

PATRÍCIA GIONGO

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DO GÊNERO *Astyanax*  
(TELEOSTEI: CHARACIFORMES) DAS BACIAS DOS RIOS PARAGUAI,  
ARAGUAIA E ALTO PARANÁ**

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  
2014

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

T

G495e  
2014  
Giongo, Patrícia, 1985-  
Estudos citogenéticos em peixes do gênero *Astyanax*  
(Teleostei: Characiformes) das bacias dos rios Paraguai,  
Araguaia e Alto Paraná / Patrícia Giongo. – Viçosa, MG, 2014.  
61f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Rubens Pazza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.46-61.

1. Genética animal. 2. Peixes. 3. Citogenética. 4. Lambari.  
5. *Astyanax altiparanae*. 6. *Astyanax* aff. 7. *Argyrimarginatus*.  
8. *Astyanax asuncionensis* . I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação  
em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

PATRÍCIA GIONGO

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES DO GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI:  
CHARACIFORMES) DAS BACIAS DOS RIOS PARAGUAI, ARAGUAIA E ALTO  
PARANÁ

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

APROVADA: 14 de fevereiro de 2014.

---

Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Coorientador)

---

Alexandre Benvindo de Sousa

---

Rubens Pazza  
(Orientador)

Dedico este trabalho

Ao meu filho Gabriel, que desde muito cedo me acompanha nos estudos e experimentos, sempre com muita curiosidade.

Ao companheiro de todas as horas, Wagner, pelo apoio e dedicação.

A minha mãe Edelmira e minha avó Inês, pelos incentivos e pela educação que foram essenciais para me tornar a mulher que sou hoje.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que agora não é composta mais só de laços sanguíneos, mas também de parentes agregados (como diz a tia Isabel), aqueles que vêm junto com o marido, pelo apoio ao longo desta caminhada, por todo amor e amizade que sempre dedicam a mim, mesmo distante sempre carrego cada um de vocês dentro do meu coração.

Ao meu companheiro, amigo, namorado e marido, Wagner, você é parte deste trabalho, obrigada pela dedicação, ajuda nas coletas, nas técnicas citogenéticas, e pelas longas horas me ajudando com leitura e discussão de muitos artigos. A Elisa por ter me ajudado com a tradução dos resumos.

Aos amigos e colegas de laboratório do Beagle e LaGEEvo pela ajuda nas técnicas citogenéticas e pela amizade especial de alguns.

Aos amigos Willian, Carol, Janaina, Pierre, Natan, Denis, Eric, Paloma, Adriana, Frederico, pela amizade, torcida positiva e conversas nos fins de tarde que muitas vezes se prolongaram até algumas horas da madrugada, enfim pelos momentos passamos juntos e que espero que sempre se repitam.

Aos professores Jorge Dergam (Co-orientador), Rubens Pazza (Orientador) e Karine Kavalco (Co-orientadora) pela oportunidade de desenvolvimento profissional, pelas sugestões e correções deste trabalho e por disponibilizarem os laboratórios Beagle e LaGEEvo para que eu pudesse trabalhar. Aos professores do programa pela formação.

Ao professor e amigo Anderson Fernandes que sempre se disponibilizou a me ajudar na adequação dos protocolos e na resolução de algumas dúvidas, tenho você como figura de profissional a ser seguida.

A família do Willian Lopes, por ter nos acolhido e por nos proporcionar agradáveis finais de semana. A Janaína e ao Pierre pelo tempo em que passamos na casa de vocês.

A todas as pessoas que participaram das coletas no Mato Grosso, Pará e Goiás. Em especial aos amigos Anderson, a Isabel, Vanaldo e ao sogro Heldo por toda a ajuda durante as coletas.

Ao REUNI e CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFV pela oportunidade de cursar o mestrado.

## **BIOGRAFIA**

Patrícia Giongo, filha de Edelmira Giongo e Aldoir Giongo, nasceu em 22 de abril de 1985, em Pato Branco, no estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Fundamental em 2000 e Ensino Médio em 2003, ambos na Escola Estadual Angelina Franciscon Mazutti em Campos de Júlio no Estado de Mato Grosso.

Em 2004 ingressou no curso de Ciência Biológicas da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra, Mato Grosso, na qual graduou-se em agosto de 2008.

Em janeiro de 2011 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, nível de mestrado, pelo departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa – MG.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Ictiofauna neotropical.....	1
Sistemática do complexo “ <i>Astyanax bimaculatus</i> ” .....	1
Estudos citogenéticos em peixes neotropicais.....	4
OBJETIVOS .....	11
MATERIAL E MÉTODOS .....	12
Área de estudo e espécies coletadas .....	12
Preparação de cromossomos mitóticos.....	13
Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos através da impregnação com Nitrato de Prata: Ag- RONS (Howell e Black, 1980) com modificações.....	15
Detecção de heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972) com modificações. ....	16
Dupla coloração com fluorocromos base-específicos (Cromomicina A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) e 4', -6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI)) (Verma e Babu, 1995) com modificações (Fernandes, 2004).....	16
Hibridação fluorescente in situ – FISH (Pinkel et al., 1986) com alterações (Pazza et al., 2006).....	17
Análise dos dados .....	20
REULTADOS .....	22
Diversidade cariotípica de <i>Astyanax asuncionensis</i> (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai) .....	23
Citogenética do complexo “ <i>Astyanax bimaculatus</i> ” nas bacias adjacentes dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná.....	32
CONCLUSÕES GERAIS .....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## LISTA DE FIGURA

**Figura 1:** Área de estudo do complexo "*Astyanax bimaculatus*" em três bacias adjacentes. População de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (Bacia do Paraná), no município de Aloândia-GO (1); população de *A. aff. argyrimarginatus*, rio Mutum (Bacia do Araguaia), no Município de Redenção-PA (2); população de *A. asuncionensis*, rio Sepotuba (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (3); população de *A. asuncionensis*, córrego São José (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (4); população de *A. asuncionensis*, córrego Buciuvai (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (5). ..... 12

**Capítulo 1** – Giongo, P.; Sampaio, W. M. S.; Fernandes, A.; Dergam, J.A.; Kavalco, F. K.; Pazza, R. 2011. Diversidade cariotípica de "*Astyanax asuncionensis*" (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). 3(2): 53-58 - DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9

**Figura 1:** Área de estudo de *A. asuncionensis*: em preto, bacia amazônica; em vermelho, bacia do Paraguai Paraná; em azul, microbacia do Sepotuba; círculo vermelho, área de estudo na região de Tangará da Serra..... 26

**Figura 2:** Cariótipos de *Astyanax asuncionensis* da microbacia do Sepotuba: 2A) Citótipo A, Rio Sepotuba; 2B) Citótipo B, Corrego São José; 2C) Citótipo C, córrego São José; 2D) Citótipo D, córrego São José; 2E) Citótipo E, córrego Bocaiuvai. .... 28

**Figura 3:** Ag-RONs em *Astyanax asuncionensis*: 3A), Citótipo B, córrego São José; 3B), Citótipo D, córrego São José; 3C) Citótipo E, córrego Bocaiuvai. .... 29

**Figura 4:** Distribuição de heterocromatina em *Astyanax asuncionensis* da microbacia do Sepotuba: 4A) Citótipo A, Rio Sepotuba; 4B) Citótipo B, córrego São José; 4C) Citótipo C, córrego São José; 4D) Citótipo D, córrego São José. .... 29

**Capítulo 2** – Giongo, P.; Sampaio, W. M. S.; Kavalco, K. F.; Dergam, J. A.; Pazza, R. Citogenética do complexo "*Astyanax bimaculatus*" nas bacias adjacentes dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná.

**Figura 1:** Espécies de peixes do complexo "*Astyanax bimacutus*". *A. altiparanae* (A); *Astyanax aff. argyrimarginatus* (B); *A. asuncionensis* (C). .... 37

**Figura 2:** Área de estudo do complexo "*Astyanax bimaculatus*" em três bacias adjacentes. População de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (Bacia do Paraná), no município de Aloândia-GO (1); população de *A. aff. argyrimarginatus*, rio Mutum (Bacia Araguaia), no Município de Redenção-PA (2); população de *A. asuncionensis*, rio Sepotuba (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (3); população de *A. asuncionensis*, córrego São José (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (4). .... 37

**Figura 3:** Cariótipos de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (A); *Astyanax aff. argyrimarginatus* rio Mutum (B); *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba (C), *Astyanax asuncionensis* corrego São José (D). Em destaque os cromossomos portadores das RONS ao lado de seus respectivos cariótipos. .... 40

- Figura 4:** Metáfases coradas com CMA<sub>3</sub> (A) *A. aff. argyrimarginatus*, rio Mutum; (B) *A. asuncionensis*, rio Sepotuba; (C) *A. asuncionensis*, córrego São José..... 40
- Figura 5:** Metáfase de Banda C-DAPI. (A) *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte; (B) *Astyanax aff. argyrimarginatus*, rio Mutum; (C) *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba, (D) *Astyanax asuncionensis*, corrego São José..... 41
- Figura 6:** Metáfase de (A) *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte; (B) *Astyanax aff. argyrimarginatus*, rio Mutum; (C, E) *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba, (D, F) *Astyanax asuncionensis* corrego São José. FISH com sonda de rDNA 18S (A, B, C, D) e rDNA 5S (E, F)..... 41

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados cariotípicos do complexo “ <i>A. bimaculatus</i> ” compilados da literatura. * registro de cromossomo B, T: Telomérica, C: Centromérica, P: Pericentromérica, I: intersticial, BT: Bitelomérica.....	8
<b>Tabela 2:</b> Esforço amostral por sexo e localides de coleta. ....	13
<b>Capítulo 1</b> – Giongo, P.; Sampaio, W. M. S.; Fernandes, A.; Dergam, J.A.; Kavalco, F. K.; Pazza, R. 2011. Diversidade cariotípica de " <i>Astyanax asuncionensis</i> " (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). 3(2): 53-58 - DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9	
<b>Tabela 1:</b> Resultados obtidos com técnicas citogenéticas aplicada para <i>Astyanax asuncionenses</i> . T: Telomérica, C: Centromérica, P: Pericentromérica, BC: Braço Curto e BL: Braço Longo. ....	27

## RESUMO

GIONGO, Patrícia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Estudos citogenéticos em peixes do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) das bacias dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná.** Orientador: Rubens Pazza. Coorientadores: Karine Frehner Kavalco e Jorge Abdala Dergam dos Santos

O gênero *Astyanax* inclui peixes de pequeno porte até 200 mm, vulgarmente conhecido como lambaris, comuns nas bacias hidrográficas neotropicais. As últimas revisões registram mais de 100 espécies nas águas continentais brasileiras para o gênero *Astyanax*, com relações filogenéticas indeterminadas dentro da família Characidae. Este gênero revela espécies morfologicamente muito semelhantes e com grande variabilidade cariotípica dentro e entre bacias hidrográficas, formando um grupo altamente complexo ao nível taxonômico e citogenético, o que foi interpretado como evidência de existência de complexos de espécies dentro do gênero. Este trabalho teve por objetivo utilizar ferramentas da citogenética para estudar populações do complexo “*Astyanax bimaculatus*” em três bacias adjacentes brasileiras: no rio Meia Ponte (Bacia do Alto Paraná), no rio Mutum (Bacia Araguaia) e no córrego São José e rio Sepotuba (Bacia do Alto Paraguai). Os estudos cromossômicos seguiram os protocolos básicos para as principais técnicas citogenéticas. As populações estudadas de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* e *Astyanax asuncionensis* apresentaram número diplóide de  $2n=50$  e apenas uma população de *A. asuncionensis* do córrego São José apresentou  $2n=48$ . Nenhuma das populações estudadas apresentou diferenciação de cromossomos sexuais. Os resultados encontrados demonstraram pequenas variações cariotípicas entre as populações das três bacias que sugerem a influência seletiva ou de gargalos derivados da complexa história de eventos de dispersão e vicariância característicos dessa região.

## ABSTRACT

GIONGO, Patrícia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Cytogenetic studies in fishes of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) from the Paraguay basins, Araguaia and Alto Paraná rivers.** Advisor: Rubens Pazza. Co-Advisor: Kerine Frehner Kavalco and Jorge Abdala Dergam dos Santos

The *Astyanax* genus includes small fish up to 200mm, commonly known as lambaris, which are widespread in Neotropical hydrographic basins. The latest reviews recorded over 100 species in the Brazilian continental waters for the genus *Astyanax*, with the uncertain position inside the family Characidae. This genus has species morphologically very similar with great karyotypic variability within hydrographic basins, forming taxonomically undefined groups that were interpreted by some authors as evidence for the existence of some species complex. This study aimed to apply the cytogenetic approach to study populations of the "*Astyanax bimaculatus*" complex in three adjacent Brazilian, as a contribution to understanding the genetic diversity of the group. The specimens were collected in the Meia Ponte River (Upper Paraná Basin) in the Mutum River (Araguaia Basin), in the São José Stream and the Sepotuba River (Upper Paraguay River Basin). Chromosome studies included standard cytogenetic techniques. Populations of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* and *Astyanax asuncionensis* showed a diploid number of  $2n = 50$  and only one population of *A. asuncionensis* stream San Jose had  $2n = 48$ . None of the studied populations showed differentiation of sex chromosomes. The results showed small karyotypic variation among populations of the three basins that may be related to the complex dispersal and vicariance events that characterize this region.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **Ictiofauna neotropical**

Os peixes representam entre os vertebrados um grupo muito grande e diversificado. Há cerca de 28.000 espécies de peixes marinhos e fluviais descritas em todo planeta o que equivaleria ao número de espécies conhecidas de todos os demais vertebrados (Nelson, 2006). A ictiofauna de água doce neotropical é a mais diversificada do mundo, estima-se uma riqueza acima de 5.000 espécies. As águas continentais brasileiras concentram cerca de 30% de todas as espécies descritas no mundo (Lundberg et al., 2000, Reis et al., 2003; Buckup et al., 2007; Albert e Reis, 2011). A biodiversidade da região neotropical está intimamente relacionada à sua formação geomorfológica que propiciou uma gama muito grande de exigências ecológicas e uma consequente diversidade de adaptações morfológicas aos peixes neotropicais (Lundberg et al., 1998; Lovejoy et al., 2006; Kavalco e Pazza, 2007; Albert e Reis, 2011; Reis et al., 2013).

Embora nos últimos anos o número de trabalhos relacionados a ictiofauna neotropical tenha crescido exponencialmente, o conhecimento ainda está muito fragmentado e são poucos os estudos que respondem às questões mais específicas, como padrões evolutivos regionais da ictiofauna. Tal fato se deve à grande diversidade, ampla distribuição dessa fauna e às dificuldades de acesso a muitas regiões, principalmente quando em relação aos rios amazônicos (Vari e Malabarba, 1998; Langeani et al., 2009).

### **Sistemática do complexo “*Astyanax bimaculatus*”**

A ictiofauna neotropical é dominada por peixes que têm uma associação relativamente antiga com os habitats de água doce, como os peixes das ordens Characiformes e Siluriformes. A distribuição geográfica desses táxons, em água doce da América do Sul, sugere que sua diversificação inicial ocorreu antes da grande ruptura do supercontinente Gondwana no Cretáceo (Lovejoy et al., 2006). Nesse sentido a ordem Characiformes merece destaque por representar o maior grupo de peixes da América do Sul e por ser exclusivamente de água doce (Buckup, 1998). Estão inseridos nesta ordem aproximadamente 1.800 espécies, 270 gêneros e 18 Famílias (Nelson, 2006; Mirande, 2010; Reis et al., 2013). A família Characidae é a maior dentre as 14 famílias de

Characiformes neotropicais (Mirande, 2010). Esta família engloba aproximadamente 58% das espécies de Characiformes, ou seja, é a família mais diversa dentro da ordem (Nelson, 2006). Este táxon é também considerado o mais complexo dentre os peixes neotropicais, pois comporta espécies com portes variados e encontrados nas principais bacias hidrográficas, compondo também populações isoladas em riachos (Buckup et al., 2007). Existem evidências de monofiletismo em muitas subfamílias de Characidae, entretanto, uma porção relativamente grande de gêneros e espécies foram considerados *incertae sedis* por Lima et al. (2003). Recentes contribuições filogenéticas para esta família propuseram uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertainae Sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado “clado *Astyanax*” (Javonillo et al., 2010; Mirande, 2010; Oliveira et al., 2011).

As espécies do gênero *Astyanax*, Baird e Girard (1854), são amplamente distribuídas por toda a América do Sul e Central (Géry, 1977), popularmente conhecidos como lambaris, e representam peixes de pequeno porte, até 200 mm, comuns nas bacias hidrográficas neotropicais (Garutti, 1998). Este gênero foi considerado tradicionalmente como membro da subfamília *Tetragonopterinae* (e.g., Britski et al., 1986). Seus representantes possuem as seguintes características morfológicas: linha lateral completa; pré-maxilar não protrátil; dentes com cúspides; dentes do pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski et al., 1988).

