeamento C, localização e quantidade de NORs, são bastante variáveis dentro de cada espécie nominal (PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2012). Esses complexos acontecem ao menos em: *A. fasciatus* (PAZZA *et al.*, 2006), *A. bimaculatus* (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2004), *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991) e *A. hastatus* (KAVALCO *et al.*, 2009). O complexo *scabripinnis* é formado por um grupo de peixes que compreende ao menos 17 espécies (VICARI *et al.*, 2008), incluindo *Astyanax intermedius*.

Estudos citogenéticos se mostraram ferramentas úteis para detecção de espécies crípticas além de fornecerem informações para estudos evolutivos e compreensão de processos que levam a especiação (RIESEBERG, 2001). Afinidades moleculares das populações aqui estudadas com populações de *A. intermedius* e *A. taeniatus* (SILVA, com. pess.) levaram-nos a considerar cada população como *Astyanax intermedius* da bacia do Paraíba do Sul e *Astyanax taeniatus* da bacia do Itabapoana. Considerando o grande e crescente número de estudos citogenéticos em populações de *Astyanax*, a importância biológica e biogeográfica das bacias costeiras, bem como o grande número de incertezas e dúvidas ainda existentes nesse gênero, este estudo visou contribuir com informações de citogenética clássica e molecular em duas populações de peixes do gênero *Astyanax*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e um espécimes de *Astyanax intermedius* (FIGURA 1a) foram analisados: dois machos, onze fêmeas e oito com sexo indeterminado. Esses peixes foram coletados em um afluente do rio Preto, sub-bacia do rio Paraibuna, pertencente à bacia do rio Paraíba do Sul (UTM 23K, 619.375 E,

7.561.990 S). Essa drenagem fica localizada no município de Rio Preto, Minas Gerais (FIGURA 2).

Setenta e seis espécimes de *Astyanax taeniatus* (FIGURA 1b) provenientes da Pequena Central Hidrelétrica Calheiros (PCH Calheiros) (UTM 24K, 217.176 E, 7.675.487 S) e da região das cabeceiras do rio Itabapoana (UTM 24K, 200.711 E, 7. 703.232 S) foram analisados: 29 machos, 42 fêmeas e cinco com sexo indeterminado (FIGURA 2). Os pontos de coleta ficam localizados nos municípios de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro e Caiana em Minas Gerais, respectivamente.

Os cromossomos mitóticos metafásicos foram obtidos através de células do rim anterior conforme BERTOLLO *et al.* (1978). Primeiramente, os peixes foram anestesiados e eutanasiados em solução aquosa de óleo de cravo com concentração de 300 mg.L⁻¹ (LUCENA *et al.*, 2013) conforme aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, autorização número 84/2015. Os exemplares de ambas as espécies, após processadas, foram fixados em formaldeído 10%, transferidos para solução de etanol 70% e se encontram em processo de tombamento na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa.

Para a caracterização da fórmula cromossômica e do número diploide, os cromossomos obtidos foram corados com coloração convencional (Giemsa na concentração de 10%). Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão entre o tamanho dos braços (RB), sendo definidos como: metacêntricos (RB = 1,0 a 1,70), submetacêntricos (RB = 1,71 a 3,00), subtelocêntricos (RB = 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB > 7,01) (LEVAN *et al.*, 1964). O número de braços cromossômicos (Número Fundamental, NF) foi determinado de acordo com a razão de braços cromossômicos, onde os cromossomos acrocêntricos foram considerados com um braço e os demais com dois braços.

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi evidenciado pela banda C (SUMNER, 1972, com modificações), corados com DAPI e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas através da impregnação por nitrato de prata (AgNORs) (HOWELL & BLACK, 1980). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi

utilizada para localização dos genes de DNA ribossomal e também na detecção de padrões de marcação de DNA repetitivos microssatélites. Para a localização dos genes de DNA ribossomal foram utilizadas as sondas 18S rDNA e 5S rDNA, obtidas por PCR a partir do DNA nuclear da espécie *Hoplias malabaricus* e primers específicos (NS1= 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8= 5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3'). Para a localização do DNA repetitivo foram utilizadas as sondas GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎ (PINKEL *et al.*, 1986, com modificações). As sondas ribossomais foram marcadas com Digoxigenina utilizando o kit Dig-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) e as sondas microssatélites foram marcadas comercialmente na sua extremidade 5' com o fluoróforo Cy3 (Sigma).

As metáfases foram registradas através de uma câmera Olympus DP73 acoplada em microscópio epifluorescente Olympus BX53 e capturadas com o software Olympus CellSens®. Os cariótipos foram analisados e medidos com auxílio do software Image Pro Plus®. Todas as metodologias e técnicas descritas foram utilizadas na caracterização da espécie *Astyanax aff. taeniatus*; já na espécie *Astyanax aff. intermedius* foram utilizadas as técnicas de coloração convencional (Giemsa) e FISH com as sondas GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎.

4. RESULTADOS

Os espécimes de *Astyanax intermedius* apresentaram número diploide $2n = 50$ com fórmula cariotípica $6m + 8sm + 4st + 32a$ e número fundamental, $NF = 68$, sem diferenciação entre machos e fêmeas (FIGURA 3a). A sonda de DNA repetitivo microssatélite GA₍₁₅₎ apresentou marcações preferencialmente nas regiões subteloméricas em cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, já em cromossomos acrocêntricos, o padrão de marcação foi variado, ocorrendo nas regiões subteloméricas, pericentroméricas e em regiões intersticiais (FIGURA 3b).

A sonda CA₍₁₅₎ evidenciou marcações nas regiões pericentroméricas e na região subtelomérica em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Em cromossomos subtelocêntricos, as regiões marcadas foram a extremidade do braço menor, a região pericentromérica e a região

subtelomérica. Em cromossomos acrocêntricos, assim como na sonda GA₍₁₅₎, o padrão foi variado, apresentando cromossomos com marcações nas regiões subteloméricas e pericentroméricas (FIGURA 3c).

Os espécimes de *Astyanax taeniatus*, por sua vez, apresentaram $2n = 50$, com fórmula cariotípica $6m + 8sm + 36a$ e número fundamental, $NF = 64$, sem diferenciação entre machos e fêmeas (FIGURA 4a). O bandeamento C evidenciou pouca heterocromatina constitutiva, localizada nas regiões subteloméricas, principalmente em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, e na região pericentromérica em cromossomos acrocêntricos (FIGURA 4b). Com o bandeamento das NORs com nitrato de prata (AgNORs) foram observadas marcações múltiplas, com variação intrapopulacional, apresentando de quatro a dez sítios localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos (FIGURAS 4c e 4d).

A técnica de FISH com a sonda 18S apresentou marcações múltiplas, marcando quatro pares de cromossomos na espécie *Astyanax taeniatus*. Os pares marcados foram os pares 12, 15, 22 e 25, todos são acrocêntricos e as marcações foram identificadas na região pericentromérica (FIGURA 4e). As marcações de AgNORs coincidiram parcialmente com as marcações de FISH, uma vez que marcações adicionais foram observadas com o nitrato de prata. O 5S rDNA foi localizado na região pericentromérica em cinco pares cromossômicos: todos acrocêntricos, pares 12, 16, 19, 21 e 24 (FIGURA 4f). A técnica de FISH utilizando as sondas 18S e 5S rDNA evidenciou ainda sintenia destas regiões no par 12.

O FISH com a sonda GA₍₁₅₎ em *Astyanax taeniatus* evidenciou marcações nas regiões subteloméricas de ambos os braços cromossômicos em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, além de uma marcação na região intersticial do primeiro par metacêntrico. Já em cromossomos acrocêntricos, marcações subteloméricas, pericentroméricas e intersticiais foram observadas, assim como em *Astyanax intermedius* (FIGURA 4g). As marcações com a sonda CA₍₁₅₎ foram evidenciadas nas regiões pericentroméricas e subteloméricas em ambos os braços em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos; nas extremidades dos braços menores; em cromossomos acrocêntricos, as marcações foram

evidenciadas nas regiões subteloméricas, pericentroméricas e em regiões intersticiais, similar ao observado com a sonda GA₍₁₅₎ (FIGURA 4h).

5. DISCUSSÃO

Ambas as espécies estudadas, *Astyanax intermedius* e *Astyanax taeniatus*, apresentaram número diploide $2n = 50$, padrão mais observado entre as espécies do gênero (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006; PAZZA & KAVALCO, 2007; VICARI *et al.*, 2008; FERREIRA NETO *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2016).

Astyanax intermedius é hoje considerado como membro do complexo *A. scabripinnis* (MELO, 2001). O número diploide obtido nesse estudo corroborou outros estudos com outra população dessa espécie (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2007). O caráter $2n = 50$ cromossomos é considerado ancestral no complexo *scabripinnis* e rearranjos do tipo translocação robertsoniana estariam relacionados com a origem de números diploides menores (VICARI *et al.*, 2008), constituindo uma notável diferença do padrão evolutivo com as espécies pertencentes a outros complexos, como o complexo *bimaculatus* onde o número diploide se mantém constante (FERNANDES & MARTINS SANTOS, 2006; KAVALCO *et al.*, 2011; PACHECO *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2012). Dentro do complexo *fasciatus*, o padrão para o número diploide também se apresenta bastante heterogêneo. Nesse complexo, foram registradas espécies com número diploide $2n = 45$ (DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001, PAZZA *et al.*, 2006), $2n = 46$ (TORRES-MARIANO & MORELLI, 2006; ABEL *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2008), $2n = 47$ (PAZZA *et al.*, 2006; DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001), $2n = 48$ (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1986; PAZZA *et al.*, 2008), $2n = 49$ (ARTONI *et al.*, 2006; KAVALCO *et al.*, 2016) e $2n = 50$ (ARTONI *et al.*, 2006; KAVALCO *et al.*, 2016).

A fórmula cariotípica apresentada no presente estudo em *Astyanax intermedius* ($6m + 8sm + 4st + 32a$) corrobora a fórmula cariotípica encontrada em uma população da mesma espécie em outras localidades (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2007), porém difere da fórmula apresentada por outras espécies do complexo *scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000; MAISTRO *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2015). No complexo *scabripinnis*, predomina um grande

número de cromossomos metacêntricos e principalmente submetacêntricos, enquanto que no presente trabalho, ocorre uma grande quantidade de cromossomos acrocêntricos, conforme descrito em outras populações costeiras (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2007).

As espécies de *Astyanax* do complexo *scabripinnis* da bacia do rio Paraná tendem a formar pequenas populações isoladas em cabeceiras de córregos, o que facilitaria o estabelecimento de mudanças cromossômicas que podem levar ao polimorfismo (BARBOSA *et al.*, 2017), fato que poderia explicar a variabilidade cariotípica entre populações neste complexo (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004; VICARI *et al.*, 2008; ABELINI *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2015; NISHIYAMA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016). É atribuído ao isolamento geográfico, principalmente em cabeceiras de pequenos riachos, a ocorrência de eventos sucessivos de rearranjos cromossômicos, fixados independentemente nas populações locais, diferenciando-as (SOUZA & MOREIRA-FILHO, 1995; ALVES & MARTINS-SANTOS, 2002). As barreiras responsáveis por esse isolamento podem ser físicas (velocidade do fluxo ou tipo de leito), químicas (verificadas na composição da água) ou bióticas (movimentos da superfície da água) (LOWE-MCCONNELL, 1969), ou mesmo a competição com outras espécies ou por diferentes predadores, restringindo o fluxo gênico e reforçando a condição alopátrica entre eles (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003).

A população de *Astyanax taeniatus* do rio Itabapoana apresentou fórmula cariotípica $6m + 8sm + 36a$, diferente dos cariótipos observados em populações identificados como da mesma espécie, provenientes da bacia do rio Doce (CUNHA *et al.*, 2016). Cunha *et al.* (2016) apontaram dois citótipos diferentes em simpatria, ambos com grande número de cromossomos subtelocêntricos, padrão não observado nas populações do rio Itabapoana.

A heterocromatina constitutiva localizada na região pericentromérica dos cromossomos é considerada uma característica basal em peixes (MEDRADO *et al.*, 2012), mesmo que dentro do gênero *Astyanax* esse padrão possa ser bastante variado. Na população de *Astyanax* aff. *taeniatus* aqui estudada, os blocos de heterocromatina foram evidenciados principalmente nas regiões subteloméricas e centroméricas. Nas populações

de *Astyanax taeniatus* provenientes do rio Doce, a heterocromatina foi observada preferencialmente na região centromérica em todos os cromossomos, com marcações adicionais na região pericentromérica de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (CUNHA *et al.*, 2016). Dentro do complexo *fasciatus*, as regiões distais dos braços longos de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos foram evidenciadas pelo bandeamento C (PAZZA *et al.*; 2008; FERNANDES *et al.*, 2009), diferentemente de *A. altiparanae*, onde os blocos de heterocromatina se apresentaram em regiões intersticiais (DANIEL-SILVA & ALMEIDA-TOLEDO, 2001; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2004). Em populações de *A. scabripinnis*, a localização predominante dos blocos heterocromáticos se deram nas regiões teloméricas dos braços longos de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (MAISTRO *et al.*, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2000; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2003; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2005). Essa variação também foi observada em *A. hastatus*, que possui pouca heterocromatina constitutiva localizada principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (KAVALCO *et al.*, 2009).

A presença de heterocromatina em regiões pericentroméricas e subteloméricas facilitaria o intercâmbio entre cromossomos homólogos com posterior amplificação, sugerindo que a heterocromatina frequentemente desempenhe um papel importante na evolução cromossômica dos peixes (GALETTI *et al.*, 1991; MARGARIDO & GALETTI, 1999).

As marcações com o nitrato de prata variaram de 4 a 10 marcações em *Astyanax* aff. *taeniatus*. A ocorrência de AgNORs múltiplas são muito observadas no gênero *Astyanax* (MANTOVANI *et al.*, 2000; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2001; SOUZA *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2005; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006; PACHECO *et al.*, 2011; FERREIRA-NETO *et al.*, 2012; TENÓRIO *et al.*, 2013, CUNHA *et al.*, 2016). Cunha *et al.* (2016), relataram marcações múltiplas e variáveis em *A. taeniatus* proveniente da bacia do rio Doce. Resultado similar foi relatado em *A. fasciatus*, *A. altiparanae*, *A. janeiroensis* e *A. paranae* (ARTONI *et al.*, 2009). FERNANDES & MARTINS-FILHO (2006), trabalhando com *A. scabripinnis*, da bacia do rio Ivaí no Paraná,

constatarem um citótipo com até 13 marcações com o nitrato de prata. Em outra população de *A. scabripinnis*, de Campos do Jordão, em São Paulo, foram encontradas marcações em dois pares de cromossomos; um par metacêntrico e outro submetacêntrico (BARBOSA *et al.*, 2017). No entanto, algumas espécies como *Astyanax jacuhiensis* (SILVA *et al.*, 2013), *Astyanax bimaculatus* (KAVALCO *et al.*, 2011) e *A. altiparanae* (PERES *et al.*, 2008) apresentam padrão de marcação simples, com apenas um par marcado por esta técnica.