O número de espécies deste gênero varia de acordo com revisões de diferentes autores, os estudos feitos por Eigenmann (1927) indicam a existência de aproximadamente 74 espécies e subespécies, Géry (1977) relata haver mais de 62 espécies e subespécies apenas em rios brasileiros, para Garutti (1998) são aproximadamente 100 espécies e subespécies. Em uma revisão recente feita por Reis et al., (2003) são listadas cerca de 90 espécies válidas, como *incertae sedis* dentro da família Characidae (Melo et al., 2005; Lima et al., 2003; Bertaco e Garutti, 2007). Já para Froese e Pauly, (2013) o número de espécies válidas é de 137 espécies. Essa variação no número de espécies pode estar relacionada ao fato de que muitas espécies são descritas com base em poucos exemplares que são coletados em pontos isolados ao longo de todo o curso do rio (Garutti, 1988).

O gênero *Astyanax* revela espécies morfológicamente muito semelhantes, formando um grupo altamente complexo ao nível taxonômico (Garutti e Britski, 2000). Estudos demonstram que essa confusão também se repete a nível celular e molecular. As espécies nominais *A. scabripinnis*, *A. bimaculatus*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. hastatus* são consideradas por diversos autores, como complexos de espécies (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Justi, 1993; Pazza et al., 2006; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Pazza e Kavalco, 2007; Pazza et al., 2008; Kantek et al., 2008; Medrado et al., 2008; Kavalco et. al., 2009a; Oliveira et al., 2011).

Assim, o complexo “*Astyanax bimaculatus*” é formado por um grupo de peixes que compreende 22 espécies, é caracterizado por uma mancha negra horizontalmente ovalada na região umeral, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal prorrogado até a extremidade dos raios da nadadeira caudal (Garutti e Britski, 2000; Garutti e Langeani, 2009). Garutti (1999) dividiu esse grupo em dois subgrupos: o primeiro possui uma faixa lateral negra, que se estende do pedúnculo caudal até aproximadamente a mancha umeral e o segundo subgrupo não possui esta faixa lateral.

De acordo com Bertaco e Garutti (2007) o primeiro subgrupo é composto por 10 espécies validas: *A. argyrimarginatus* Garutti, 1999; *A. clavitaeniatus* Garutti, 2003; *A. goyacensis* Eigenmann, 1908; *A. incaicus* Tortonese, 1942; *A. novae* Eigenmann, 1911; *A. rupununi* Fowler, 1914, *A. saltor* Travassos, 1960, *A. siapae* Garutti, 2003, *A. unitaeniatus* Garutti, 1998 e *A. utiariti* Bertaco e Garutti, 2007. Já o segundo subgrupo é representado por 12 espécies: *A. bimaculatus* Linnaeus, 1758; *A. vittatus* Castelnau, 1855; *A. lacustris* (Lütken, 1875); *A. borealis* Eigenmann, 1908; *A. asuncionensis* Géry, 1972; *A. orthodus* Eigenmann 1907; *A. superbus* Myers, 1942; *A. validus* Géry, Planquette e Le Bail, 1991; *A. maculisquamis* Garutti e Britski, 1997; *A. abramis* (Jenyns, 1842); *A. altiparanae* Garutti e Britski, 2000 e *A. janeiroensis* Eigenmann, 1908.

Em revisões taxonômicas feitas por Eigenmann (1921, 1927) várias espécies do gênero *Astyanax* foram consideradas como sinônimos de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), pois apresentavam os caracteres básicos de coloração. A sobreposição destes caracteres taxonômicos gera dúvidas sobre a validade destas espécies (Peres et al., 2012). Se por um lado essas variações dificultam inferências precisas sobre a evolução do grupo (Kavalco e Pazza, 2007), por outro, aumentam a importância de

estudos mais específicos para este gênero e seus complexos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998).

### **Estudos citogenéticos em peixes neotropicais**

Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais expandiram consideravelmente nos últimos anos e estão distribuídos para mais 900 espécies (Nirchio e Oliveira 2006; Oliveira et al., 2007)

O número cromossômico em peixes neotropicais varia de  $2n=20$  em *Pterolebias longipinnis* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) a  $2n=134$  em *Corydoras aeneus* (Siluriformes: Callichthyidae). Essas variações no número cromossômico sugerem a existência de uma plasticidade na estrutura caritípica não evidenciada em nenhum outro grupo de vertebrados, que pode ser percebida claramente pela presença de polimorfismos cromossômicos (Nirchio e Oliveira 2006; Torres et al., 2004). Estudos citogenéticos em peixes revelam uma ampla gama de mecanismos de determinação do sexo (XX/XY, ZZ/ZW, X1X1X2X2/X1X2Y, XX/XY1Y2, ZZ/ZW1W2), além da existência de cromossomos supranumerários (cromossomos B) (Nirchio e Oliveira, 2006).

A citogenética é uma das ferramentas mais interessantes para estudar questões ligadas à genética de peixes, esta ciência tem experimentado grandes avanços interagindo com outras áreas como a biologia molecular, a taxonomia e a evolução. Assim, esta ciência tornou-se um instrumento muito interessante para a resolução de problemas relacionados à evolução das espécies e de estudos populacionais (Oliveira et al., 2009a; Krinski et al., 2012).

Os estudos com citogenética de peixes neotropicais estão concentrados em peixes de água doce, principalmente nas ordens Characiformes e Siluriformes (Oliveira et al., 2009a). As espécies de peixes neotropicais estão divididas em dois grupos, um com alta mobilidade e populações compostas de um grande número de indivíduos que mantêm constituições cromossômicas estáveis e outro grupo caracterizado por espécies com reduzida mobilidade e baixa densidade populacional demonstrando amplas variações cariotípicas interespecífica e intraespecífica (Oliveira, 2009a).

Os peixes da ordem Characiformes refletem a nível citogenético a complexidade de suas relações filogenéticas. Apresentam uma ampla variação no número diplóide,

sendo observados casos de  $2n=28$  em *Hemigrammus* (Characidae) até  $2n=102$  em *Potamorhina altamazonica* (Curimatidae) e também na forma cariotípica tanto entre espécies de um mesmo gênero (Morelli et al., 1983; Falcão et al., 1984), como entre populações da mesma espécie (Moreira-Filho; Bertollo, 1991). Os padrões de número e estrutura cromossômicos permitem determinar dois grupos de peixes: um grupo que apresenta grande variabilidade interpopulacional e o outro com pequena variabilidade (Artoni et al., 2000). A família Characidae também demonstra a nível cromossômico os problemas na composição do grupo. Os cariótipos dos peixes da família Characidae tem se mostrado bem heterogêneos dentro de cada subfamília, com grande variabilidade cariotípica de  $2n=28$  em *Hemigrammus* sp. (Characidae) a  $2n=52$  em *Cheirodon stenodon* (Cheirodontinae) com predominância de  $2n=48$  e  $2n=50$  (Oliveira et al. 1988; Oliveira et al. 2009a). Dentro desta família o gênero *Astyanax* é um dos mais complicados apresentando número diploide variando de  $2n=36$  a  $2n=50$ , com heteromorfismos, polimorfismo nos blocos de heterocromatina e das regiões organizadora de nucléolos, além de cromossomos supranumerários. As espécies do gênero *Astyanax* formam um grupo altamente complexo ao nível taxonômico e citogenético, revelando espécies morfologicamente muito semelhantes e com grande variabilidade cariotípica.

Estudos citogenéticos sobre o gênero *Astyanax* nas bacias amazônica, do Paraná-Paraguai, do Rio Grande e do São Francisco evidenciam uma variedade cariotípica de  $2n=36$  à  $2n=50$  com morfologia cromossômica bastante diversificada, mas com predomínio de cromossomos submetacêntricos (Oliveira et al., 1988; Oliveira, 2005). Quanto aos padrões de bandamento, o gênero pode apresentar padrões de marcação simples e múltipla em sua maioria entre duas e quatro marcações que são localizadas por impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs). Em termos de banda C, os estudos mostram que a heterocromatina está localizada, preferencialmente, nas regiões teloméricas, porém podem também ocorrer nas regiões pericentroméricas (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Porto et al., 1992; Maistro et al., 2000; Mestriner et al., 2000; Matoso et al., 2002; Centofante, 2003; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Domingues, 2005; Peres, 2005; Abel et al., 2006; Artoni et al., 2006; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Santos e Morelli, 2006; Kantek et al., 2008; Rosa et al., 2009; Kavalco et al., 2010; Pacheco et al. 2010; Kavalco et al., 2011; Mendes et al., 2011; Da Silva et al., 2012; Medrado et al., 2012; Peres et al., 2012; Kavalco et al., 2013).

A aplicação de fluorocromos base - específicos como CMA<sub>3</sub> e DAPI evidenciam regiões ricas em bases GC e AT, respectivamente, são muito empregados em estudos citogenéticos de peixes. A CMA<sub>3</sub> evidencia sítios coincidentes com a Ag- RONS em estudos realizados em várias espécies de *Astyanax*, enquanto o DAPI apresentou-se no geral como um contra-corante (Kavalco et al., 2004; Mantovani et al., 2004; Kavalco et al., 2007; Rosa et al., 2009; Mendes et al., 2011; Da Silva et al., 2012; Martinez et al., 2012; Medrado et al., 2012). Porém Tenório et al., (2013) encontraram blocos DAPI positivos em *A. argyrimarginatus* e *Astyanax* sp.

Estudos de citogenética molecular utilizando a técnica de fluorescence in situ hybridization (FISH), evidenciam um padrão de marcações com sonda de rDNA 18S e 5S altamente variado quanto a número e região cromossômica. A sonda 18S é utilizada no auxílio da definição do real número de sítios de rDNA independentemente da sua atividade, e confirmando um padrão geral de RONS múltiplas para as espécies do gênero *Astyanax* (Almeida-Toledo et al., 2002; Mantovani et al., 2005; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Kavalco e Almeida-Toledo, 2007; Kantek et al., 2008; Pazzo et al., 2008; Kavalco et al., 2009a, b; Kavalco et al., 2010; Mendes et al., 2011; Pacheco et al., 2011). Porém algumas espécies pertencentes ao complexo “*Astyanax bimaculatus*” evidenciam marcações simples (Kavalco et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Da Silva et al., 2012; Peres et al., 2012; Paiz, 2013). O padrão de sítios marcados com rDNA 5S apresenta-se altamente variado para diversas espécies de *Astyanax* (Almeida-Toledo et al., 2002; Mantovani et al., 2005; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Kavalco e Almeida-Toledo, 2007; Kantek et al., 2008; Pazzo et al., 2008; Kavalco et al., 2009a; Kavalco et al., 2010; Kavalco et al., 2011; Mendes et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Peres et al., 2012; Paiz, 2013).

Analises citogenéticas para o complexo “*Astyanax bimaculatus*” mostraram diferenças interpopulacionais, para fórmulas cariotípicas, números fundamentais, padrão RONS, Banda C, Fluorocromos base-específicos e FISH (Tabela 1). As espécies do complexo “*Astyanax bimaculatus*” apresentam citótipos com  $2n=50$ , com uma fórmula cromossômica que inclui um par de grandes cromossomos metacêntricos, um estado de caráter considerado simpliomórfico (Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009a). O padrão geral obtido através da técnica de impregnação por nitrato de prata foi de RONS múltipla. Outra característica comum neste gênero refere-se à ocorrência de múltiplos sítios de rDNA 18S, confirmado por fluorocromos base-específicos (Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009b; Mendes et al., 2011; Pacheco et al., 2011;

Kavalco et al., 2011; Peres et al., 2012). O padrão simples para rDNA 5S apresenta-se como uma característica derivada (Kavalco et al., 2009b; Kavalco et al., 2011; Paiz, 2013), pois a ocorrência de dois pares de cromossomos portadores deste DNA ribossômico é relatado com maior frequência em Characiformes (Martins e Galetto Jr., 2001) e em outras espécies de *Astyanax* (Pazza et al., 2006; Kavalco et al., 2004; Almeida-Toledo et al., 2002). As regiões heterocromáticas apresentam-se distribuídas de forma bastante variada e concentradas nas regiões pericentroméricas (Troy, 2004; Pacheco et al. 2011; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009b; Kavalco et al., 2011; Mendes et al., 2011; Giongo et al., 2012; Peres et al., 2012, Paiz, 2013).

Os estudos citogenéticos para as espécies do complexo “*Astyanax bimaculatus*”, são muito interessantes, pois este complexo, da mesma forma que as espécies do gênero, apresentam condição sistemática indefinida (Oliveira et al., 2009a; Martinez et al., 2012). Os padrões obtidos são potencialmente importantes para complementar e auxiliar o entendimento dos padrões de diversificação do grupo.

**Tabela 1:** Dados cariotípicos do complexo “*A. bimaculatus*” compilados da literatura. \* registro de cromossomo B, T: Telomérica, C: Centromérica, P: Pericentromérica, I: intersticial, BT: Bitelomérica.

Espécies	Localidade rio/córrego/lago. (Bacia)	2n	Fórmula Cariotípica				NF	RONs	18S	5S	CMA <sub>3</sub>	Banda C	Referência
			m	sm	st	a							
<i>A. bimaculatus</i>	rio Meia Ponte. (Paraná)	50		26		24	76					Jin e Toledo, (1975)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Paranapanema (Paraná)	50	10	22	6	12	88				C	Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Maringá. (Paraná)	50	10	22	6	12	88					Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Tibagi (Paraná)	50	6	22	8	14	86	-	-	-	-	Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Tibagi (Paraná)	50	10	22	6	12	88					Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Tibagi (Paraná)	50	10	22	8	10	90					Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Couro de Boi (Paraná)	50	8	20	10	12	88					Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Três Bocas (Paraná)	50	10	28	4	8	92					Pacheco (2001)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Claro (Paraná)	50	10	26	4	10	90	1-4				Pacheco et al., . (2001);	
<i>A. altiparanae</i>	rio Claro (Paraná)	50	10	24	4	12	88	1-4				Pacheco et al., . (2001);	
<i>A. altiparanae</i>	rio Claro (Paraná)	50	10	22	4	14	86	1-4				Pacheco et al., . (2001);	
<i>A. altiparanae</i>	rio Índios (Paraná)	50	6	30	4	10	90	10		7	C, I	Fernandes e Martins-Santos (2004)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Paraná (Paraná)	50	6	26	6	12	88	2		5	C, I	Fernandes e Martins-Santos (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio Claro (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	Ribeirão das Flexas (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio Mutuca, (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio dos Peixes (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio Cuiabá, (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio Aricá Mirim (Paraguai)	50	14	18	12	6	94	2-4		2-3	PC, T	Troy (2004)	
<i>A. asuncionensis</i>	rio Coxipozinho (Paraguai)	50	10	22	10	8	92	2			PC, T	Troy (2004)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Tatuteba (Paraná)	50	6	26	6	12	88	3	4	2		Fernandes e Martins-Santos (2006)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Keçaba (Paraná)	50	6	26	6	12	88	1	7	2		Fernandes e Martins-Santos (2006)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Maringá (Paraná)	50	6	26	6	12	88	3	4	2		Fernandes e Martins-Santos (2006)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Paraná (Paraná)	50	6	26	6	12	88	2	4	2		Fernandes e Martins-Santos (2006)	
<i>A. altiparanae</i>	rio Iguaçu (Paraná)	50	6	30	8	6	94	2	2	2	3	C, I	Domingues et al., . (2007)
<i>A. altiparanae</i>	rio Tibagi (Paraná)	50	6	28	8	8	92	2-4	7	2	7	C, I	Domingues et al., . (2007)
<i>A. asuncionensis</i>	rio Correntes (Paraguai)	50	8	26	8	8	92	3	-	-	-	-	Fernades (2007)

<i>A. bimaculatus</i>	rio São João (Pardo)	50	8	20	18	6	94	2		2	C, I	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	lagoa Marola( Doce)	50	6	20	18	6	94	2		2	C, T, I	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	lagoa Juiz de Fora (Doce)	50	6	20	18	6	94	2		2	C, T, I	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	lagoa Curi (Doce)	50	6	20	18	6	94	2		2	C,	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	lagoa Tiririca (Doce)	50	6	20	18	6	94	2		2	C, T, I	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	córrego São Bartolomeu (Doce)	50	6	20	18	6	94	2		2	C, T, I	Fava (2008)
<i>A. bimaculatus</i>	rio Carangola (Parafba do sul)	50	6	20	18	6	94	2		2	C, I,	Fava (2008)
<i>A. altiparanae*</i>	rio Campo Novo (Paraná)	50	12	18	12	8	92				C, PC, I	Hashimoto e. al., (2008)
<i>A. altiparanae</i>	rio Monjolinho (Paraná)	50	8	20	12	10	90	2	2	2		Peres et al., (2008)
<i>A. lacustris</i>	rio São Francisco (São Francisco)	50	8	20	16	6	94	2	2	2		Peres et al.,(2008)
<i>A. altiparanae</i>	rio Pântano (Paraná)	50	6	28	4	12	88	2-3	2	2	C/PC, T,	Ferreira-Neto et al., (2009)
<i>A. altiparanae</i>	rio Feijão (Paraná)	50	6	30	8	6	94	2	4	2	C/PC, T,	Ferreira-Neto et al., (2009)
<i>A. altiparanae</i>	rio Jordão (Paraná)	50	6	28	8	8	92	2-4	6	2	C/PC, T	Ferreira-Neto et al., (2009)
<i>A. bimaculatus</i>	córrego Taboquinha (Paraná)	50	4	13	5	3	94	6		3	C	Santos (2010)
<i>A. aff. Bimaculatus</i>	rio Sete Barras (Paraná)	50	8	24	12	6	94	2	3	2	PC	Kavalco et al., et al., (2011)
<i>A. aff. Bimaculatus</i>	Cachoeiras de Macacu (costeira)	50	8	24	12	6	94	2	2	2	PC	Kavalco et al., (2011)
<i>A. altiparanae</i>	rio Paraitinga (Paraná)	50	8	20	10	12	88	2	3	2	T, I	Kavalco et al., et al., (2011)
<i>A. altiparanae</i>	rio Pilar do Sul (Paraná)	50	8	22	14	6	94	2	4	2	T, I	Kavalco et al., et al., (2011)
<i>A. altiparanae</i>	córrego Agua dos Patos (Paraná)	50	8	22	6	12		2-4	4	2	2-4	Pacheco et al., et al., (2011)
<i>A. altiparanae</i>	lago Igapó (Paraná)	50	8	28	4	10		1-3	2	2	2	Pacheco et al., et al., (2011)
<i>A. altiparanae</i>	rio Mogi-Guaçu (Paraná)	50	6	12	20	12		2		4		Martinez et al., et al., (2012)
<i>A. altiparanae</i>	rio Tietê (Paraná)	50	6	12	20	12		2		4		Martinez et al., et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio São Francisco (São Francisco)	50	8	34	2	6	94	2	2	2		Peres et al., et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Grande (Paraná)	50	8	32	2	8	92	2	2	2		Peres et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	Cachoeira do Rio Piumhi (São Francisco)	50	8	32	2	8	92	2	2	2		Peres et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Piumhi (São Francisco)	50	8	32	2	8	92	2	2	2		Peres et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Piumhi (São Francisco)	50	8	34	2	6	94	2	2	2		Peres et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Piumhi (São Francisco)	50	8	33	2	7	93	2	2	2		Peres et al., (2012)
<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Piumhi (São Francisco)	50	8	31	2	9	91					Peres et al., (2012)

<i>"A. bimaculatus"</i>	rio Piumhi (São Francisco)	50	8	30	2	10	90						Peres et al., (2012)
<i>A. abramis</i>	rio Iguaçu (Paraná)	50	4	30	8	8	92	2	2	4		C, PC, BT,	Paiz (2013)
<i>A. asuncionensis</i>	rio Iguaçu (Paraná)	50	8	24	6	12	88	2	2	2		C, PC, T	Paiz (2013)
<i>A. argyrimarginatus</i>	córrego Jaraguá (Tocantins -Araguaia)	50	6	16	20	8	92	2	2	4	2	PC,	Tenório et al., (2013)
<i>A. aff. Bimaculatus</i>	córrego Dois de Agosto (Tocantins -Araguaia)	50	4	14	24	8	92	2	2	4	14	PC, T	Tenório et al., (2013)
<i>A. xavante</i>	córrego Avoadeira (Tocantins -Araguaia)	50	8	16	18	8	92	6	6	2	24	PC, T	Tenório et al., (2013)
<i>A. altiparanae</i>	corrego monjolinho (Paraná)	50	6	18	20	6	94	2	2	4	14	PC, T, I	Tenório et al., (2013)
<i>A. elachylepis</i>	córrego Taquaralzinho (Tocantins -Araguaia)	50	6	22	10	12	88	2	2	2	6	PC, T, I	Tenório et al., (2013)

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Contribuir para o conhecimento diversidade citogenética do complexo “*Astyanax bimaculatus*” na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai), rio Meia Ponte (Alto Paraná) e do córrego Mutum (Araguaia).

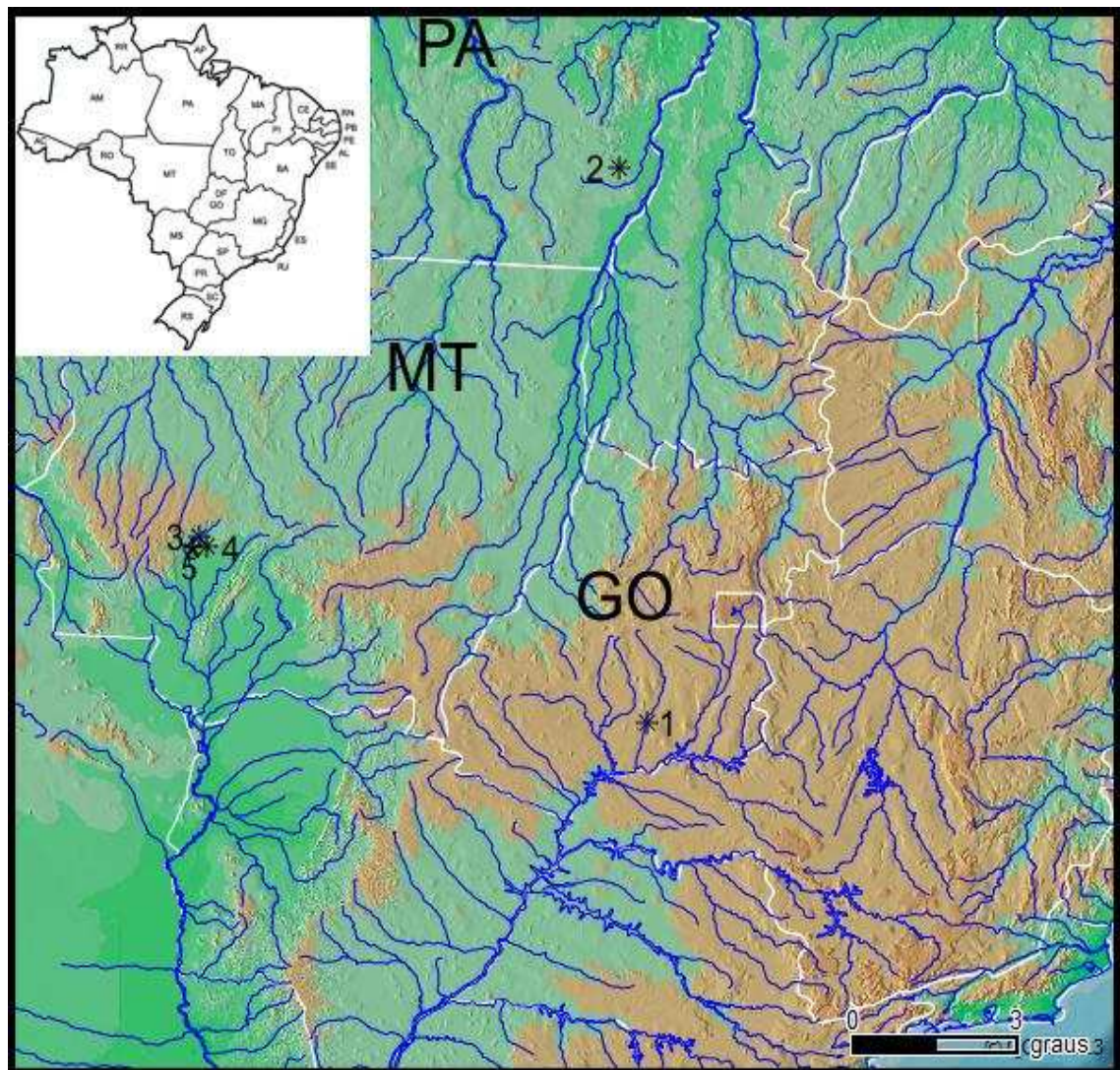
### **Objetivos Específicos**

- Determinar o número e a morfologia cromossômica dos espécimes coletados;
- Evidenciar as regiões organizadoras de nucléolos e as regiões heterocromáticas;
- Localizar os sítios de rDNA 18S e 5S nas populações estudadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo e espécies coletadas

As coletas foram realizadas em três bacias hidrográficas (Paraguai, Araguaia Tocantins e Alto Paraná) (Figura 1).



**Figura 1:** Área de estudo do complexo "*Astyanax bimaculatus*" em três bacias adjacentes. População de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (Bacia do Paraná), no município de Aloândia-GO (1); população de *A. aff. argyrimarginatus*, rio Mutum (Bacia do Araguaia), no Município de Redenção-PA (2); população de *A. asuncionensis*, rio Sepotuba (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (3); população de *A. asuncionensis*, córrego São José (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (4); população de *A. asuncionensis*, córrego Buciual (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (5).

As coletas na bacia do Alto Paraná ocorreram rio Meia Ponte no Município de Aloândia – GO, foram coletados 10 espécimes *Astyanax altiparanae*, em parceria com o Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da Universidade Federal de Viçosa - Campus de Rio Paranaíba-MG (Tabela 2).

Na bacia do Tocantins-Araguaia as coletas foram realizadas no córrego Mutum no município de Redenção – PA, onde foram coletados 17 espécimes *Astyanax argyrimarginatus*, em parceria com os Laboratórios de Sistemática Molecular e Genética Ecológica e Evolutiva da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Viçosa e Rio Paranaíba, respectivamente (Tabela 2).

As coletas na bacia hidrográfica do Paraguai ocorreram no córrego São José, córrego Bocaiuval e rio Sepotuba, no município de Tangará da Serra - MT. Foram coletados 129 espécimes de *Astyanax asuncionensis*, com recursos do Projeto “O Mato Grosso como região chave para a fauna aquática neotropical-MTFAN” (Tabela 2).

**Tabela 2:** Esforço amostral por sexo e localidades de coleta.

Espécie	Município	n/sexo	Coordenada Geográfica	Local	Bacia Hidrográfica
<i>Astyanax argyrimarginatus</i>	Redenção - PA	5♂ 12♀	8°3'27.69"S 49°55'14.87"O	córrego Mutum	Tocantins-Araguaia
<i>Astyanax altiparanae</i>	Aloândia - GO	3♂ 7♀	17°44'22.83"S 49°25'58.77"O	rio Meia Ponte	Alto Paraná
<i>Astyanax asuncionensis</i>	Tangará da Serra - MT	12♂ 41♀	14°39'2.85"S 57°26'12.74"O	córrego São José	Alto Paraguai
<i>Astyanax asuncionensis</i>	Tangará da Serra - MT	6♂ 9♀	14°38'25.70"S 57°38'13.14"O	córrego Bocaiuval	Alto Paraguai
<i>Astyanax asuncionensis</i>	Tangará da Serra - MT	18♂ 43♀	14°30'5.05"S 57°34'37.07"O	rio Sepotuba	Alto Paraguai

### Preparação de cromossomos mitóticos

A técnica a seguir, utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos, foi descrita por Egozcue (1971) e modificada por Bertollo et al. (1978). Este método consiste em um tratamento químico, com colchicina, para interromper a anáfase mitótica. A seguir, as células do tecido sólido são separadas mecanicamente com uso de seringa hipodérmica e, posteriormente, hipotonizadas. O processo de hipotonização proporciona um aumento considerável do volume celular, facilitando o rompimento de suas membranas quando a suspensão é gotejada na superfície de uma lâmina. A fixação, passo final da preparação, impede o rompimento das células quando ainda em solução hipotônica, mantendo satisfatoriamente a integridade da estrutura cromossômica e

evitando distanciamento excessivo dos cromossomos em relação à placa metafásica. A metodologia é composta pelos seguintes passos:

- 1) Injetar intra - abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e pélvicas, solução aquosa de colchicina 0,025% na proporção de 1mL/100g de peso do animal.
- 2) Deixar o peixe em aquário por 40 minutos e depois sacrificar o animal e retirar o rim anterior.
- 3) Depositar o órgão em um recipiente pequeno com 10 mL de KCl (Cloreto de Potássio) na concentração de 0,075M.
- 4) Fragmentar o tecido com o auxílio de uma seringa de vidro sem agulha aspirando e espirando suavemente o material.
- 5) Colocar a solução em uma estufa a 37°C por 30 minutos.
- 6) Transferir o material para um tubo de centrifuga, acrescentar 2mL de fixador Carnoy (metanol: ácido acético 3:1) e centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm.
- 7) Descartar o sobrenadante.
- 8) Adicionar 10 mL de fixador, ressuspender o material com uma pipeta de Pasteur e centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm.
- 9) Repetir o passo 8 por mais duas vezes.
- 10) Descartar o sobrenadante, acrescentar 2 mL de fixador, ressuspender novamente e transferir para tubo tipo “eppendorf” que deve ser conservado em Freezer (-20°C).

A solução obtida foi pingada sob uma lâmina aquecida à 60°C em uma distancia de 1 metro de altura e seca ao ar.

Outro método utilizado no presente trabalho, para obtenção de cromossomos metafásicos, trata-se de um tratamento colchicínico in vitro em células que se apresentam em constante divisão, descrita por Moreira-Filho e Bertollo (1990). Os passos estão detalhados abaixo.

- 1) Retirar a porção anterior do rim e colocar em 15mL de solução hipotônica de KCL 0,075M e dissociar com pinças de dissecação e seringas de vidro desprovidas de agulha.
- 2) Em seguida colocar 0,5mL de colchicina na concentração de 0,0062% e incubar a suspensão celular a 36-37°C por aproximadamente 30 minutos.
- 3) Após esse tempo ressuspender o material e transferido para um tubo de centrífuga, com auxílio de uma pipeta Pasteur.
- 4) Adicionar 0,3 mL de fixador Carnoy à suspensão celular e centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm.
- 5) Descartar o sobrenadante, adicionar 8 mL de fixador Carnoy, ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugação a 900 rpm por 10 minutos.
- 6) Repetir os passos 5 por mais duas vezes.
- 7) Após a última centrifugação e a eliminação do sobrenadante, adicionar 2mL de fixador e ressuspender o material com cuidado.
- 8) Armazenar a suspensão celular em tubo tipo “eppendorf” em freezer (-20°C).

**Deteção de Regiões Organizadoras de Nucléolos através da impregnação com Nitrato de Prata: Ag- RONS (Howell e Black, 1980) com modificações.**

- 1) Colocar sobre a lâmina 2 gotas de água destilada, 2 gotas de gelatina e 4 gotas de nitrato de prata 50%;
- 2) Cobrir com lamínula;
- 3) Levar à estufa 60°C em câmara úmida por aproximadamente 5 minutos ou até obter uma coloração castanha;
- 4) Lavar em água para retirar a lamínula e o excesso de nitrato de prata.
- 5) Esperar secar e analisar.

**Detecção de heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972) com modificações.**

- 1) Deixar a lâmina por 3 minutos em HCl (ácido clorídrico) em concentração 0,2N a 42°C;
- 2) Lavar em água destilada;
- 3) 30 segundos em Ba(OH)<sub>2</sub> (hidróxido de bário) a 42°C;
- 4) Lavar rapidamente em HCl em concentração 0,2N a 42°C;
- 5) Lavar em água destilada;
- 6) Deixar 1 hora em 2xSSC (solução salina de citrato de sódio) a temperatura ambiente;
- 7) Lavar em água destilada;
- 8) Secar e corar com DAPI por 30 minutos.
- 9) Lavar a lâmina rapidamente em tampão de McIlvaine, secar e montar com sacarose 50%.

**Dupla coloração com fluorocromos base-específicos (Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4',-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI)) (Verma e Babu, 1995) com modificações (Fernandes, 2004).**

- 1) Colocar as lâminas em tampão de McIlvaine por 5 minutos;
- 2) Secar em temperatura ambiente;
- 3) Colocar sobre a lâmina 150µL de CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/mL) cobrir com lamínula por 45 minutos no escuro;
- 4) Retirar a lamínula e deixar em tampão McIlvaine por 5 minutos;
- 5) Retirar as lâminas do tampão e deixar secar no escuro;
- 6) Mergulhar as lâminas em solução de DAPI (0,6 mg/mL) por 30 minutos.
- 7) Retirar as lâminas da solução de DAPI e mergulha-las em tampão McIlvaine por 5 minutos:

- 8) Retirar as lâminas do tampão e deixar secar no escuro;
- 9) Pingar sobre a lâmina duas gotas de sacarose 50% e cobrir com lamínula limpa e seca;
- 10) Incubar as lâminas no escuro em estufa a 37°C por no mínimo 3 dias e no máximo por 10 dias para analisar.