Marcações simples das AgNOR (em apenas um par) é a condição mais frequente em algumas espécies dulcícolas como nas famílias, Prochilodontidae (PAULS & BERTOLLO, 1990), Anostomidae (GALETTI *et al.*, 1984), Parodontidae (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1985) e Bryconidae (TRAVERNIZOLI *et al.*, 2015).

Os resultados aqui encontrados com a sonda 18S rDNA evidenciaram marcações em quatro pares de cromossomos acrocêntricos. Estudos realizados com o gênero *Astyanax* indicam que o número de sítios e a localização do 18S rDNA se apresentam muito variáveis (NÉO *et al.*, 2000, FERRO *et al.*, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2005). Em duas populações de *A. taeniatus* foram evidenciadas marcações em quatro e cinco pares de cromossomos (CUNHA *et al.*, 2016). Em *A. fasciatus*, foram observadas de quatro marcações (PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013) a dez marcações (FERREIRA-NETO *et al.*, 2012). Em *A. scabripinnis*, assim como em *A. fasciatus*, as marcações com a sonda 18S rDNA se mostraram igualmente variáveis, sendo relatadas desde quatro, seis, treze, quatorze e até dezesseis marcações (FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006; VICARI *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2015). No entanto, em outras espécies, como em *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis*, foi observada uma marcação simples (PACHECO *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2012).

No presente estudo, o número de marcações com a AgNORs foi confirmada parcialmente pela sonda 18S rDNA; porém, o número de marcações com as AgNORs foi maior que o observado com a sonda ribossomal. A ausência de correlação entre essas duas técnicas pode ser reflexo de marcações inespecíficas da prata, uma vez que ela marca indiretamente os sítios organizadores do nucléolo através da marcação de

proteínas argentofílicas presentes nestes sítios (HOWELL, 1987), assim as demais marcações seriam provavelmente regiões heterocromáticas com proteínas ácidas que têm afinidade pela prata (PACHECO *et al.*, 2011).

Em espécies de *Astyanax* com distribuição continental tais como *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *Astyanax lacustris* e *A. scabripinnis*, ao menos os *loci* de 5S rDNA localizados no par metacêntrico parecem ser conservados (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004; MANTOVANI *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2008; PANSONATO-ALVES, *et al.*, 2013), já em espécies com distribuição costeiras, como *Astyanax giton*, *A. intermedius*, *A. riberae*, *A. taeniatus* e o *Astyanax* aff. *taeniatus*, o padrão varia, pois esse marcador característico no par metacêntrico é ausente (KAVALCO *et al.*, 2004; KAVALCO *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2016). Nos espécimes de *Astyanax* aff. *taeniatus* analisados neste trabalho foram visualizadas marcações com a sonda 5S rDNA em cinco pares cromossômicos, todos acrocêntricos, localizadas em posição centromérica, confirmando o padrão “costeiro”.

No entanto, múltiplas marcações com a sonda 5S rDNA têm sido observadas em várias espécies do gênero *Astyanax*. Em uma população de *A. taeniatus*, da bacia do rio Doce em Minas Gerais, foram evidenciadas oito marcações com a sonda 5S rDNA (CUNHA *et al.*, 2016), em *Astyanax scabripinnis*, da região de Campos do Jordão, São Paulo, foram evidenciadas oito marcações (FERRO *et al.*, 2001). Em *Astyanax riberae*, espécie endêmica da bacia Ribeira do Iguapé, no estado de São Paulo, Brasil, foram evidenciadas seis marcações com essa sonda (KAVALCO *et al.*, 2010). Por outro lado, em espécies do complexo *bimaculatus* e em *Astyanax xavante*, foram registradas apenas marcações simples (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERNANDES & MARTINS-SANTOS, 2006; PERES *et al.*, 2008; PACHECO *et al.*, 2011; TOLEDO *et al.*, 2013).

Os genes 5S e 18S frequentemente estão situados em arranjos independentes e em ambientes cromossômicos distintos, representando o cenário mais comum para o arranjo dos genes ribossomais nos peixes (GALETTI JR. & MARTINS, 2004), embora, com menos frequente, aconteça em sintonia (HATANAKA & GALETTI, 2004; CASTRO *et al.*, 2014; FAVARATO *et al.*, 2016). Em *Astyanax* aff. *taeniatus*, a sintonia entre esses

dois genes aconteceu em um par de cromossomos acrocêntricos, no par 12. No gênero *Astyanax*, a sintenia também foi observada em *A. fasciatus* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERREIRA-NETO *et al.*, 2012), em *Astyanax goyacensis* (SANTOS *et al.*, 2013), em *A. paranae* (SANTOS *et al.*, 2016) e em algumas populações do complexo *bimaculatus* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002). A sintenia entre esses dois genes ribossômicos é considerada uma característica derivada em termos de organização genômica e evolução cromossômica podendo ocasionar translocações indesejáveis de sequências de 5S rDNA pela associação ao 18S rDNA, não permitindo a evolução destes genes de forma independente (MARTINS & GALETTI JR., 2000).

A distribuição dos microssatélites GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎ em *Astyanax intermedius* e *Astyanax taeniatus* ocorreu preferencialmente nas regiões subteloméricas na maioria dos cromossomos, embora algumas marcações adicionais centroméricas e intersticiais também tenham ocorrido em ambas as espécies. A sonda CA₍₁₅₎ evidenciou marcações pericentroméricas em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, nas duas espécies aqui estudadas, padrão também evidenciado em outras populações de *Astyanax taeniatus* (CUNHA *et al.*, 2016). Até a data, estes são os únicos dados publicados no gênero *Astyanax* com o uso deste tipo de sondas.

Em outras espécies de Characiformes, como *Hoplias malabaricus* (CIOFFI *et al.*, 2011), *Triportheus trifurcatus* (YANO *et al.*, 2014), *Leporinus conirostris* e *Leporinus obtusidens* (POLTRONIERI *et al.*, 2014), os microssatélites GA₍₁₅₎ e CA₍₁₅₎ foram evidenciadas nas regiões terminais de todos ou de quase todos os cromossomos. Em *Danio rerio* e em *Triportheus auritus*, ambas as sondas foram preferencialmente localizadas nas regiões pericentroméricas e centroméricas (SHIMODA *et al.*, 1999; CIOFFI *et al.*, 2012). Os microssatélites são acumulados em regiões tipicamente heterocromáticas como telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais (MARTINS, 2007; CIOFFI *et al.*, 2012), onde uma fração significativa de DNAs repetitivos é encontrada (CIOFFI & BERTOLLO, 2012).

Uma análise comparativa dos dados obtidos neste trabalho e em outros estudos já publicados corroboram a grande diversidade citogenética dentro do gênero *Astyanax*. Porém, quando os padrões citogenéticos são

analisados sob uma perspectiva biogeográfica, eles também podem indicar marcadores cromossômicos em alguns clados, conforme comprovado no caso da família Bryconidae da região sudeste (TRAVERNIZOLI *et al.*, 2015). As espécies das bacias costeiras do leste do Brasil são as únicas, dentro dos gêneros *Brycon* e *Henochilus*, que apresentam uma NOR em um par de cromossomos subtelocêntricos e ausência de equilocação de blocos de heterocromatina no primeiro par de cromossomos; dados moleculares mitocondriais e nucleares são consistentes com este monofiletismo (TRAVERNIZOLI *et al.*, 2015). No caso da espécie *Astyanax* aff. *taeniatus*, as características cariotípicas são semelhantes ao esperado das espécies de distribuição costeira, sugerindo uma história independente das populações de algumas espécies de *Astyanax* continentais.