**Hibridação fluorescente in situ – FISH (Pinkel et al., 1986) com alterações (Pazza et al., 2006).**

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

Marcação da sonda:

- 1) Pipetar em tubo de 1,5mL no gelo;
  - i. 5µL 10x dNTP mix;
  - ii. \_\_\_µL (1µg) DNA;
  - iii. \_\_\_µL água destilada (q.s.p. 45 µL
  - iv. 5µL 10X Enzima Mix,
- 2) Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15.000g);
- 3) Incubar a 16°C por duas horas;
- 4) Adicionar 7,5µL de stop-buffer;
- 5) Precipitar o DNA com 5µL de acetato de sódio 3M e 100µL de etanol absoluto gelado. Misturar invertendo o tubo, levar a freezer – 20°C por duas horas, ou overnight;
- 6) Centrifugar a 15.000g por dez minutos;
- 7) Cuidadosamente remover o sobrenadante e secar o pellet;

- 8) Ressuspender o pellet em 50  $\mu$ L de água autoclavada;
- 9) Repetir os passos 5 e 6;
- 10) Ressuspender em 80  $\mu$ L de tampão TE [10mM Tris-HCl(pH 7.5) – 1mM EDTA] e armazenar a 20°C. Caso utilize a sonda no mesmo dia, pode adicionar água destilado no lugar do TE.

#### Preparação das lâminas:

- 1) Pingar 1 a 3 gotas da suspensão celular sobre uma lâmina limpa e aquecida a 60°C em água destilada e deixar secar ao ar.

#### Tratamento com RNase:

- 1) Incubar as lâminas em 90  $\mu$ L de RNase 0,4% em 2xSSC, por uma hora em câmara úmida a 37°C.
- 2) Lavar três vezes em 2xSSC por 5 minutos;
- 3) Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

#### Pós-fixação

- 1) Pós-fixar as lâminas em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM de cloreto de magnésio durante 10 minutos, em temperatura ambiente;
- 2) Lavar as lâminas durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente;
- 3) Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70% (agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada;

#### Pré-hibridação

- 1) Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C;

- 2) Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada;
- 3) Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se a solução de hibridação.

#### 3.6.6 – solução de hibridação

Adicionar aos 80  $\mu$ L de sonda marcada:

- 1) 200  $\mu$ L de formamida pura;
- 2) 80  $\mu$ L de sulfato dextrano 50% (concentração de 10%);
- 3) 40  $\mu$ L de 20xSSC.

#### Hibridação da sonda

- 1) Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;
- 2) Colocar 40  $\mu$ L da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula;
- 3) Deixar as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C overnight.

#### Lavagens

- 1) Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos apenas para tirar a lamínula. Escorrer bem as lâminas sem deixar secar;
- 2) Lavar as lâminas 2 vezes em 0,1xSSC a 42°C, por 5 minutos cada;
- 3) Lavar 1 vez em 2xSSC a 42C por 5 minutos;
- 4) Lavar em solução de Tween 20/20xSSC durante 5 minutos, a temperatura.

#### Detecção do sinal

- 1) d) incubar as lâminas em tampão NFDm por 15 minutos;

- 2) Lavar 2 vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
- 3) Incubar as lâminas com 90 $\mu$ L de FITC-avidina, durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- 4) Lavar 3 vezes Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
- 5) Incubar com 90 $\mu$ L de anti-avidina (conjugada com biotina) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- 6) Repetir o passo 4 (lavagem);
- 7) Repetir o passo 5 (anti-avidina);
- 8) Repetir o passo 4 (lavagem);
- 9) Repetir o passo 5 (anti-avidina);
- 10) Repetir o passo 4 (lavagem);
- 11) Repetir o passo 3 (FITC);
- 12) Repetir o passo 4 (lavagem);
- 13) Desidratar em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada e secar ao ar.

Montagem das lâminas:

As lâminas devem ser montadas com 25 $\mu$ L da solução de DAPI (corante) e antifade. Alternativamente pode-se utilizar o antifade da marca vector®,

### **Análise dos dados**

As lâminas foram analisadas no laboratório de Biologia Geral da Universidade do Estado de Mato Grosso, no laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da UFV-CRP e no laboratório de Sistemática Molecular de Vertebrados da UFV – Viçosa, em microscópio óptico acoplado a um sistema de captura digital.

Os cariótipos foram montados com auxílio do software image-pro plus 4.5, específicos para análise de imagem. A morfologia cromossômica foi definida segundo Levan et al. (1964), com modificações, baseada na razão entre braços (RB): Metacêntricos (RB=1,00 a 1,70), Submetacêntricos (RB=1,71 a 3,00), Subtelocêntricos (RB=3,01 a 7,00) e telocentricos (RB a partir de 7,01).

## REULTADOS

Os resultados são apresentados em dois capítulos:

**Capítulo 1** – Giongo, P.; Sampaio, W. M.S.; Fernandes, A. Dergam, J.A.; Kavalco, F. K.; Pazza, R. 2011. Diversidade cariotípica de "*Astyanax asuncionensis*" (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). 3(2): 53-58 - DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9

**Capítulo 2** – Giongo, P.; Sampaio, W. M. S.; Kavalco, K. F.; Dergam, J. A.; Pazza, R. Citogenética complexo de "*Astyanax bimaculatus*" nas bacias adjacentes dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná Artigo a ser submetido.

**Diversidade cariotípica de *Astyanax asuncionensis* (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai)**

**Karyotypic diversity of *Astyanax asuncionensis* (Teleostei Characiformes) from Sepotuba river microbasin (Upper Paraguai basin)**

Patrícia Giongo<sup>1,3\*</sup>, Wagner Martins Santana Sampaio<sup>1</sup>, Anderson Fernandes<sup>2</sup>, Jorge Abdala Dergam<sup>1</sup>, Karine Frehner Kavalco<sup>3</sup>, Rubens Pazza<sup>3</sup>

1. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal
2. Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra
3. LaGEEvo – Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba

patricia\_giongo@yahoo.com.br

**Resumo**

Este trabalho teve por objetivo utilizar ferramentas da citogenética para estudar *A. asuncionensis* na microbacia do Sepotuba. Os espécimes foram coletados nos córregos São José e Bocaiuíval e no Rio Sepotuba, na região de Tangará da Serra – Mato Grosso. A partir da coloração convencional foi possível observar a ocorrência de cinco citótipos. O citótipo A foi encontrado no Rio Sepotuba com número cromossômico  $2n=50$ , número fundamental (NF) igual a 94 e morfologia cromossômica de  $14m+10sm+18st+8a$ . No córrego São José, foram encontrados três citótipos, o citótipo B com  $2n=50$ ,  $4m+20sm+14st+12a$  e  $NF=88$ , o citótipo C com  $2n=50$ ,  $26m+14sm+22st+8a$  e  $NF=92$ , e o citótipo D com  $2n=48$ ,  $6m+10sm+16st+16a$  e  $NF=80$ . O citótipo E do córrego Bocaiuíval apresentou  $2n=50$ ,  $6m+10sm+20st+14a$  e  $NF=86$ . A impregnação com nitrato de prata revelou marcações simples nas regiões teloméricas dos cromossomos submetacêntricos e o bandamento C evidenciou regiões heterocromáticas nas regiões teloméricas, centroméricas e pericentroméricas. Os resultados evidenciam uma variação interpopulacional da macroestrutura cariotípica em *Astyanax asuncionensis*.

**Palavras-chave:** *Astyanax asuncionensis*, Alto Paraguai, citogenética.

**Abstract**

This study aimed to use cytogenetic tools to study *A. asuncionensis* from Sepotuba microbasin. The specimens were collected in Bocaiuval and São José Streams and in Sepotuba River, in Tangará da Serra-Mato Grosso region. Based on conventional staining, it was possible to determine the occurrence of five cytotypes. The cytotype A was detected in Sepotuba River with presented chromosome number  $2n=50$ , fundamental number (FN) equal to 94 and karyotypic morphology of  $14m + 10sm + 18st + 8a$ . In São José stream, three cytotypes were observed, the cytotype B with  $2n=50$ ,  $4m+20sm+12st+14a$  and  $FN=88$ , the cytotype C with  $2n=50$ ,  $6m+14sm+22st+8a$  and  $FN=92$ , the cytotype D with  $2n=48$ ,  $6m+10sm+16st + 16a$  and  $FN=80$ . The cytotype E found in Bocaiuval stream presented  $2n=50$ ,  $6m+10sm+20st+14a$  and  $FN=86$ . The silver nitrate staining revealed single nucleolus organizer regions at telomeric regions of submetacentric chromosomes, and C-banding showed heterochromatic sites at telomeric, centromeric and pericentromeric regions. The results show an interpopulational variation of the karyotype macrostructure in *Astyanax asuncionensis*.

**Key words:** *Astyanax asuncionensis*, Alto Paraguai, cytogenetics.

## Introdução

O gênero *Astyanax* inclui peixes de pequeno porte de até 200mm, vulgarmente conhecido como lambaris, e comuns nas bacias hidrográficas neotropicais (Garutti, 1998). As últimas revisões registram cerca de 100 espécies nas águas continentais brasileiras para o gênero *Astyanax*, com a posição indeterminada (*Incertae sedis*) dentro da família Characidae (Lima et al., 2003; Bertaco e Garutti, 2007).

O gênero *Astyanax* revela espécies morfológicamente muito semelhantes e com grande variabilidade cariotípica dentro da mesma bacia, formando um grupo altamente complexo ao nível taxonômico e citogenético. Este fato fez com que alguns autores enquadrassem algumas espécies desse gênero como um complexo de espécies, pois esse conceito suportaria essas variações. Assim, complexos dentro do gênero *Astyanax* foram determinados para *A. scabripinnis*, *A. bimaculatus*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. hastatus* e outras espécies do gênero (Moreira-Filho e Bertollo, 1991, Fernandes e Martins-Santos, 2004; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Pazza e Kavalco, 2007; Pazza et al., 2008; Medrado et al., 2008; Kavalco et al., 2009a). Dessa forma, os estudos citotaxonômicos no gênero vem contribuindo de forma substancial no entendimento das questões genéticas e evolutivas envolvidas na diferenciação cromossômica do grupo (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998; Oliveira et al., 2009a).

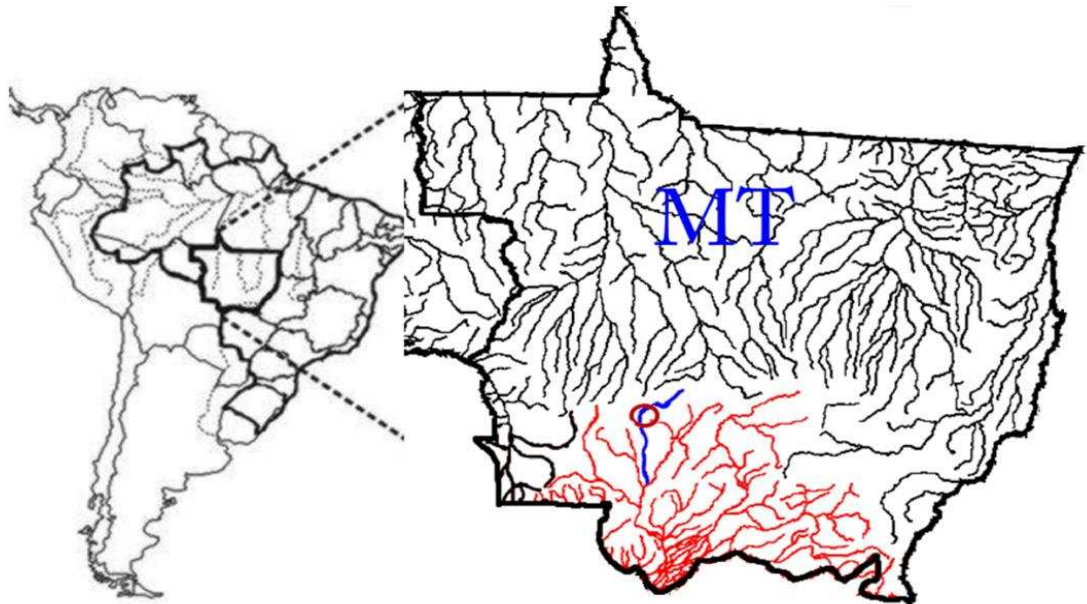
Estudos citogenéticos para o gênero *Astyanax* evidenciam uma diversidade cariotípica de  $2n=36$  em *Astyanax schubarti* (Daniel-Silva e Almeida Toledo, 2001, 2005) a  $2n=50$  em *Astyanax scabripinnis*, *A. bockmani*, *A. altiparanae* e *A. fasciatus* (Oliveira et al., 1988; Souza e Moreira-Filho, 1995; Artoni et al., 2006; Kavalco et al., 2009b; Ferreira-Neto et al., 2009) com morfologia cromossômica e padrões de bandamento diversificados.

Os estudos citogenéticos realizados por Troy (2004) para espécie *A. asuncionensis* na microbacia do rio Cuiabá (bacia do Paraguai) na região de Chapada do Guimarães, de Cáceres e de Cuiabá demonstram uma conservação da estrutura cariotípica com número diplóide  $2n=50$ , sendo a fórmula cariotípica igual a  $14m+18sm+12st + 6ae N F=94$ . Porém, Oliveira (2009b), em suas revisões, registra variações no número cromossômico ( $2n=48$ ) e na Fórmula Cariotípica para a *A. asuncionensis* no rio Miranda em Mato Grosso do Sul (Bacia do Paraguai).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar citogeneticamente *A. asuncionensis* a fim de entender a diversidade cromossômica encontrada no gênero.

### Material e Métodos

Foram coletados 50 espécimes de *A. asuncionensis* (13 machos e 37 fêmeas) na microbacia do Rio Sepotuba (rio Sepotuba, córrego São José e córrego Bocaiuval), no município de Tangará da Serra, Mato Grosso (Figura 1). A metodologia utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o protocolo proposto por Bertollo e colaboradores (1978). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram localizadas através da impregnação por nitrato de prata, conforme Howell e Black (1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado a partir do bandamento C, seguindo a técnica de Sumner (1972). Os cariótipos foram montados com auxílio de softwares de análise de imagem e a morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a razão de braços (RB) proposta por Levan et al. (1964).



**Figura 1:** Área de estudo de *A. asuncionensis*: em preto, bacia amazônica; em vermelho, bacia do Paraguai Paraná; em azul, microbacia do Sepotuba; círculo vermelho, área de estudo na região de Tangará da Serra.

## Resultados

Os resultados mostram a ocorrência de cinco citótipos em *Astyanax asuncionensis* da microbacia do rio Sepotuba (Tabela 1 e Figura 2).

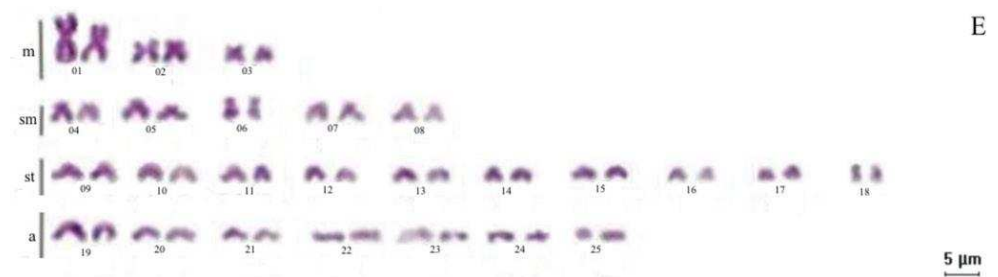
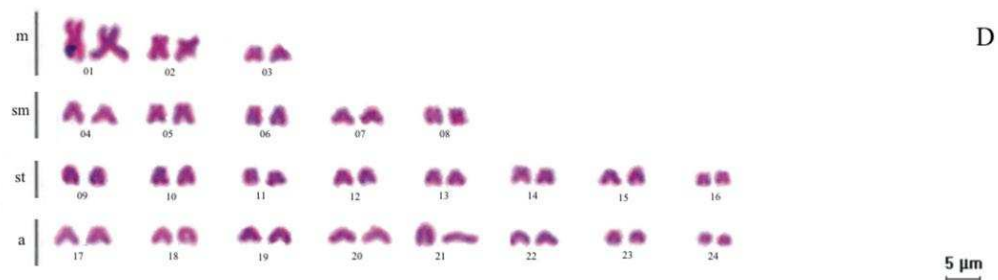
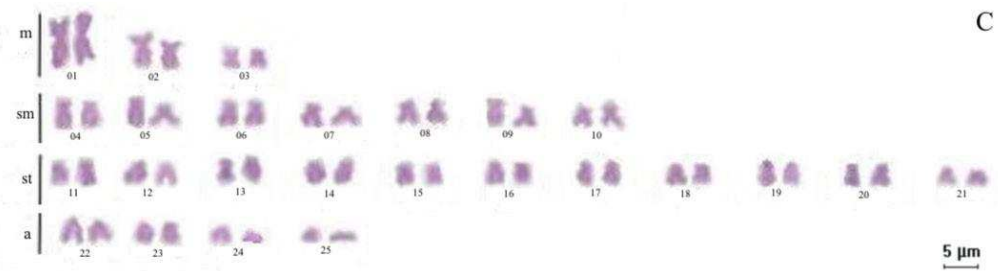
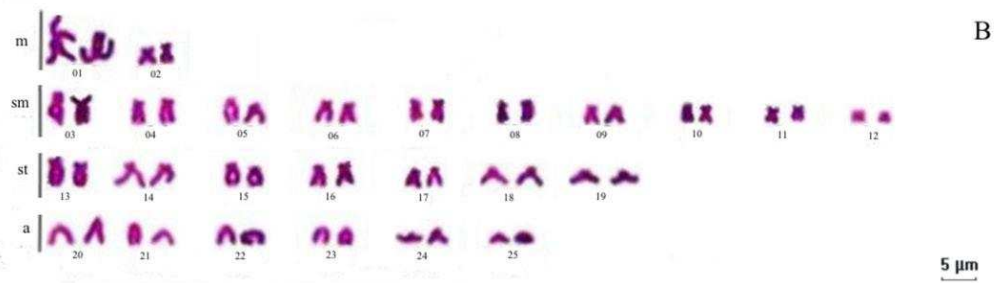
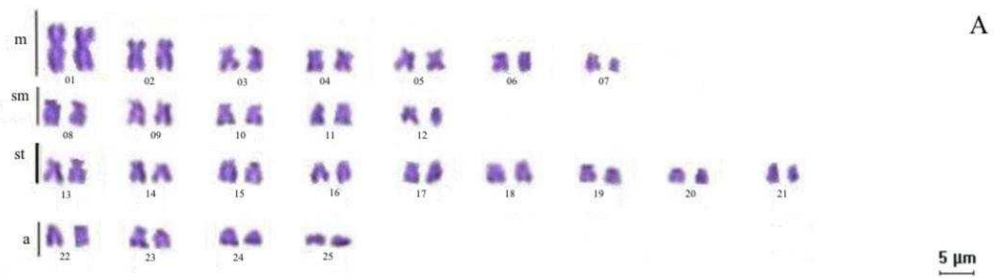
**Tabela 1:** Resultados obtidos com técnicas citogenéticas aplicada para *Astyanax asuncionensis*. T: Telomérica, C: Centromérica, P: Pericentromérica, BC: Braço Curto e BL: Braço Longo.

Ponto de coleta	2n	NF	Morfologia Cromossômica	RONs	Heterocromatina	Citótipo
Rio Sepotuba	50	94	14m+10sm+18st+8a	2	T-BL	A
córrego São José	50	88	4m+20sm+14st+12a	2	T-BC, T-BL	B
córrego São José	50	92	6m+14sm+22st+8a	2	C, P-BC, BL	C
córrego São José	48	80	6m+10sm+16st+16a	1	C, T-BC, BL	D
córrego Bocauiual	50	86	6m+10sm+20st+14a	2	-	E

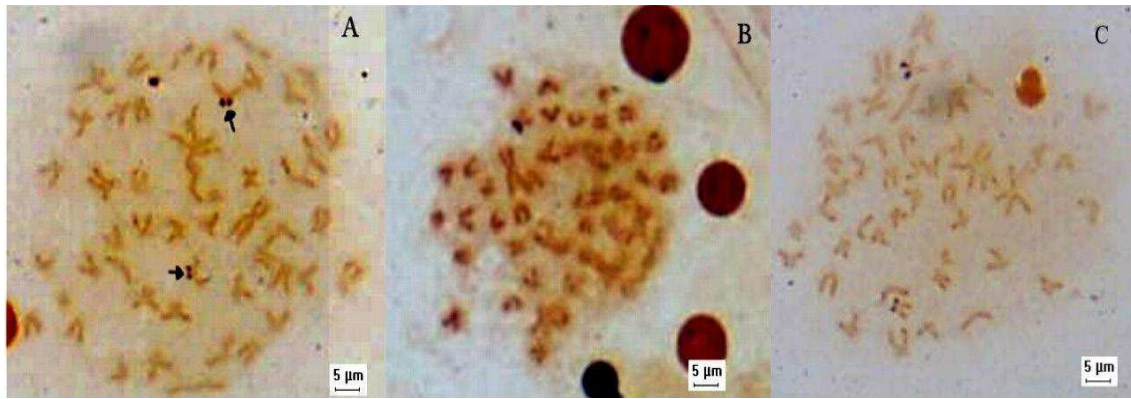
Para o Rio Sepotuba foi encontrado o citótipo A com número cromossômico  $2n=50$ , sendo a fórmula cariotípica igual a  $14m+10sm+18st+8a$  e  $NF=94$  (Figura 2A). Para o córrego São José foram encontrados 3 citótipos (B, C, D). O citótipo B apresenta  $2n=50$  ( $4m+20sm+14st+12a$  e  $NF=88$ ), o citótipo C com  $2n=50$  ( $6m+14sm+22st+8a$  e  $NF=92$ ) e o citótipo D  $2n=48$  ( $6m+10sm+16st+16a$  e  $NF=80$ ) (Figura 2B,C,D). Para o córrego Bocauiual foi encontrado apenas um citótipo (citótipo E) com  $2n=50$  ( $6m+10sm+20st+14a$  e  $NF=86$ ) (Figura 2E).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) reveladas pelo nitrato de prata mostraram para os espécimes dos citótipos B e D, marcações na região terminal do braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos. Para o citótipo E marcações Ag-RONs terminais no braço curto em um par de cromossomos submetacêntricos marcados (Figura 3).

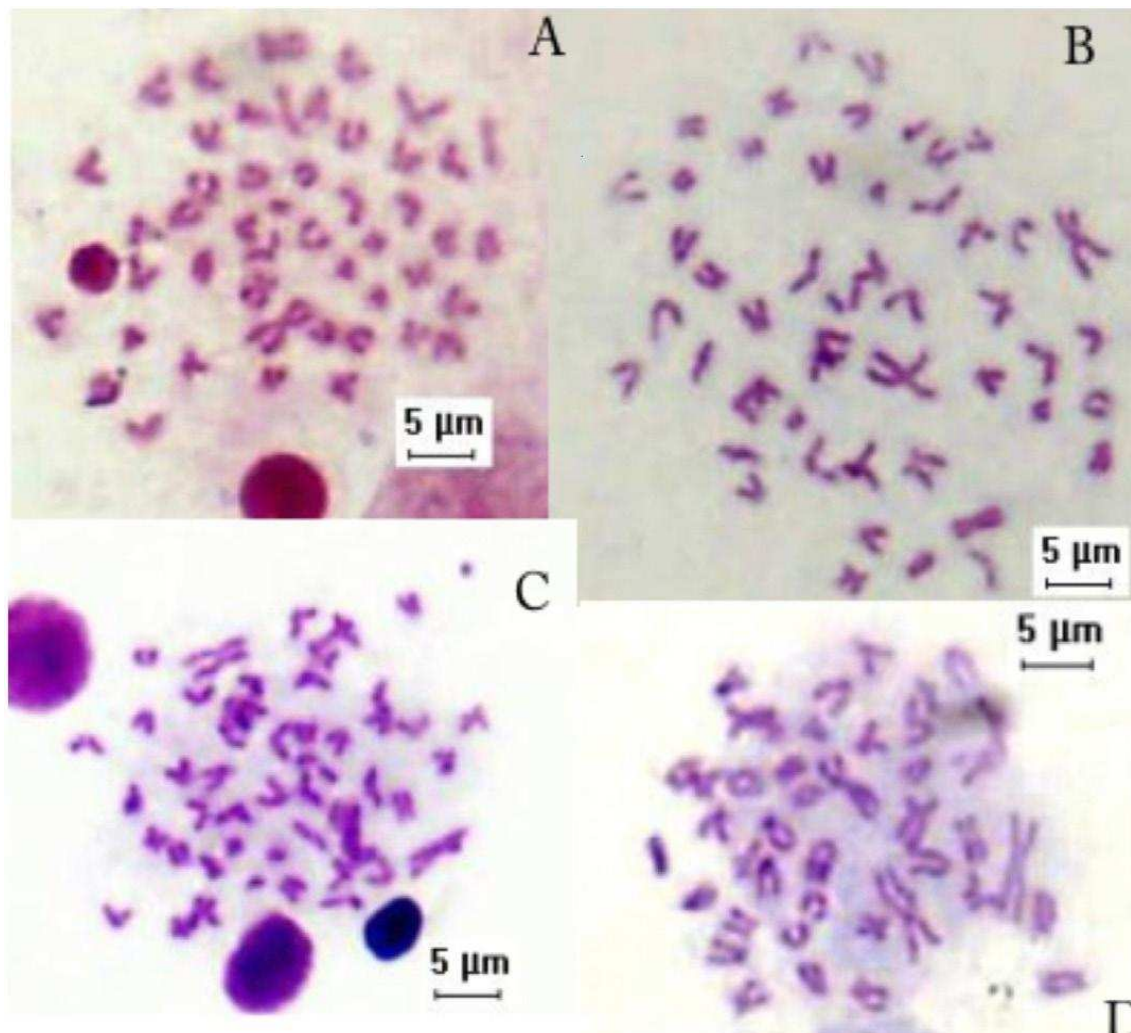
Os resultados encontrados para Banda C mostram padrões de heterocromatina para o citótipo A distribuídas nas regiões terminais do braço longo de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos (Figura 4A). Para os citótipos B, C e D as regiões heterocromáticas se encontram nas regiões centroméricas, pericentroméricas e terminais tanto no braço longo como no braço curto de cromossomos submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos (Figura 4B,C,D). Para o Citótipo E não foram observados resultados significativos.



**Figura 2:** Cariótipos de *Astyanax asuncionensis* da microbacia do Sepotuba: 2A) Citótipo A, Rio Sepotuba; 2B) Citótipo B, Corrego São José; 2C) Citótipo C, córrego São José; 2D) Citótipo D, córrego São José; 2E) Citótipo E, córrego Bocauival.



**Figura 3:** Ag-RONs em *Astyanax asuncionensis*: 3A), Citótipo B, córrego São José; 3B), Citótipo D, córrego São José; 3C) Citótipo E, córrego Bocaiuva.



**Figura 4:** Distribuição de heterocromatina em *Astyanax asuncionensis* da microbacia do Sepotuba: 4A) Citótipo A, Rio Sepotuba; 4B) Citótipo B, córrego São José; 4C) Citótipo C, córrego São José; 4D) Citótipo D, córrego São José.

## Discussão e Conclusões

Os resultados quanto ao número cromossômico, morfologia cromossômica e Número Fundamental (NF), estão dentro da variação esperada para o gênero *Astyanax* de  $2n=36$  à  $2n=50$  (Oliveira et al., 1988; Oliveira, 2009b). Os citótipos A, B, C e E conservaram  $2n=50$  corroborando estudos feitos em outros rios brasileiros (Martínez et al., 2012). O citótipo D apresentou  $2n=48$ , sendo encontrado, para esta espécie, apenas por Carvalho et al. (2002) também em um rio sul mato-grossense (Bacia do Paraguai). Essa diferença do número cromossômico pode ser consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fusão ou fissão.

Os dados obtidos para os espécimes do citótipo A são muito semelhantes aos encontrados em outros estudos para o complexo “*A. bimaculatus*” em outras bacias (Kavalco et al., 2009; Kavalco et al., 2012; Martínez et al., 2012). Porém, os resultados encontrados nos córregos São José e Bocaiuval (Citótipos B, C e E) divergem na morfologia cromossômica e NF, mas mantêm seus números diplóides constantes, indicando que inversões pericêntricas podem ter desempenhado um papel importante na evolução cromossômica.

Neste estudo, um sistema de RONS simples foi encontrado em todos os citótipos. Embora o RON simples esteja dentro dos padrões já encontrados para o grupo (Kavalco et al., 2009; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2012; Martinez et al., 2012), sistema RONS múltiplas são mais comum ao gênero *Astyanax* (Domingues et al., 2007; Vicari et al., 2008; Ferreira-Neto, 2009; Ferreira-Neto et al., 2012). O padrão de bandas heterocromáticas encontrado no presente trabalho corroboram outros estudos para o complexo “*A. bimaculatus*” (Kavalco et al., 2009; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2011, Martinez et al., 2012 ).

Os resultados evidenciam uma variação cariotípica interpopulacional em *Astyanax asuncionensis*, situação comum para o gênero (Domingues et al., 2007; Kavalco et al., 2009; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2011; Perez et al., 2011, Martinez et al., 2012). A acentuada diversidade encontrada nesses lambaris parece estar relacionada com a ampla distribuição geográfica desse grupo de peixes e sua capacidade de explorar grande variedade de microhabitats, formando pequenas populações com dispersão relativamente restrita, o que facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos (Garutti e Britski, 2000).

## **Referências Bibliográficas**

As bibliografias utilizadas encontram-se no final do trabalho.

**Citogenética do complexo “*Astyanax bimaculatus*” nas bacias adjacentes dos rios Paraguai, Araguaia e Alto Paraná**

**Cytogenetics of complex “*Astyanax bimaculatus*” adjacent basins of the Paraguay, and Araguaia rivers Alto Paraná**

Patrícia Giongo<sup>1,2\*</sup>, Wagner Martins Santana Sampaio<sup>1</sup>, Karine Frehner Kavalco<sup>2</sup>, Jorge Abdla Dergam<sup>1</sup>, Rubens Pazza<sup>1,2</sup>

1 – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal

2- Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário de Rio Paranaíba, LaGEEvo – Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva.

\*patricia\_giongo@yahoo.com.br

**Resumo**

Este trabalho teve por objetivo utilizar ferramentas da citogenética para estudar populações do complexo “*Astyanax bimaculatus*” em três bacias brasileiras adjacentes e contribuir para entendimento da diversidade genética do grupo. Os espécimes foram coletados no rio Meia Ponte (Bacia do Alto Paraná), no rio Mutum (Bacia Araguaia), no córrego São José e rio Sepotuba (Bacia do Alto Paraguai). Os estudos cromossômicos seguiram os protocolos básicos para as principais técnicas citogenéticas. As populações estudadas de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* e *Astyanax asuncionensis* apresentaram número diplóide de  $2n=50$ . Não foi registrado sistema cromossômico sexual entre os espécimes analisados. Os resultados encontrados demonstraram pequenas variações cariotípicas entre as populações das três bacias, que podem estar relacionadas às distintas pressões que estas populações sofreram nas suas histórias evolutivas relacionadas a eventos vicariantes e a outros gargalos como deriva genética e mutações.

**Palavras-Chave:** *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus*, citogenética.

**Abstract**

The present study investigated cytogenetically complex populations "*Astyanax bimaculatus*" in three Brazilian basins adjacent and contribute to understand of the genetic diversity of the group. The specimens were collected in the Meia Ponte River (Upper Paraná Basin) in Mutum (Araguaia Basin), in São José stream and river Sepotuba (Upper Paraguay River Basin). The chromosomal studies followed the basic protocols for major cytogenetic techniques. The populations studied *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* and *Astyanax asuncionensis* showed a diploid number of  $2n = 50$ . There were no registered sex chromosome system among the specimens analyzed. The results showed small karyotypic variations among populations of the three basins that may be related to different pressures that these people suffered in their evolutionary histories related to variation events and other bottlenecks such as genetic drift and mutations.

**Keywords:** *Astyanax altiparanae*, *Astyanax* aff. *argyrimarginatus*, cytogenetics.

## Introdução

O conhecimento da ictiofauna neotropical tem experimentado grandes avanços ao relacionar as análises taxonômicas a novas ferramentas como a biologia molecular e a citogenética. Alguns grupos de peixes apresentam ampla ocorrência nas bacias hidrográficas neotropicais, padrões biogeográficos complexos e classificação incerta, principalmente os grupos de pequeno porte e morfologia semelhante (Mariguela et al., 2013), apresentando-se como de extrema importância para o entendimento evolutivo dos peixes neotropicais (Albert e Reis, 2011). A família Characidae por ser uma das maiores e mais complexas famílias de peixes do mundo, engloba vários desses grupos problemáticos que se apresentam com muita controvérsia sobre sua composição e as inter-relações de seus táxons (Nelson, 2006; Buckup, 2007; Mirande, 2010; Javonillo et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Eschmeyer e Fong, 2013; Mariguela et al., 2013).