Com base em dados moleculares e morfológicos, SILVA (2017) propõe a existência de dois grandes grupos de lambaris no sudeste brasileiro: o grupo “*Astyanax*”, o qual inclui *Astyanax paranae*, *Astyanax fasciatus*, *Astyanax altiparanae*, *Astyanax scabripinnis* entre outros, e o grupo “Probolodini”, que inclui *A. taeniatus*, *A. hastatus*, *Deuterodon* spp. e *Deuterodon pedri*, *Astyanax jenynsii*, *Astyanax giton*, *Astyanax intermedius* e *Astyanax ribeirae* (FIGURA 5). As três últimas espécies foram também indicadas como representativas do cariótipo “costeiro” por KAVALCO *et al.* (2004; 2010). Enquanto as espécies do grupo “*Astyanax*” apresentam marcações com a sonda 5S rDNA em um par de cromossomos metacêntricos, as espécies do grupo “costeiro”, como no caso do presente estudo, apresentam marcações com a sonda rDNA 5S restritas a cromossomos acrocêntricos (KAVALCO *et al.*, 2004; 2010) ou restritas a cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (KAVALCO *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2016).

Tal diversidade só pode ser mantida se os ambientes fluviais de primeira ordem forem protegidos. A citogenética de peixes associada a estudos ecológicos é uma importante ferramenta para a compreensão da dispersão e da distribuição das espécies, verificando tendências evolutivas diferentes gerando a diversificação no gênero *Astyanax* e dos padrões biogeográficos da região neotropical.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES A. L.; MARTINS-SANTOS, I.C. (2002) Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) with $2n = 48$ chromosomes. *Cytologia* 67:117-122.

ALVES-SILVA, A. P.; DERGAM, J. A. (2015) Cryptic Speciation Within the Neotropical Cichlid *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Teleostei Cichlidae): A New Paradigm in Karyotypical and Molecular Evolution. *Zebrafish* 12: 91-101.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (2009) Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19: 393–401.

ARTONI; R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (2006) Banding pattern of and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetics and Molecular Biology* 127: 277-284.

BARBOSA, P.; LEAL, A. V.; SILVA, M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F. (2017) Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Comparative Cytogenetics* 11: 143–162.

BERTACO, V. A.; LUCENA, Z. M. S.; BECKER, F. G. (1998) Variação espacial e temporal na abundância de *Astyanax bimaculatus* e *Astyanax fasciatus* (Characidae) no lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS* 11: 61-89.

BERTACO, V. A.; MALABARBA, L. R.; DERGAM, J. A. (2007) New *Hyphessobrycon* from the upper rio Pardo drainage in eastern Brazil (Teleostei: Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 5: 245-249.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética 1: 103–120.

BIZERRIL, C. R. S. F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. Acta Biologica Leopoldensia 16: 51-80.

BRITSKI, H. A. (1972) Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática, p. 79-108. In: Poluição e Piscicultura. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura.

BUCKUP, P.A. (1999) Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (eds.), Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VI. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. p. 91-138.

BUCKUP, P.A. (2003) *Astyanax*; p. 110. In REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. JR. (ed.) Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 729p.

BUCKUP, P. A. (2011) The Eastern Brazilian Shield. In: JS Albert & RE Reis Historical, editor. Biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California: EUA.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M.S. (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.(2014) Evidence of incipient speciation in *Astyanax*

scabripinnis species complex (Teleostei: Characidae). Neotropical Ichthyology 12: 429–438.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V., VICARI, M. R., ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. (2015) Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. Reviews in Fish Biology and Fisheries 25: 231-244.

CASTRO, R. M. C. (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (eds.), Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VI. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil, p. 139-155.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. C. (2012) Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: GARRIDO-RAMOS, M. A. (ed) Repetitive DNA Genome Dynamics 7: 197-221.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKÝ, E.; BERTOLLO, L. A.C. (2011) The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. Cytogenetic and Genome Research, 132:289–296.

CIOFFI, M. B.; MOLINA, W. F.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. (2012) Chromosomes as tools for discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family. In: Padma Tirunilai (ed) Recent trends in cytogenetic studies- Methodologies and applications, 1st edn, InTech, 125-146.

COUTINHO-SANCHES, N.; DERGAM, J. A. (2015) Cytogenetic and Molecular Data Suggest *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1907 (Teleostei: Characidae) Is a Member of an Ancient Coastal Group. Zebrafish 12: 357-365.

CUNHA, M. S.; REIS, V. J. C.; DERGAM, J. A. (2016) Closely Related Syntopic Cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. *Zebrafish* 13:112-117.

DA SILVA, L. L. L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. (2012) Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, using in situ hybridization with the 18S rDNA probe, DAPI and CMA₃ staining. *Folia Biologica (Kraków)* 60: 135-140.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* 54: 209-215.

EIGENMANN, C. H. (1921) The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College)*, New York, 43: 209-310.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Versão eletrônica acessado em 02 de junho de 2017.

FAVARATO, R. M.; SILVA, M.; OLIVEIRA, R. R.; ARTONI, R.F.; FELDBERG, E.; MATOSO, D. A. (2016) Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13: 103-111.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. (2003) Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin, PR, Brazil. *Cytologia* 68: 289-293.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141: 328-332.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivaí basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124: 301-306.

FERNANDES, C.A.; I.C. MARTINS-SANTOS. (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29: 464-468.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; BAILLY, D. (2009) Karyotype Analysis and Mapping of the 18S and 5S Ribosomal Genes in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) from Paranapanema River Basin. *Cytologia* 74: 295–300.

FERREIRA-NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. (2009) Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology* 32:792-796.

FERREIRA-NETO M.; R. F. ARTONI; M. R. VICARI; O. MOREIRA-FILHO; J. P. M. CAMACHO; M. BAKKALI; C. OLIVEIRA; F. FORESTI. (2012) Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics* 6: 29-40.

FERRO, D. A. de M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55-62.

FROESE, R'; D. PAULY. (Ed). (2017) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (06/2017). Acessado em 01 de junho de 2017.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (1984) Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing regions. *Caryologia* 37: 401-406.

GALETTI JR., P.M.; MESTRINER, C.A.; VÊNERE, P.C.; FORESTI, F. (1991) Heterochromatin and karyotypic reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenetics and Cell Genetics* 56: 116-121.

GALETTI JR., P. M.; C. MARTINS. (2004) Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Pp. 61-88. In: Guerra, M. (Ed.). *FISH: conceitos e aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.

GÉRY, J. (1977). *Characoids of the world*. Neptune City, T.F.H. Publications, 672 p.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. (2007) Peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá, EDUEM. 308p.

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

HOWELL, W. M. (1987). Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* 62: 361-367.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

JAVONILLO, R.; BURNS, J. R.; WEITZMAN, S. H. (2009). Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophysi. p. 723-763. In: *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and*

Bony fishes). Phylogeny - Reproductive System Viviparity - Spermatozoa. Jamieson, B. G. M. (ed.) Science Publishers, Enfield.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2001) Estudos citogenéticos em *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) del río Paraná, Argentina. Revista de Ictiologia 9: 21-24.

KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2007) Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). Zebrafish 4:103-111.

KAVALCO, K. F.; BRANDÃO, K. O.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2009) *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? Genetic and Molecular Biology 32:477-483.

KAVALCO, K. F.; 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, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. Cytogenetic and Genome Research 106:107-110.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2007). Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) Genetics and Molecular Biology, 30, 3, 529-535.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2010) Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. The Nucleus 53: 51–54.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. D. O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2011) Comparative cytogenetics and molecular

phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* - *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). Cytogenetic and Genome Research 134: 108-119.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K. O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2016) Chromosomal Diversification Higher Than Molecular Variation in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae). Zebrafish 13: 345-353.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBREG, A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

LEZAMA, A. Q.; TRIQUES, M. L.; QUEIROZ, F. M. (2011) *Astyanax intermedius* Eigenmann, 1908 (Actinopterygii: Characiformes: Characidae): Distribution extension in eastern Brazil. Check List, (7:5) p. 583-584.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P. (2003) Genera incertae sedis in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil p. 104-169.

LÓPEZ, S. M. I. (1978) Migración de la sardina *Astyanax fasciatus* (Characidae) en el río Tempisque, Guanacaste, Costa Rica. Revista de Biología Tropical 26: 261-275.

LOWE-MCCONNELL, R. H. (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. Biological Journal of the Linnean Society 1: 51-75.

LUCENA, C. A.; CALEGARI, B.; PEREIRA, E.; DALLEGRAVE, E. (2013) O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia 105: 20-24.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (1998) Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae*

(Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Genetics and Molecular Biology 21: 201-206.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). Genetics and Molecular Biology 23: 365-369.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2001) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). Genetica 110: 177-183.

MANTOVANI, M.; SANTOS, A. L. D.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. Genetica 109: 161-168.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S. A.; MOREIRA-FILHO, O. (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Genetica 123: 211-216.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR, P. M. (1996) Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). Cytobios 85: 219-228.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR, P. M. (1999), Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). Genetics and Molecular Biology 22: 357-361.

MARTÍNEZ, P.; CASTRO, J. B. G.; BOUZA, C. HERMIDA, M.; VILAS, R. (2009) High AgNOR site variations associated to a secondary contact in brown trout from the Iberian Peninsula. Genetica 136: 419-427.

MARTINEZ, E. R. M.; ALVES, A. L.; SILVEIRA, S. M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (2012) Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti & Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comparative Cytogenetics* 6: 41-51.

MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. (2000) Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 8: 353-355.

MARTINS, C. (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: Pizano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG, editors. *Fish Cytogenetics*. Enfield: Science Publishers. p. 421-452.

MEDRADO, A. S.; RIBEIRO, M. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S.; COSTA, M. A. (2012) Cytogenetic divergence in two sympatric fish species of the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35: 797-801.

MELO, F.A.G. (2001) Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivos do Museu Nacional* 59: 1-46.

MESCHIATTI, A. J. (1995) Alimentação da comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi Guaçu, SP. *Acta Limnologica Brasiliensia* 7: 115-137.

MESTRINER, C. A.; GALETTI JR, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. (2000) Structural and functional evidence that B-chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. (1998) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. Genetic and Molecular Biology 21(1).

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (1986) Estudo cariotípico nos grupos *fasciatus* e *scabripinnis* (Teleostei, Characiformes, Characidae). 3º Symposium on Cytogenetic and Evolutionary Applied Neotropical Fish, São Carlos, p 50.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces Characidae): a species complex. Revista Brasileira de Genética 14: 331-357.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. (1985) Karyotypic studies of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). Caryologia 38: 47-55.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P. M.; BERTOLLO, L. A.C. (2004) B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. Cytogenetic and Genome Research 106: 230-234.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, A. S. (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). Karyotypic variability. Caryologia 36: 235-244.

NELSON, J. S.; GRANDE, T.; WILSON, M., V., H. (2016). Fishes of the World (5th ed.). John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. 707 p.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural

Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108: 211-215.

NISHIYAMAA, P. B. ; VIEIRA, M. M. R. ; PORTO, F. E. ; BORIN, L. A. ; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; SANTOS, I. C. M. (2016) Karyotypic diversity among three species of the genus *Astyanax* (Characiformes: Characidae). *Brazilian Journal of Biology* 76: 360-366.

OLIVEIRA, M. L. M., UTSUNOMIA, R.; PANSOLATO-ALVES, J. C., SCACCHETTI, P. C., PRIMO, C. C.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.(2016) Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology* 14: 405-412.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. (2004) Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 207-218.

PACHECO, R. B.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; JÚLIO JR., H. F.; DIAS, A. L. (2011) Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetics* 5: 237-246.

PAIZ, L. M.; BAUMGÄRTNER, L.; DA GRAÇA, W. J.; MARGARIDO, V.P. (2015) Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. *Comparative Cytogenetics* 9: 51-65.

PANSONATO-ALVES, J. C.; HILSDORF, A. W. S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. M. Z. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI F. (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal

differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). Cytogenetic and Genome Research 141: 133-142.

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. (1983) Evidence for a system of a supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Caryologia 36: 207-314.

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

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

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

PEREIRA, T. L.; SANTOS, U.; SCHAEFER, C.; CARLOS, E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. (2013) Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. Journal of Biogeography 40: 905-914.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). Genetics and Molecular Biology 31: 222-226.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A.C.; BUCKUP, P. A.; BLANCO, D. R.; KANTEK, D. L. Z.; MOREIRA-FILHO, O. (2012) Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax bimaculatus* group (Characiformes: Characidae). Reviews in Fish Biology and Fisheries 22: 519-526.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 2934-2938.

POMPEU, O. S. (2010) Os peixes do rio Mucuri. In: Relatório do Instituto Estadual de Florestas – MG. p. 36–43, MG.BIOTA, Belo Horizonte.

POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L. A.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. (2014) Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): Unequal accumulation on the W chromosomes. Cytogenetic and Genome Research 142: 40–45.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. (2003) Check list of freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, p.742.

RIBEIRO, A. C. (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. Neotropical Ichthyology 4: 225-246.

RIESEBERG, L. H. (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. Trends em Ecology & Evolution 16: 351-358.

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

SANTOS, L. P.; CASTRO, J. P.; FRANCISCO, C. M.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; GOLL, L. G.; MORELLI, S.; ARTONI, R. F. (2013) Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, *Incertae sedis*): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics* 6: 48.

SANTOS, L. P.; FRANCISCO, C. M.; CASTRO, J. P.; BARBOSA, P.; MORELLI, S.; OLIVEIRA, L. A.; ARTONI, R. F. (2016) Karyoevolutionary Inferences in Enigmatic Taxon *Astyanax* (Teleostei: Characidae). *Zebrafish* 13: 578-583.

SANTOS, N. M.; FERREIRA-NETO, M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BAKKALI, M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2012) A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) *Zoologia* 29: 159-166.

SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F. (2009) A fauna de peixes na bacia do rio dos Frades e microbacias vizinhas, extremo sul da Bahia, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 26: 25-46.

SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F. (2014) A fauna de peixes nas Bacias Sul do Espírito Santo, Brasil. *Sitientibus. Série Ciências Biológicas* 13: 1-37.

SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F.; ARANDA, A. T.; CHAMON, C. C. (2005) *Trichomycterus pradensis*, a new catfish from southern Bahia coastal rivers, northeastern Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16: 289-302.

SAZIMA, I. (1983) Scale-esting in characoids and other fishes. *Environmental Biology of Fishes* 9: 87-101.

SCHAEFER, S.A. (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae),

p. 375-400. In: L.R. MALABARBA; R.E. REIS; R.P. VARI; Z.M.S. LUCENA & C.A.S. LUCENA (Eds). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, EDIPUCRS, 603p.

SHIMODA, N.; KNAPIK, E. W.; ZINITI, J.; SIM, C.; YAMADA, E.; KAPLAN, S.; JACKSON, D.; DE SAUVAGE, F.; JACOB, H.; FISHMAN, M. C. (1999) Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*. 58(3):219-232.