Dentro de Characidae o gênero *Astyanax* é um dos mais abundantes e diversificados, a sua ampla distribuição geográfica na região neotropical acompanha uma grande plasticidade genética e fenotípica e posição incerta dentro da Família Characidae (Garutti e Britski, 2000; Lima et al., 2003; Kavalco et al., 2011; Mendes et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Matoso et al., 2013). O gênero *Astyanax* esta entre um dos mais complexos desta família, apresenta mais de 100 espécies validas (Froese e Pauly, 2013), formada por espécies muito semelhante taxonomicamente e com grande variedade cariotípica. Assim algumas espécies foram consideradas complexos de espécies, como *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), *Astyanax fasciatus* (Pazza et al., 2006), *A. altiparanae* (Fernandes e Martins –Santos, 2004), *A. hastatus* (Kavalco et. al., 2009a) e *A. eigenmanniorum* (Mendes et al., 2011).

A citogenética atualmente é uma ferramenta muito importante para avaliar a variabilidade genética e endemismo, bem como para complementar estudos filogenéticos (Kavalco et al., 2011; Matoso et al., 2013). Estudo citogenéticos para o gênero *Astyanax* têm demonstrado uma grande diversidade cariotípica, com um número de cromossomos variando de  $2n = 36$  em *A. schubarti* (Morelli et al., 1983) e *A. correntinus* (Paiz, 2013) a  $2n = 50$  em *A. scabripinnis*, *A. altiparanae* (Kavalco et al., 2011). As regiões organizadoras de nucléolo também variam em relação ao número e localização e a heterocromatina esta localizada, preferencialmente, nas regiões teloméricas, porém podem ocorrer nas regiões centroméricas e pericentroméricas, assim como o padrão de fluorocromos base-específico CMA<sup>3</sup> e FISH com sondas rDNA 18S e 5S (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Porto et al., 1992; Maistro et al., 2000; Mestriner et

al., 2000; Matoso et al., 2002; Centofante, 2003; Fernandes e Martins-Santos, 2004; Troy, 2004; Domingues, 2005; Abel et al., 2006; Artoni et al., 2006; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Pazza et al., 2006; Santos e Morelli, 2006; Kavalco et al., 2009a; Kavalco et al., 2011; Kavalco et al., 2013; Paiz, 2013).

O complexo “*Astyanax bimaculatus*” é formado por um grupo que compreende cerca de 22 espécies, todas elas caracterizadas por uma mancha oval preta na horizontal região umeral, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha preta no pedúnculo caudal prorrogado até a extremidade mediana dos raios da nadadeira caudal (Garutti e Britski, 2000; Garutti e Langeani, 2009). No entanto, a sobreposição de alguns caracteres taxonômicos gera dúvidas sobre a validade destas espécies (Peres et al., 2012). Se por um lado essas variações dificultam inferências precisas sobre a evolução do grupo (Kavalco e Pazza, 2007), por outro, aumentam a importância de estudos mais específicos para este gênero e seus complexos (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998).

As espécies do complexo “*Astyanax bimaculatus*”, apresentam citótipos com  $2n=50$ , caracterizado por um par de cromossomos metacêntricos considerados simplesiomórfico. Padrão múltiplo de impregnação por nitrato de prata. Outra característica comum neste gênero refere-se à ocorrência de múltiplos sítios de rDNA 18S, confirmado por fluorocromos base-específica (Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009b; Mendes et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Kavalco et al., 2011; Peres et al., 2012). O padrão simples para rDNA 5S apresenta-se como uma característica derivada (Kavalco et al., 2009b; Kavalco et al., 2011; Paiz, 2013). As regiões heterocromáticas apresentam-se distribuídas de forma bastante variada concentradas nas regiões pericentroméricas (Troy, 2004; Pacheco et al. 2011; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009b; Kavalco et al., 2011; Mendes et al., 2011; Giongo et al., 2012; Peres et al., 2012, Paiz, 2013).

Os estudos citogenéticos para espécies do complexo “*Astyanax bimaculatus*”, são muito interessantes, pois apresenta grande diversidade de citótipos e sistemática indefinida (Oliveira et al., 2009a; Martinez et al., 2012). Estudar populações deste grupo em diferentes bacias é extremamente importante para complementar e auxiliar o entendimento dos padrões de diversificação da ictiofauna neotropical. Kavalco e Moreira-Filho (2003) sugeriram que a diferenciação para o grupo poderia estar relacionada a processos de diversificação local. Albert et al., (2011) aponta pouca

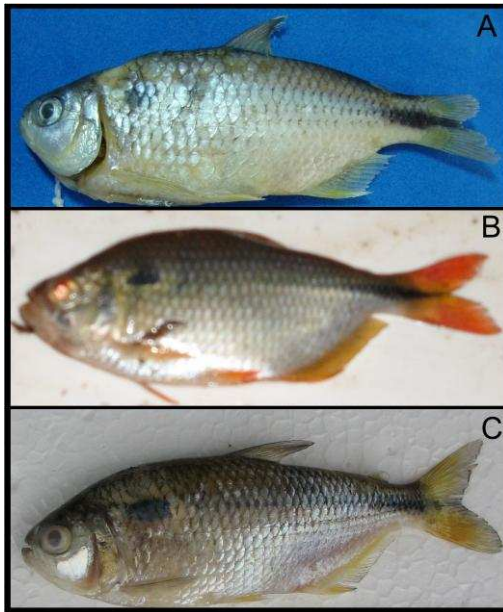
participação desse tipo de processo para diversificação em peixes neotropicais. De acordo as considerações de Albert et al., (2011), provavelmente a disparidade cariotípica do grupo está intimamente relacionada ao padrão biogeográfico e geomorfológico dos rios sul-americanos, onde espécies puderam acumular diferenças em escala continental e sobre prazos geológicos relativamente longos. Por outro lado as diferenças específicas na macroestrutura cariotípica, que fortalecem o grupo como polifilético estão relacionados a outras taxas de diversificação, relacionada a questões ecológicas, fisiológicas e comportamentais oferecidas pela história da paisagem, estando relacionada a radiações recentes.

Tudo isso faz com que as espécies do gênero *Astyanax* sejam um excelente modelo para estudos biogeográficos e evolutivos (Calcagnotto et al., 2005).

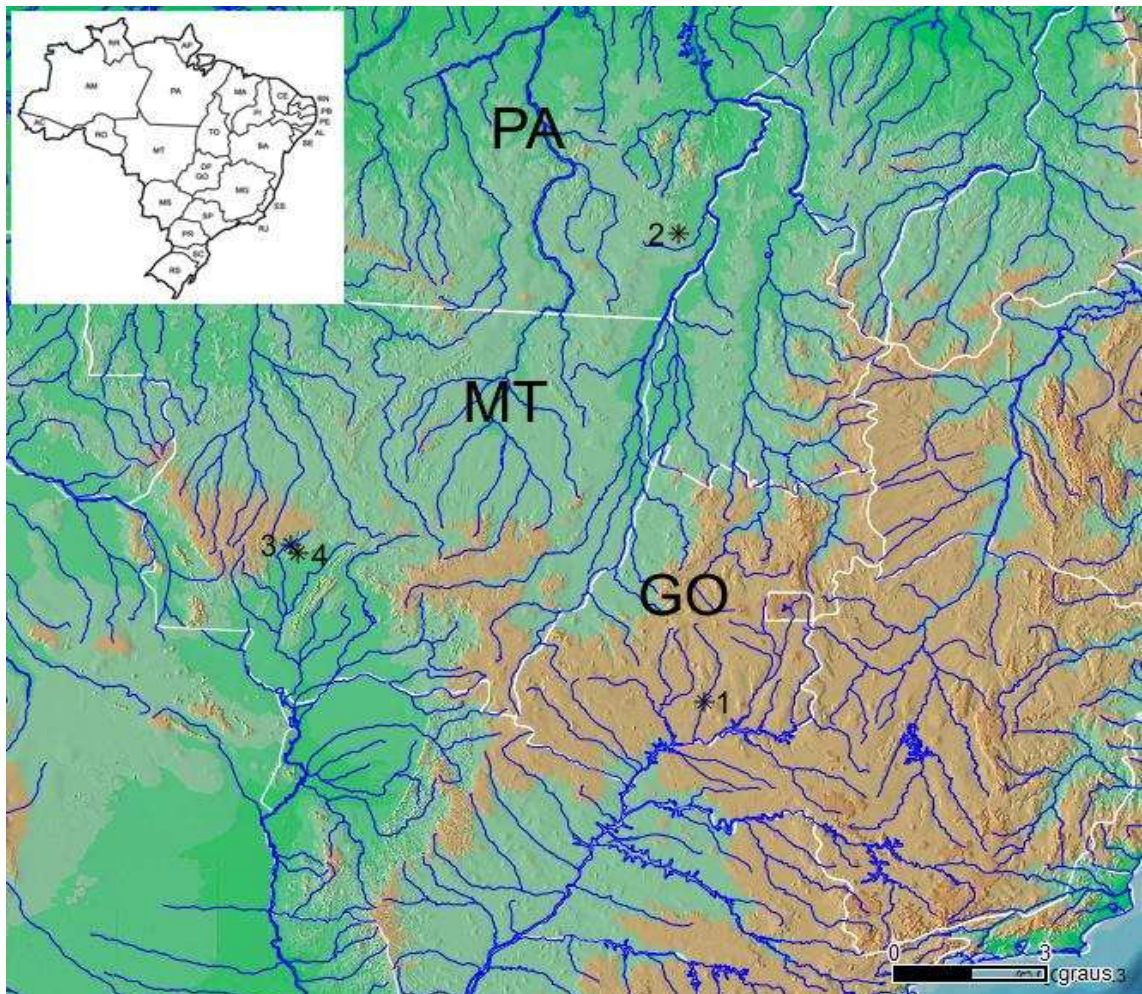
Nesse contexto o presente trabalho tem por objetivo estudar populações do complexo “*Astyanax bimaculatus*” em três bacias adjacentes brasileiras e contribuir para entendimento da diversidade genética do grupo.

## **Material e Métodos**

Foram coletados 10 espécimes de *Astyanax altiparanae* (Figura 1A), (3 machos e 7 fêmeas) no rio Meia Ponte (Bacia do Paraná), no município de Aloândia-GO, 17 espécimes de *Astyanax argyrimarginatus* (Figura 1B), (5 machos e 12 fêmeas), no rio Mutum (Bacia Araguaia), no Município de Redenção-PA e 80 espécimes de *A. asuncionensis* (Figura 1C) no córrego São José (7 machos e 12 fêmeas) (citados no capítulo 1 como citótipo B) e rio Sepotuba (18 machos e 43 fêmeas) (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (Figura 02). A metodologia utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o protocolo de Bertollo (1978) e Moreira-Filho e Bertollo (1990). Para coloração com nitrato de prata foi utilizado o protocolo de Howell e Black, (1980) e Bandamento C método descrito por Sumner (1972) ambos com modificações. A dupla coloração com fluorocromos base-específicos (Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4',-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI)) segundo Verma e Babu (1995) com modificações feita por Fernandes (2004) e para hibridação fluorescente in situ – FISH (Pinkel et al., 1986) com alterações de Pazza et al., (2006). Os cariótipos foram montados com auxílio de softwares de análise de imagem e a morfologia cromossômica foi definida segundo Levan et al. (1964).



**Figura 1:** Espécies de peixes do complexo “*Astyanax bimaculatus*”. A. *altiparanae* (A); *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* (B); *A. asuncionensis* (C).



**Figura 2:** Área de estudo do complexo “*Astyanax bimaculatus*” em três bacias adjacentes. População de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (Bacia do Paraná), no município de Aloândia-GO (1); população de *A. aff. argyrimarginatus*, rio Mutum (Bacia Araguaia), no Município de Redenção-PA (2); população de *A. asuncionensis*, rio Sepotuba (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (3); população de *A. asuncionensis*, córrego São José (Bacia do Paraguai) no município de Tangará da Serra (4).

## Resultados

### *Astyanax aff. argyrimarginatus*

O número cromossômico de *A. aff. argyrimarginatus*,  $2n=50$ , fórmula cariotípica  $6m+14sm+16st+4a$ ,  $NF=84$ . A impregnação com Nitrato de Prata revelou, padrão de RONS simples, localizadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 3B). Os resultados com o fluorocromo base-específico  $CMA_3$  marcou o mesmo par de cromossomos submetacêntricos revelado pela impregnação com nitrato de prata (Figura 4A). O bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos pericentromérica em alguns cromossomos (Figura 5B). A hibridização *in situ* fluorescente revelou marcações simples para a sonda rDNA 18S em posição telomérica (Figura 6B), assim como RONS e  $CMA_3$ .

### *Astyanax altiparanae*

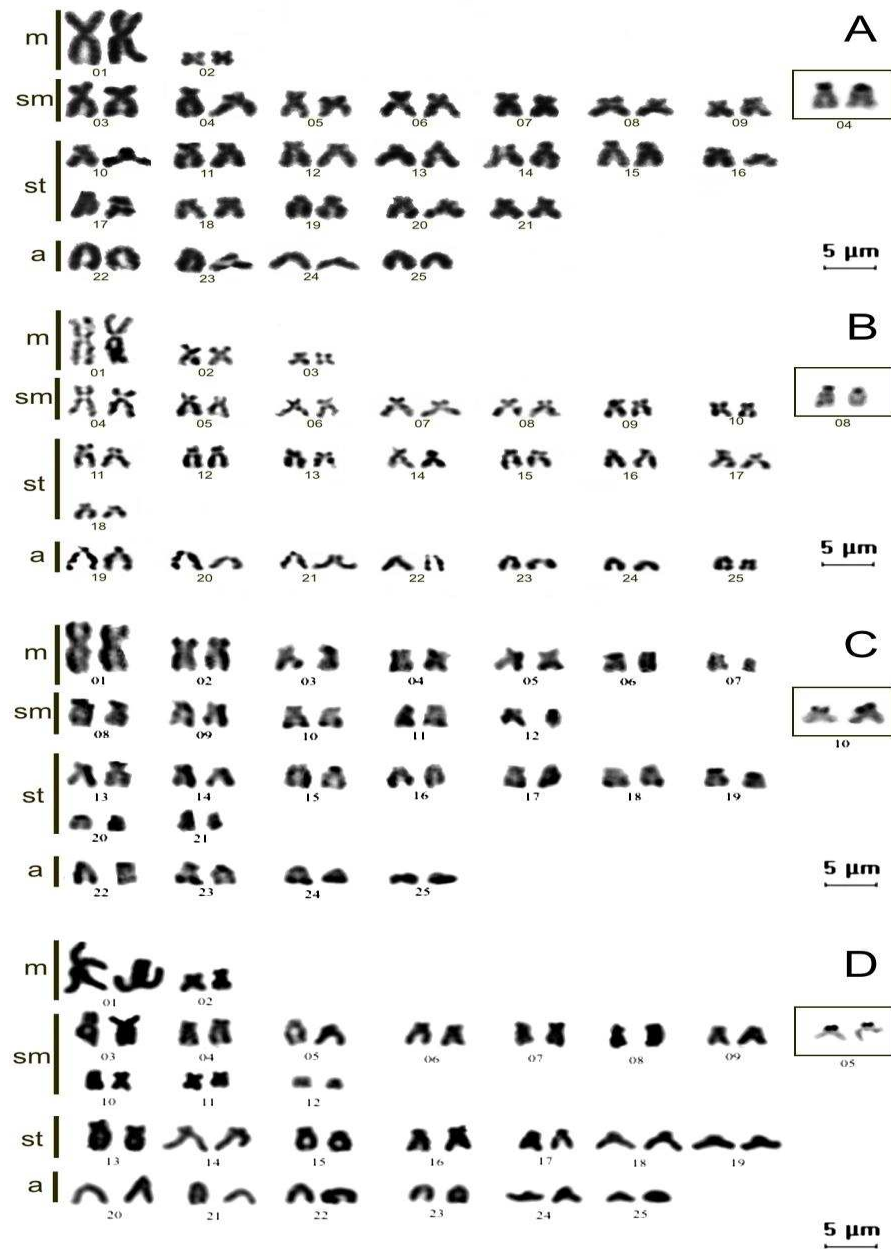
O número diploide verificado para *A. altiparanae* foi de  $2n=50$ , com fórmula cariotípica  $4m+14sm+24st+4a$  e Número Fundamental (NF) igual a 84. Foram observados sistema de RONS simples, localizadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 3A). O bandamento C mostrou heterocromatina pericentromérica em alguns cromossomos (Figura 5A). A hibridização *in situ* fluorescente revelou marcações simples para a sonda rDNA 18S em posição telomérica (Figura 6A).

### *Astyanax asuncionensis*

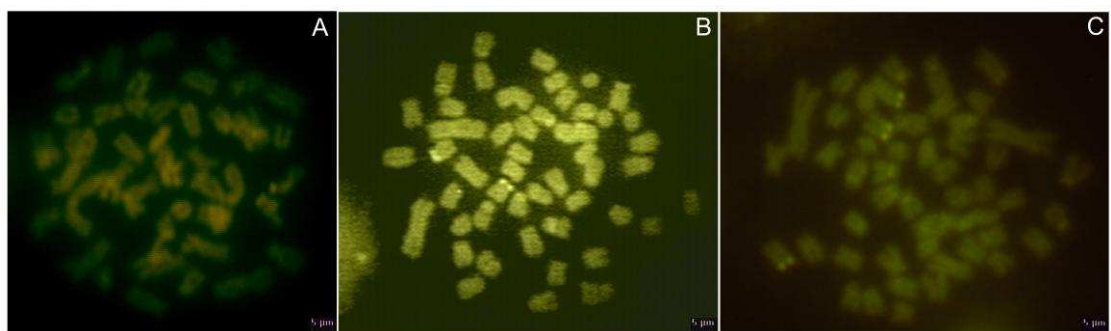
Nas populações de *A. asuncionensis* do Alto Paraguai foram encontrados dois citótipos diferentes, um para populações do rio Sepotuba (citótipo A) e o outro para populações do Córrego São José (citótipo B). Para ambos os citótipos foi registrado número diplóide  $2n=50$ . O citótipo A apresentou fórmula cariotípica  $14m+10sm+18st+8a$  (Figura 3C) e  $NF=92$ . O citótipo B apresentou fórmula cariotípica,  $4m+20sm+14st+12a$  (Figura 3D),  $NF= 88$ . Os resultados com Ag-RONS evidenciou padrão de RONS simples, localizadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos para ambos os citótipos (Figura 3C e 3D). A coloração com fluorocromo base-específico  $CMA_3$  marcou o mesmo par de cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos (RONS) para o citótipo A (Figura 4B), no entanto o Citotipo B revelou outras regiões ricas em GC além das marcadas pela Ag-RONS (Figura 4C). O bandamento C mostrou blocos heterocromáticos na região pericentromérica em alguns cromossomos nos dois citótipos (Figura 5C e 5D). A

hibridização *in situ* revelou marcações simples para a sonda rDNA 5S, em posição pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos em ambos citótipos (Figura 6 E, F). A sonda rDNA 18S revelou marcações simples, em posição telomérica para ambas as populações (Figura 6C, D).

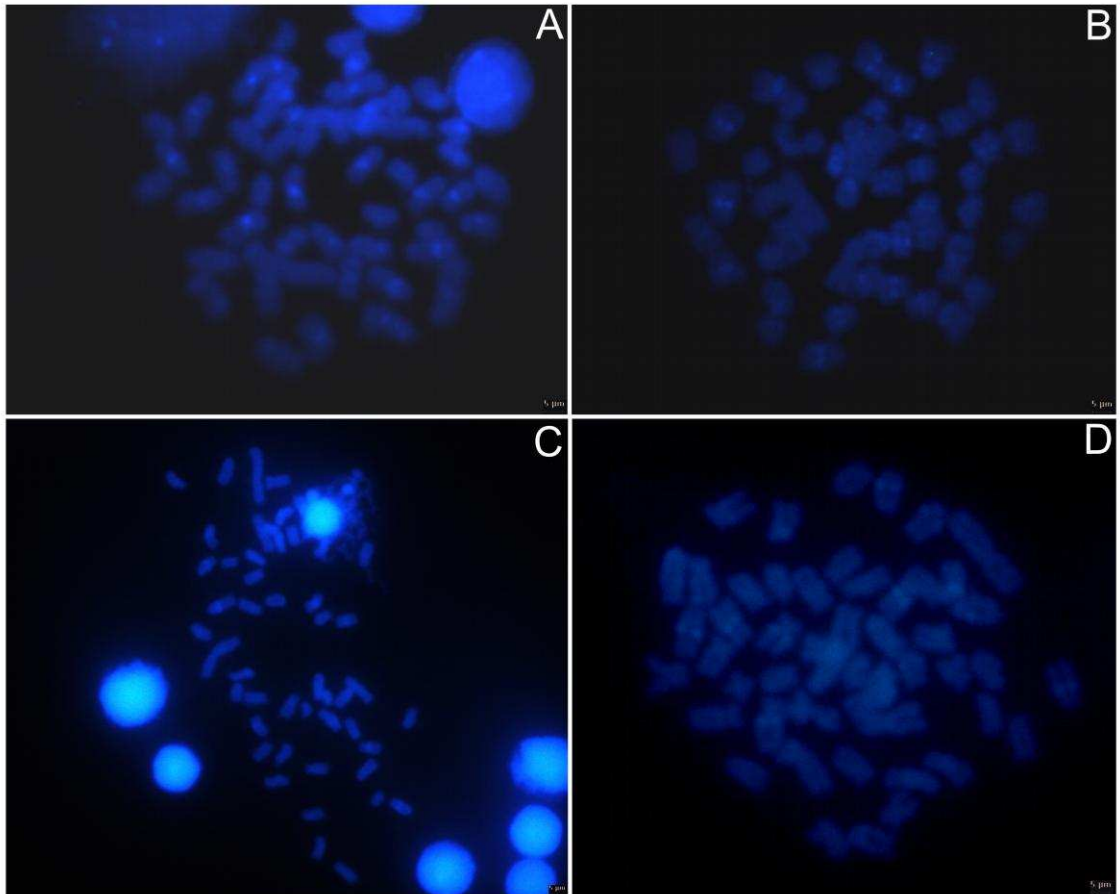
Não foi verificado sistema cromossômico sexual em nenhuma das populações estudadas.



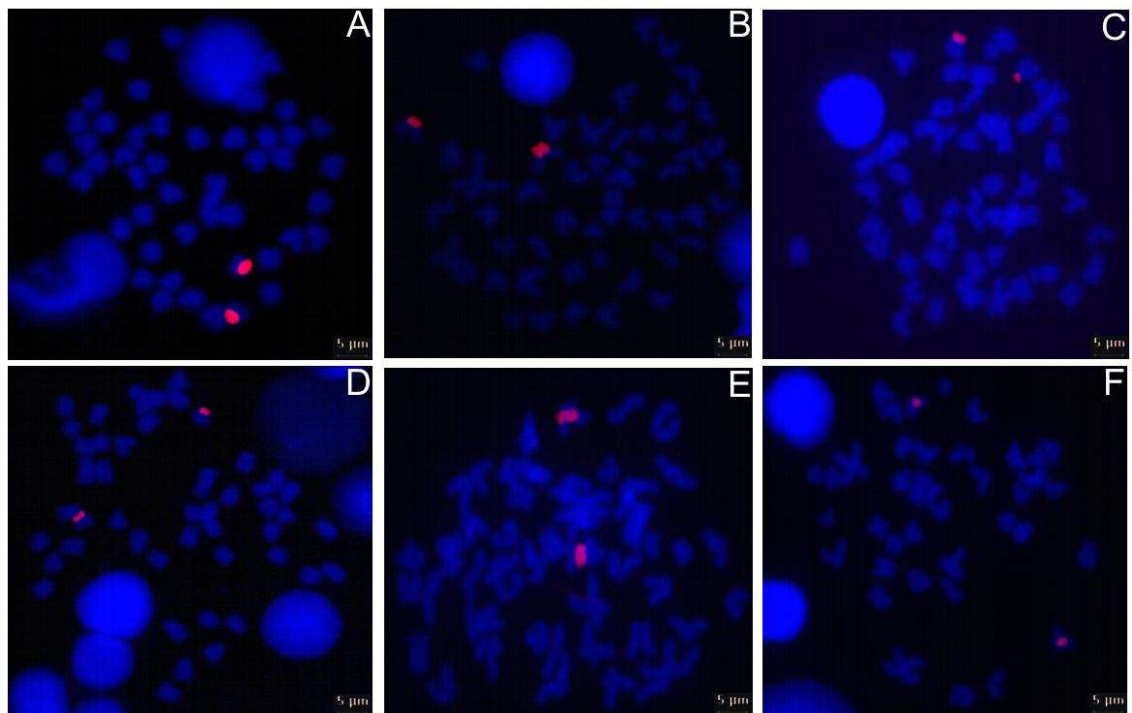
**Figura 3:** Cariótipos de *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte (A); *Astyanax* aff. *argyrimarginatus* rio Mutum (B); *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba (C), *Astyanax asuncionensis* correço São José (D). Em destaque os cromossomos portadores das RONS ao lado de seus respectivos cariótipos.



**Figura 4:** Metáfases coradas com CMA<sub>3</sub> (A) *A.* aff. *argyrimarginatus*, rio Mutum; (B) *A.* *asuncionensis*, rio Sepotuba; (C) *A.* *asuncionensis*, córrego São José.



**Figura 5:** Metáfase de Banda C-DAPI. (A) *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte; (B) *Astyanax* aff. *argyrimarginatus*, rio Mutum; (C) *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba, (D) *Astyanax asuncionensis*, corrego São José.



**Figura 6:** Metáfase de (A) *Astyanax altiparanae*, rio Meia Ponte; (B) *Astyanax* aff. *argyrimarginatus*, rio Mutum; (C, E) *Astyanax asuncionensis*, rio Sepotuba, (D, F) *Astyanax asuncionensis* corrego São José. FISH com sonda de rDNA 18S (A, B, C, D) e rDNA 5S (E, F).

## Discussão

O presente trabalho encontrou número cromossômico conservado ( $2n=50$ ) para as quatro populações do complexo “*Astyanax bimaculatus*” nas três bacias hidrográficas, corroborando outros estudos, no entanto, foram observadas diferenças nas fórmulas cromossômicas entre as populações estudadas no presente trabalhos (Figura 2) e estudos realizados por outros autores em diferentes bacias (Peres et al., 2008, Ferreira neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011; Kavalco et al., 2011; Kavalco et al., 2013; Tenório et al., 2013). A conservação do número diplóide para o gênero *Astyanax* é considerada como uma característica simplesiomórfica de Characidae (Pazza e Kavalco, 2007; Kavalco et al., 2011; Paiz, 2013).

Outra característica basal compartilhada entre as populações estudadas neste trabalho e em outras do grupo é a presença característica do primeiro par metacêntrico grande, essa característica também é comum na maioria das espécies de Characidae (Kavalco et al., 2009; Da Silva et al., 2012; Paiz, 2013). A morfologia cromossômica se encontra dentro do esperado com concentração de cromossomos bi-braçados (Peres et al., 2008, Ferreira neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011; Kavalco et al., 2011; Kavalco et al., 2013). As variações na fórmula cariotípica e no número fundamental encontrado no presente estudo e em outros estudos, estão relacionadas a eventos de diversificação cariotípica do tipo inversões pericêntricas, como principal rearranjo envolvido na evolução cariotípica deste grupo (Kavalco e Moreira-Filho, 2003; Domingues et al., 2007; Hoffmann e Rieseberg, 2008).

O número de sítios argentofílicos para o gênero *Astyanax* é bastante variável, mas o padrão geral é considerado múltiplo (Ferro et al., 2001; Kavalco e Moreira-Filho, 2003). O padrão de RONS simples encontrado para as populações estudadas corrobora outros estudos para o complexo “*A. bimaculatus*” nas bacias do Alto Paraná, Alto Paraguai, Baixo Paraná e Alto São Francisco (Troy, 2004; Ferreira-Neto et al., 2009; Giongo et al., 2012; Kavalco et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Peres et al., 2012; Paiz, 2013) e pode ser considerado uma característica derivada (Kavalco et al., 2011). Hsu et al. (1975) consideram que padrão de RONS simples é uma condição primitiva, porém Milhomem et al. (2013) ao estudar Gymnotidae, consideram que não é possível assumir caractere derivado ou primitivo quanto ao número de RONS, pois a composição desta condição pode ser muito divergente entre espécies no que diz respeito a origem e composição dos sítios. Almeida-Toledo et al., (1996) afirmam que a melhor maneira de comparar a posição de RONS ativas é associar Ag- RONS e FISH 18S.

O padrão da Banda C é bastante variável para o gênero *Astyanax* incluindo casos de polimorfismo intra-população (Mantovani et al., 2000), mas a distribuição pericentromérica é considerada basal em peixes (Medrado et al., 2012;), porém polimorfismos heterocromáticos são relativamente comuns em peixes e estão correlacionados com diferenciação populacional e especiação (Kantek et al., 2009; Bellafronte et al., 2011;). As populações estudadas apresentam, no geral, blocos heterocromáticos na região centromérica e pericentromérica, situação comum para diferentes espécies *insertae sedis* (Mendes et al., 2011) e para o complexo “*Astyanax bimaculatus*” (Troy, 2004; Ferreira-Neto et al., 2009; Giongo et al., 2012; Kavalco et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Peres et al., 2012; Paiz, 2013). As pequenas variações encontradas na distribuição dos blocos heterocromáticos e a variação no Número Fundamental, entre as populações do complexo “*Astyanax bimaculatus*” do presente estudo, pode estar relacionada à hipótese de que esta variação estrutural não está ligada a amplificação da sequência de heterocromatina relatada por Ferreira-Neto et al. (2009) em *Astyanax altiparane* e sim associada à mudanças do Número Fundamental por inversões pericêntricas.

Os resultados com o fluorocromo base-específico CMA<sub>3</sub> revelaram correspondência entre os sítios de RONS e CMA<sub>3</sub> para as populações estudadas, essa relação positiva entre estes sítios é comumente observada em várias espécies de peixes (Tenório et al., 2013). Esta correspondência também é encontrada para o gênero *Astyanax*, bem como para o complexo “*Astyanax bimaculatus*” (Kavalco e Moreira-Filho, 2003; Troy, 2004; Fernandes e Santos, 2004; Kavalco et al., 2009; Mendes et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Martinez et al., 2012). O fato da população do córrego São José ter apresentado um maior número de cromossomos marcados com CMA<sub>3</sub> pode estar relacionado ao fato desse fluorocromo também marcar sítios não ativos de RONS, associadas a regiões heterocromáticas (Amemiya e Gold, 1986; Almeida-Toledo et al., 1996).

Os resultados com FISH rDNA 5S para as populações estudadas no presente trabalho, evidenciaram um par de cromossomos com sítios de rDNA 5S na região intersticial. Porém para Characiformes, incluindo espécies do gênero *Astyanax* o padrão esperado é dois pares de cromossomos marcados rDNA 5S (Martins e Galetti Jr., 2001; Mantovani et al., 2005; Pazza et al., 2006; Kavalco et al., 2009). Kavalco et al., (2011) também encontraram resultados semelhantes ao do presente trabalho e sugere alta estabilidade desses sítios e essa característica seria uma apomorfia dentro grupo.

Os resultados para FISH rDNA 18S revelam, para todas as populações estudadas, um par de cromossomos marcados e corrobora outros estudos realizados em outras espécies do gênero *Astyanax*, bem como para o complexo “*A. bimaculatus*”. As marcações encontradas coincidem com as de CMA<sub>3</sub> e nitrato de prata (Pazza et al., 2006; Kavalco et al., 2011; Pacheco et al., 2011; Peres et al., 2012). O padrão múltiplo esperado para sítios de rDNA 18S, pode não ocorrer devido ao seu tamanho reduzido (Kavalco e Moreira-Filho, 2003). Pacheco et al. (2011) e Ferreira-Neto et al. (2012) encontraram diferenças no número de sítio de rDNA 18S em populações alopátricas de *A. altiparanae*, os autores sugerem que as pequenas variações cariotípicas estão ligados às restrições sobre o fluxo gênico fixando as diferenças entre as populações (Ferro et al., 2001).

Embora os resultados encontrados demonstrem pequenas variações cariotípicas entre as populações das três bacias estas diferenças podem estar relacionadas as distintas pressões que estas populações sofreram na suas histórias evolutivas relacionadas a eventos vicariantes e a outros gargalos como deriva genética e mutações (Wolf, et al., 2010; Nosil e Feder, 2012; Pereira et al., 2012; Balen et al., 2013). Por outro lado encontrou-se um grande número caracteres derivados compartilhados em relação ao gênero entre as populações estudadas, como número de sítios de RONS, CMA<sub>3</sub>, rDNA 18S e 5S (Pazza et al., 2008; Kavalco et al., 2013; Tenório et al., 2013). Essa situação pode estar ligada ao principal tipo de rearranjo cariotípico envolvido na diferenciação dessas populações, as inversões cromossômicas, que são fundamentais para o isolamento reprodutivo de populações e para a especiação (Kirkpatrick e Barton, 2006; Hoffmann e Rieseberg, 2008). A fixação desses caracteres derivados pode ter ocorrido rapidamente por especiação alopátrica (Lovejoy e Araújo, 2000; Near e Bernard, 2004).