SILVA, D. M. Z.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica* 141: 329–336.

SILVA, P. C. (2017) Sistemática integrativa - diversidade e relações de *Deuterodon* e gêneros afins. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 188.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* 60: 1-11.

SOUZA, I. L.; GALIANN, J.; RÚA, P. D. L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2001) Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* 66: 85-91.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR. P. M. (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 405-410.

SUMNER, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

TENÓRIO, R. C. C. O.; VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. (2013) Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11: 553-564.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. (2006) Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66:161-165.

TRAVENZOLI, N. M.; SILVA, P. C.; SANTOS, U.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, C.; DERGAM, J. A. (2015) Cytogenetic and Molecular Data Demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) Species from Southeastern Brazil Form a Phylogenetic and Phylogeographic Unit. *Plos One* 10(9).

UIEDA, V.S. (1984) Ocorrência e distribuição dos peixes em um riacho de água doce. *Revista Brasileira de Biologia* 44: 203-213.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. (2000) Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG/CETEC. 144p.

VICARI M.R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31: 173-179.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, P. M. (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of the β -Chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 74: 70-75.

VIEIRA, F. (2006) A ictiofauna do rio Santo Antônio, bacia do Rio Doce, MG: proposta de conservação. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

VILELLA, F.S.; BECKER, F. G.; HARTZ, S. M. (2002) Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic forest river in Southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 45: 223-232.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei, Characiformes, Characidae) with coments on the distribution of freshwater fishes in Eastern and Southeastern Brazil. In: Workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 379- 427.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. (1998) Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei, Characiformes). In: MALABARBA, L. R.; REIS, E. R.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. (eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 161-170.

WEITZMAN, S. H.; VARI, R. P. (1988) Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. Proceedings of the Biological Society of Washington 101: 444-465.

YANO, C. F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L. A.C.; ARTONI, R. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B. (2014) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. PLoS ONE, 9(3).



Figura 1. Exemplos das espécies: a) *Astyanax intermedius*; b) *Astyanax taeniatus*. Foto: Frederico Machado de Pinho.

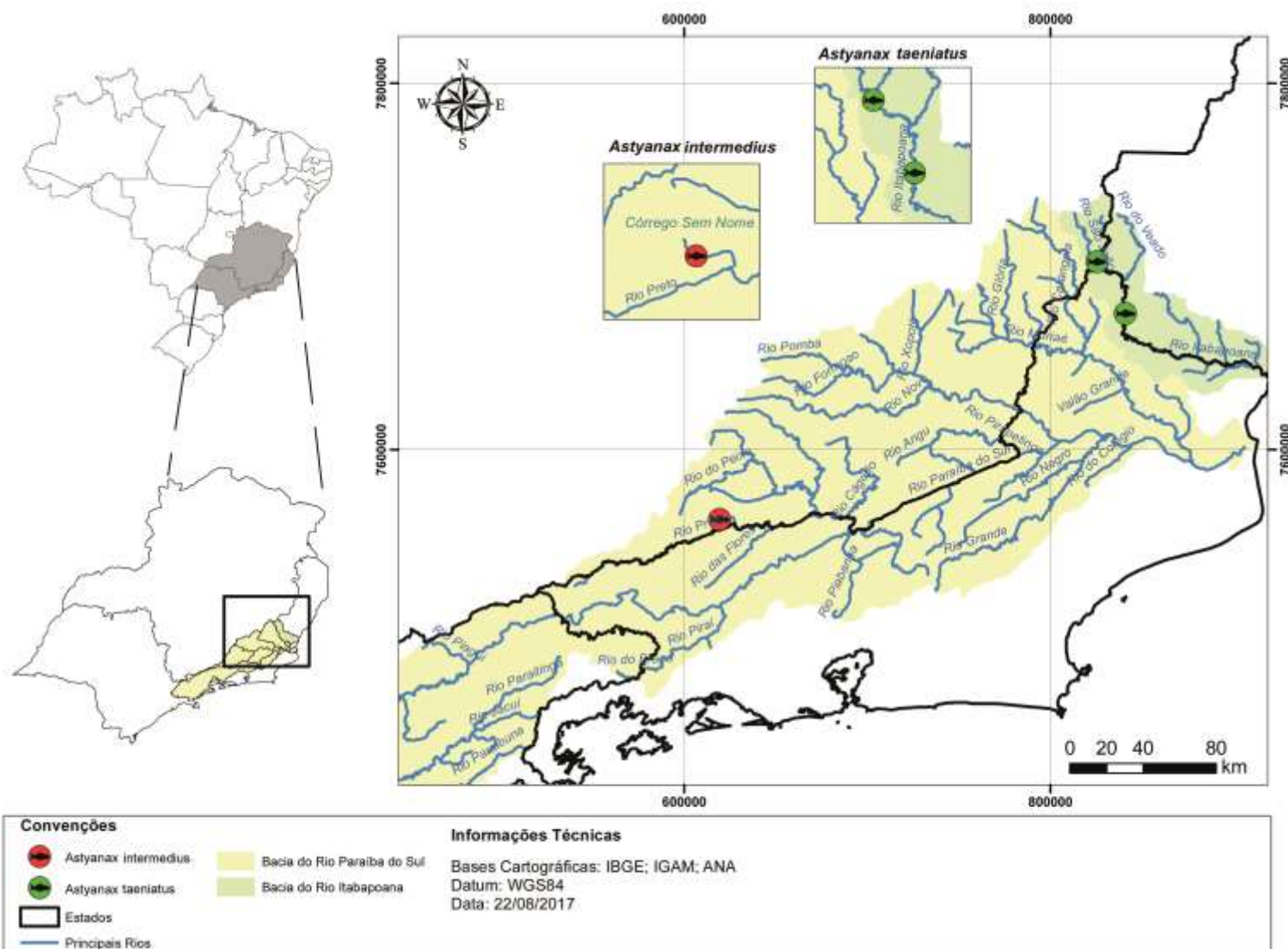


Figura 2. Mapa de localização de coleta dos espécimes. Mapa: Frederico Machado de Pinho e Felipe Borges

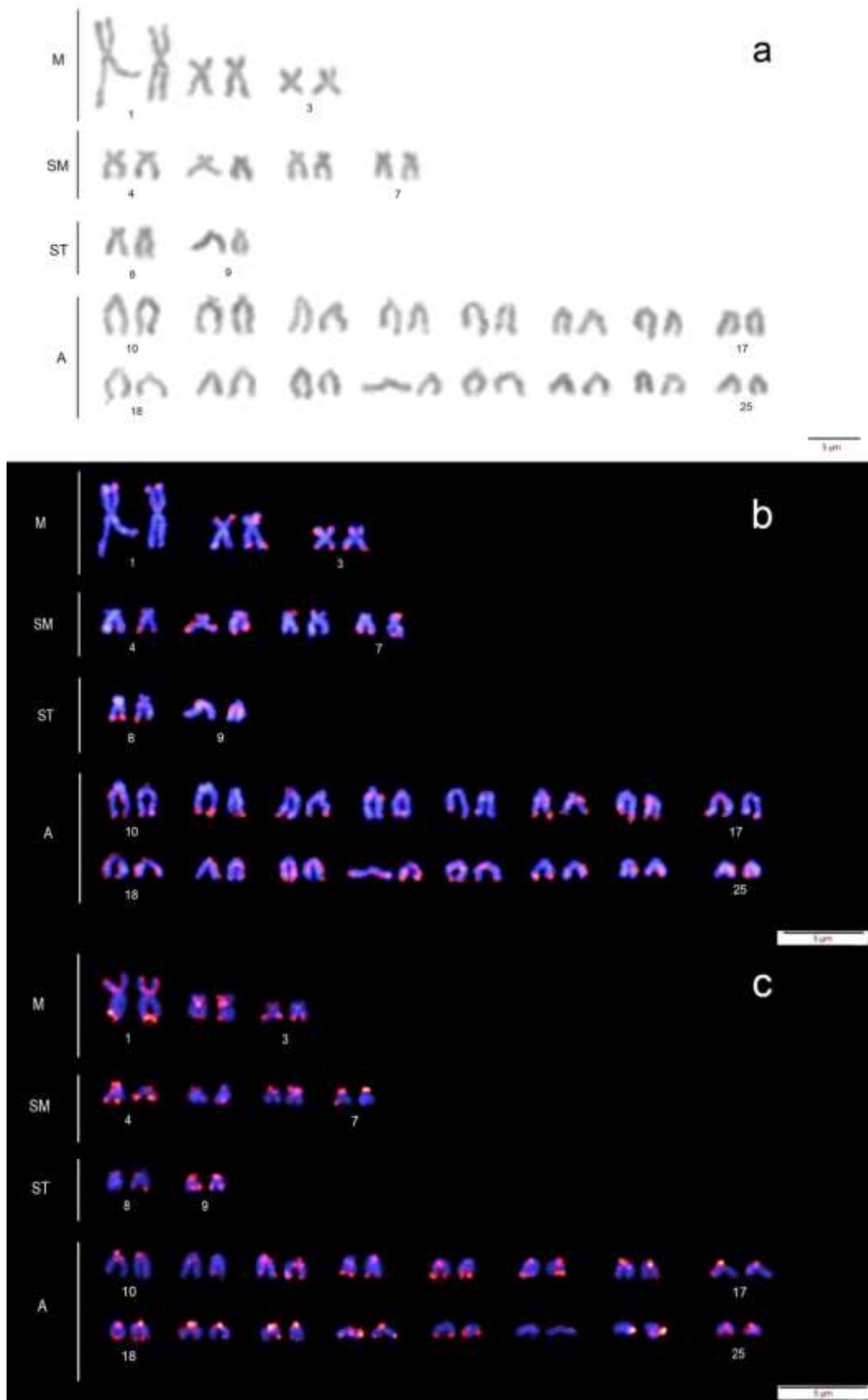
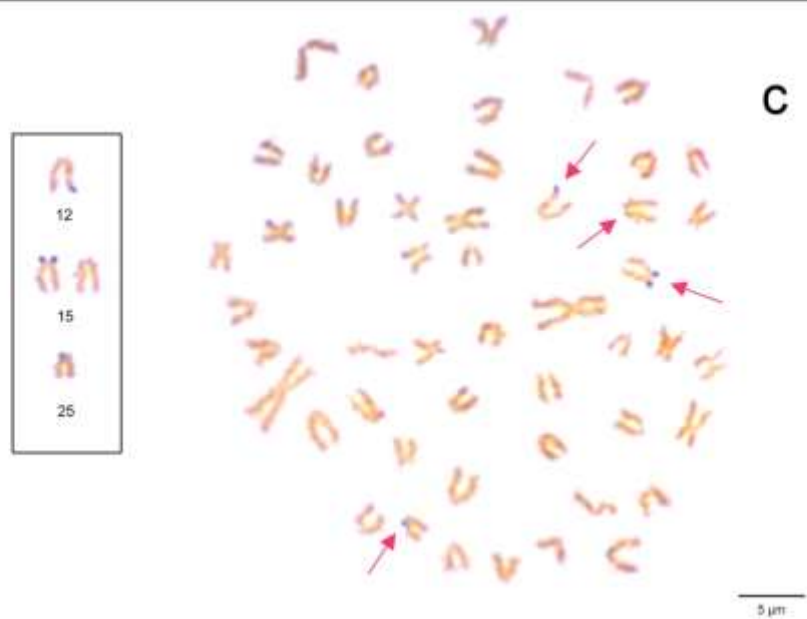
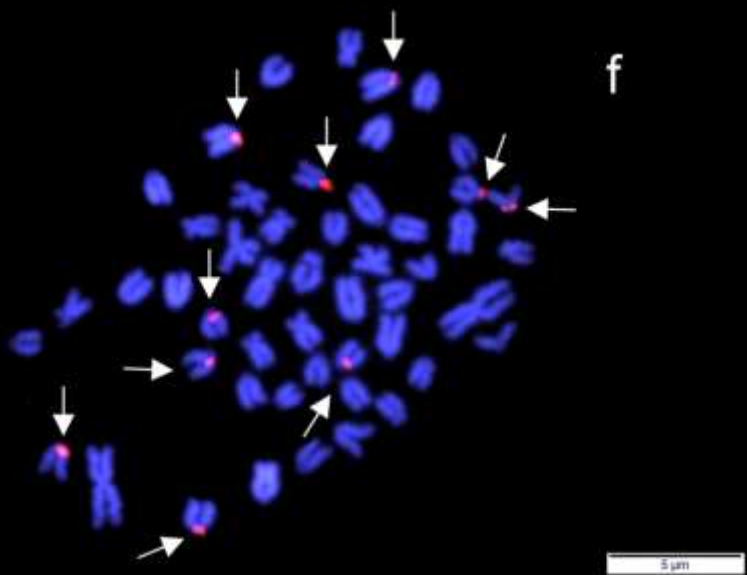
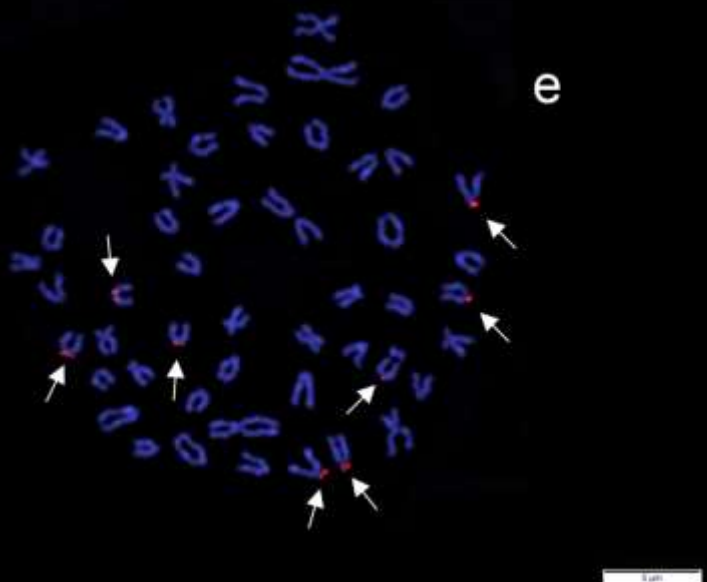


Figura 3. a) Cariótipo de *Astyanax intermedius* corado com Giemsa; b) FISH com sonda GA₍₁₅₎ em *A. intermedius*; e c) FISH com sonda CA₍₁₅₎ em *A. intermedius*.





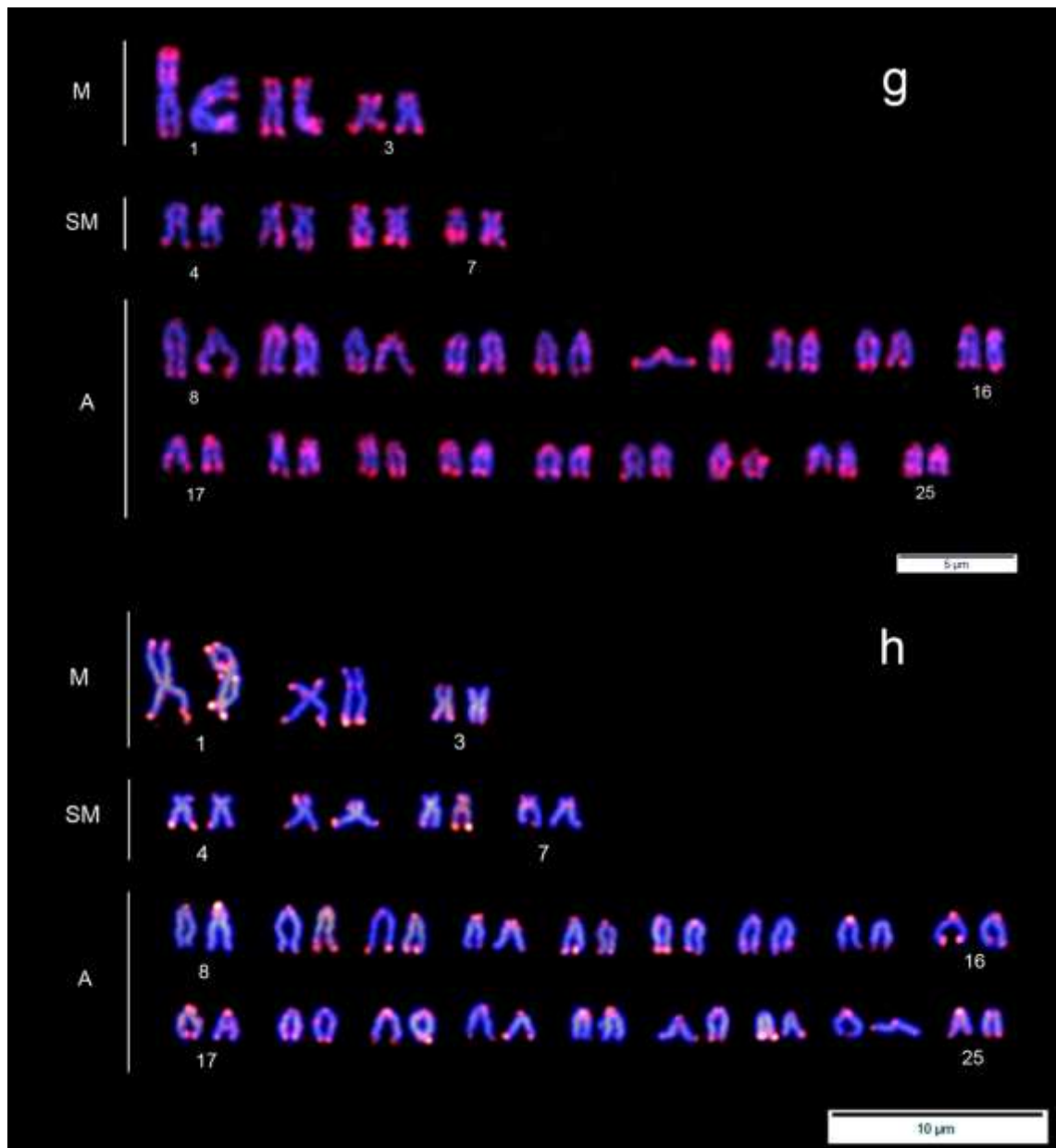


Figura 4. a) Cariótipo de *Astyanax taeniatus* corado com Giemsa; b) Banda C em *A. taeniatus*; c) variação de Ag-Nor em *A. taeniatus*; d) variação de AgNor em *A. taeniatus*; e) FISH 18S rDNA em *A. taeniatus*; f) FISH 5S rDNA em *A. taeniatus*; g) FISH com sonda GA₍₁₅₎ em *A. taeniatus*; h) FISH com sonda CA₍₁₅₎ em *A. taeniatus*.

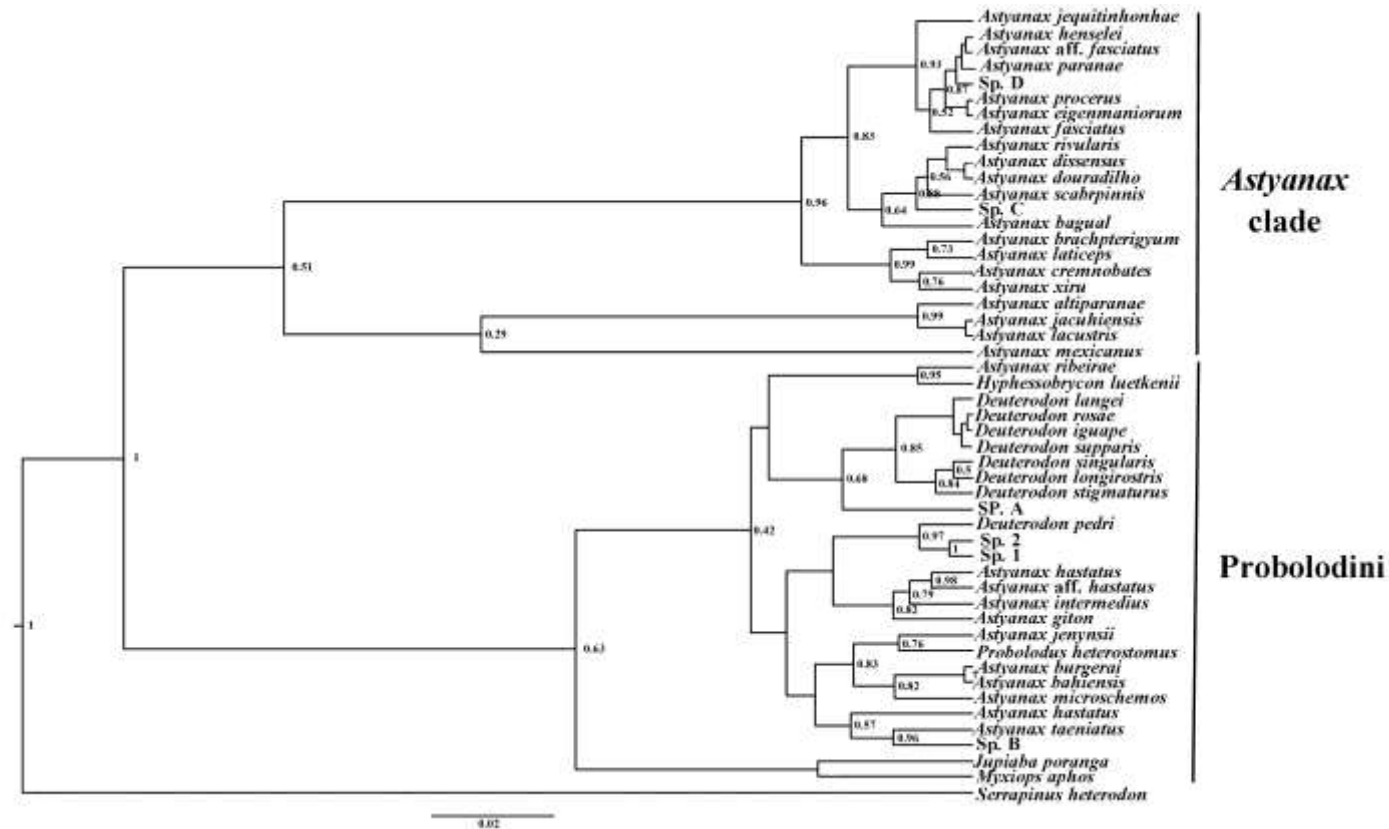


Figura 5. Filogenia sugerida por Silva (2017), evidenciando a existência de dois grandes grupos de lambaris.