Albert et al. (2011) consideram o padrão biogeográfico e geomorfológico dos rios sul-americanos como principal fator de diversificação dos peixes neotropicais, onde espécies acumulam diferenças em escala continental e em longo tempo geológico. Kavalco e Moreira-Filho (2003) sugeriram que a diferenciação para *Astyanax* estaria vinculado a processos de diversificação local. Nesse sentido, as diferenças específicas na macroestrutura cariotípica encontradas que fortalecem o grupo como polifilético estariam relacionados a outras taxa de diversificação, vinculadas a questões ecológicas, fisiológicas e comportamentais oferecidas pela história da paisagem, estando mais relacionada a processos de radiações recentes (Hubert et al., 2007). Além de reforçar a hipótese de formação de agregados populacionais do complexo “*Astyanax bimaculatus*”

(Garutti e Britski, 2000; Kavalco e Moreira-Filho, 2003; Kavalco et al., 2011; Tenório et al., 2013).

### **Referências Bibliográficas**

As bibliografias utilizadas encontram-se no final do trabalho

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo evidencia grande variedade cariotípica para *Astyanax asuncionensis* na a bacia do Alto Paraguai em relação a número cromossômico, padrão de Ag- RONS e bandamento C em populações simpátricas e alopátricas. Além da ocorrência de um citótipo com  $2n=48$ , condição incomum para espécies do complexo “*A. bimaculatus*”, em simpatria com mais dois citotipos com  $2n=50$ , e não houve a ocorrência de híbridos entres os três citótipos.

Este trabalho também inclui a primeira caracterização cromossômica de *Astyanax aff. argyrimarginatus* para o Médio curso do Rio Araguaia, e um novo estudo cromossômico para *A. altiparanae* no rio Meia Ponte, visto que a única descrição cariotípica para esta espécie na bacia data de 1975.

Os estudos apresenta grande estabilidade cariotípica para as populações de “*Astyanax bimaculatus*” nas três bacias estudadas, revelando que o grupo partilha caracteres na macroestrutura cariotípica que podem ser considerados apomórficos, como os resultados de FISH rDNA 18S e 5S.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, L. D. S.; Mantovani, M.; Moreira-Filho, O. 2006. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 29(3): 448–452.

Albert J. S.; Carvalho, P. T.; Petry, P.; Holder, M. A.; Maxime, E. L.; Espino, J.; Corahua, I.; Quispe, R.; Rengifo, B.; Ortega, H.; Reis, R. E. 2011. Aquatic Biodiversity in the Amazon: Habitat Specialization and Geographic Isolation Promote Species Richness. **Animals**, 1: 205-241.

Albert, J. S.; Reis, R. E. 2011. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. University of California Press: Berkeley, CA, USA. 1<sup>a</sup> ed.; 424pp.

Almeida-Toledo L. F.; Bernardino G.; Oliveira C.; Foresti F.; Toledo-Filho S. A. (1996) Gynogenetic fish produced by a backcross involving a male hybrid (female *Colossoma macropomum* x male *Piaractus mesopotamicus*) and a female *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Técnico CEPTA**, 9: 31-37.

Almeida-Toledo, L. F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C, Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M. F. Z. 2002. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic Genome Research**. 97(3-4): 229-233.

Amemiya, C. T.; Gold J. R. 1986. Cromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, (1): 226-231.

Artoni, F. R.; Vicari, M. R.; Bertollo, L. A. C. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, 6(1): 41-60.

Artoni, R. F.; Shibatta, O. A.; Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Almeida, M. C.; Vicari, M. R.; Bertollo, L. A. C. 2006. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): Evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 197 - 202.

Baird, S. F.; Girard, C. 1854. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican

Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U. S. A. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 7: 24-29.

Balen, D.; Horváth, P.; Finger, F.; Starijaš, B. 2013. Phase equilibrium, geothermobarometric and xenotime age dating constraints on the Alpine metamorphism recorded in chloritoid schists from the southern part of the Tisia Mega-Unit (Slavonian Mts., NE Croatia). **International Journal of Earth Sciences**, 102(4): 1091-1109.

Bellafronte, E.; Schemberger, M. O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F.; Margarido, V. P.; Vicari, M. R. 2011. Chromosomal markers in Parodontidae: An analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 21: 559–570.

Bertaco, V. A.; Garutti, V. 2007. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 5(1): 25-30.

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.

Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A. B. S. 1988. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias; com Chaves de Identificação para os Peixes da Bacia do São Francisco**. 3ªEd, CODEVASF, Câmara dos Deputados.

Buckup, P. A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). Pp. 123-144. In: In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. Edipucrs, 603 pp.

Buckup, P. A.; Menezes, N. A.; Ghazzi M. S. (eds.). 2007. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 195pp.

Calcagnotto, D.; Schaefer, S. A.; Desalle, R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 135-153.

Carvalho, M. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2002. Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Caryologia**, 55: 181-188.

Centofante, L. 2003. **Citogenética comparativa entre ictiofáunulas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da Mantiqueira**. São Carlos (SP), Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

Cioffi, M.B.; Martins C.; Centofante L.; Jacobina U.; Bertollo, L. A. C. 2009. Chromosomal Variability among Allopatric Populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of Three Classes of Repetitive DNAs. **Cytogenet Genome Research**, 125:132–141

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 CMA<sub>3</sub> 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.

Daniel-Silva, M. F. Z.; Almeida-Toledo, L. F. 2005. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, 109: 497-501.

Domingues, M. S. **Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu**. 2005. Dissertação de Mestrado em Genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR).

Domingues, M. S.; Vicari, R. M.; Abilhoa, V.; Wamser, P. J.; Cestari, M. M.; Bertollo, A. C. L.; Almeida, C. M.; Artoni, F. R. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, 5: 37-44.

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

Eigenmann, C. H. 1927. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College)**, New York, 43:311-428.

Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. 2004. Brief report cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141: 328-332.

Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. 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( 3): 464–468.

Fernandes, M. A. 2004. **Bandeamento cromossômico com enzimas de restrição e fluorocromos no gênero Melipona (Hymenoptera: Apidae)**. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG).

Ferreira Neto, M.; Vicari, M. R.; Camargo, E. F.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, M. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, 32(4): 792-796.

Ferreira-Neto, M.; Artoni, R.; Vicari, M.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.; Bakkali, M.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2012. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. **Comparative Cytogenetics**, 6: 29-40.

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.

Ferro, D. A. M.; Néo, D. M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, 110(1): 55-62.

Froese, R.; Pauly, D. Editors. 2013. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), versão (04/2013). (Acessado em:17/06/2013).

Garutti, V. 1988. Distribuição longitudinal da ictiofauna em um córrego da região noroeste do Estado de São Paulo, bacia do rio Paraná. **Revista brasileira de Biologia**, 48(4): 747-759.

Garutti, V. 1998. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia**, 85: 115-122.

Garutti, V. 1999. Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* (Characiformes, Characidae) procedente da bacia do rio Araguaia, Brasil. **Revista brasileira de Biologia**, 59(4): 585-591.

Garutti, V.; Britski, H. A. 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. **Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool.**, Porto Alegre, 13: 65-88.

Garutti, V.; Langeani, F. 2009. Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical ichthyology**, 7(3): 371-376.

Géry, J. **Characoids of the World**. 1977. TFH publication. 672 pp.

Giongo, P.; Sampaio, W. M. S. Fernandes, A.; Dergam, J. A.; Kavalco, K. F.; Pazza, R. 2012. Diversidade cariotípica de "*Astyanax asuncionensis*" (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, 3(2): 53-58 DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9

Hoffmann, A. A.; Rieseberg, L. H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? **Annual Review of Ecology and Systematics**, 39: 21-42.

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.

Hsu, T. C.; Spirito, S. E.; Pardue, M.L. 1975. Distribution of 18S+28S Ribosomal Genes in Mammalian Genomes. **Chromosoma** 53: 25-36.

Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Dávila, C.; Paugy, D.; Renno, J. F. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*:

Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, 16:2115-2136.

Javonillo, R.; Malabarba, L. R.; Weitzman, S. H.; Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54(2): 498-511.

Jin, S. M.; Toledo, V. 1975. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência & Cultura**, 27:1122-1124.

Justi, A. J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Pisces, Characidae), em três bacias hidrográficas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP).

Kantek, D. L. Z.; Cipriano R. R.; Noletto, R. B.; Fenocchio, A. S.; Artoni, R. F.; Cestari, M. M. 2008. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguazu river. **Genetics and Molecular Biology**, 31: 239-242.

Kantek, D. L. Z.; Vicari, M. R.; Peres, W. A. M.; Cestari, M. M.; Artoni, R. F.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. 2009. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, 75: 408–421.

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. 2009a. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, 32: 477-483.

Kavalco, K. F.; Pazza, R. 2004. A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 27(2): 196-198.

Kavalco, K. F.; Pazza, R. 2007. Aspectos biogeográficos de componentes da ictiofauna da América central. **ConScientiae**, 6(1): 147-153.

Kavalco, K. F.; Pazza, R., Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. 2007. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 30: 329–335.

Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Almeida-Toledo, L. F. 2009b. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, 136(1): 135-139.

Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Brandão, K. O.; Almeida-Toledo, L. F. 2013. Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). **Organisms Diversity & Evolution**, 13: 67–76.

Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Brandão, K. 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(2): 108-19.

Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Brandão, K. O.; GARCIA, C.; Almeida-Toledo, L. F. 2012. 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.; 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.; Moreira-Filho, O. 2003. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, 56(4): 453-461.

Kirkpatrick, M.; Barton, N. 2006. Chromosome Inversions, Local Adaptation and Speciation. **Genetics**, 173: 419–434.

Krinski, D.; Miyazawa, C. S. 2012. First description of the karyotype and Ag-NORs localization of *Brachyhalcinus retrospina* (Pisces: Characidae: Stethaprioninae) from Upper Paraguay Basin, Mato Grosso State, Brazil. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 65(1): 82–85.

Langeani, F.; Buckup, P. A.; Malabarba, L. R.; Py-Daniel, L. H. R.; Lucena, C. A. S.; Rosa, R. S.; Zuanon, J. A. S.; Lucena, Z. M. S.; De Britto, M. R.; Oyakawa, O. T.; Gomes-Filho, G. 2009. Pp. 211-230. Peixes de Água Doce. In: Rocha, R. M.; Boeger, W. A. P.; (orgs.) **Estado da arte e perspectivas para a zoologia no Brasil**. Curitiba, Ed. UFPR.

Levan, A.; Fregda, K.; Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201–220.

Lima, T. C. F.; Malabarba, R. L.; Buckup, P. A.; Silva, P. F. J.; Vari, P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, T. O.; Pavanelli, S. C.; Menezes, N. A.; Lucena, S. S. C.; Malabarba, L. S. C. M.; Lucena, S. M. Z.; Reis, E. R.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, A. V.; Moreira, C.; Lucinda, F. H. P. 2003 Genera Incertae Sedis in characidae. Pp. 106-109. In: Reis, R. E., Kullander, S. O.; Ferraris Jr., C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, RS: Edipucrs, 729p.

Lovejoy, N. R.; Albert, J. S.; Crampton, W. G. R. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical Fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, 21: 5-13.

Lovejoy, N.R.; Araújo, L.G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, 9: 259-268.

Lundberg, G. J.; Marshall, G. L.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, L. S. C. M.; Wesselingh, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South America rivers. Pp.13-48. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.

Lundberg, J. G.; Kottelat, M.; Smith, G. R.; Stiassny, M.; Gill, T. 2000. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discoveries in fresh waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 87: 26-62.

Maistro, E. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae, Tetragonopteridae). **Genetics and Molecular Biology**, 2: 365-369.

Malabarba, L. R.; Weitzman, S.H. 2003. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Ser. Zool.** 16(1): 67-151.

Malabarba, L.R.; Weitzman. S.H. 2003. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicação do Museu de Ciência e Tecnologia. PUCRS, Série Zoologia**, 16:67-151.

Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A.; Moreira-Filho, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 27: 536–542.

Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; 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.; Moreira-Filho, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, 123:211-216.

Mariguela, T. C.; Ortí, G.; Avelino, G.S.; Abe, K. T.; Oliveira. C. 2013. Composition and interrelationships of a large Neotropical freshwater fish group, the subfamily Cheirodontinae (Characiformes: Characidae): A case study based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 68(1): 23-34.

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 and 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. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, 44(5): 903-910.

Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Shibatta, O. A.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C.; Artoni, R. F. 2002. karyotypic studies in the Characidae fish, genus *Astyanax*. An endemic and highly isolated population of *Astyanax* sp. **Cytologia**, 67: 123-128.

Matoso, D.A.; Silva, M.; Artoni, R. F.; Torres, R. A. 2013. Molecular taxonomy and evolutionary hypothesis concerning *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) from Vila Velha State Park and Tibagi and Iguaçú Rivers. **Genetics and Molecular Research** 12 (1): 631-638.,.

Medrado, A. S.; Figueiredo, A. V. A.; Waldschmidt, A. M.; Affonso, P. R. A. M.; Carneiro, P. L. S. 2008. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, 31: 208-214.

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, 4, 797-801.

Melo, C. E.; Lima, J. D.; Melo, T. L; Pinto-Silva, V. 2005. **Peixes do Rio das Mortes: identificação e ecologia das espécies mais comuns**. Cáceres: Ed. UNEMAT. 146p.

Mendes, M. M.; Rosa, R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A. L. 2011. Karyotype diversity of four species of the incertae sedis group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA<sub>3</sub> and 18S rDNA. **Genetics and Molecular Research**, 10(4): 3596-3608.

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 a B chromosome in the Characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, 85; 1–9. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00702.x

Milhomem, S. S. R.; Scacchetti, P. C.; Pieczarka, J. C.; Ferguson-Smith, M. A.; Pansonato-Alves, J. C.; O'Brien, P. C. M.; Foresti, F.; Nagamachi, C. Y. 2013. Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). **PLoS**

ONE 8(2): e55608. doi:10.1371/ journal.pone.0055608

Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, 8:385-568.

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. **Genetics and Molecular Biology**, 21:55-61.

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. 1990. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. **Revista Brasileira de Genética**, 14: 331-347.

Morelli, S.; Bertollo, L. A. C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Toledo, S. F. A. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I: Karyotypic variability. **Cariologia**, 36: 235-244.

Near, T. J.; Bernard. M. F. 2004. Rapid allopatric speciation in logperch darters (Percidae:Percina). **Evolution**, 58:2798–2808. doi: 10.1554/04-172.

Nelson, J. S. 2006. **Fishes o the word**. 4th edition John Wiley and Sons, Inc. New York.624 p.

Nirchio, M.; Oliveira, C. 2006. **Citogenética de peces**. 1ª ed. Caracas: Universidad de Oriente.

Nosil, P.; Feder, J. L. 2012. Genomic divergence: causes and consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** 367: 332-342.

Oliveira C. et al.; 2009b. Base de dados de citogenética de peixes neotropicais. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Morfologia/Laboratorios/LaboratoriodeBiologiaeGeneticadePeixes/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf> Acessado em junho de 2013.

Oliveira C.; Almeda-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Britski, H. A.; Toledo-Filho, A. S. 1988. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, 11: 577-624.

Oliveira, C. 2005. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais. **Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia**, 80: 7-9.

Oliveira, C.; Avelino, G. S.; Abe, K. T.; Mariguela, T. C.; Benine, R. C.; Ortí, G.; Vari, R. P.; Corrêa, E.; Castro, R. M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11(275): doi: 10.1186/1471-2148-11-275.

Oliveira, C.; Foresti, F.; Hilsdorf, A. W. S. 2009a. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35: 81-100. DOI 10.1007/s10695-008-9250-1

Ortí, G.; Meyer, A. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, 46(1): 75-100.

Pacheco, R. B.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, L. 2001. Cytotypes and multiple NORs in the *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetraodonidae). **Chromosome Science**, 5: 109-114.

Pacheco, R. B.; Giuliano-Caetano, L.; Júlio Junior, H.F. Dias, A. L. 2010. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8(3): 667-671

Pacheco, R. B.; Rosa, R.; Giuliano-Caetano, L.; Júlio Jr., H. F.; Dias, A. L. Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. **Comparative Cytogenetic**, 5:237–246..

Paiz, L. M. 2013. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do rio Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel (PR).

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). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs 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.; Penteadó, 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, L. R.; Cabette, H. S. R.; Juen, L. 2012. Trichoptera as bioindicators of habitat integrity in the Pindaíba river basin, Mato Grosso (Central Brazil). **Ann. Limnol. - Int. J. Lim.** 48: 295–302. DOI: 10.1051/limn/2012018

Peres, A. M. W. 2005. **Análise da diversidade cariotípica de Characidae da bacia do São Francisco**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP),

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. DOI 10.1007/s11160-011-9246-2.

Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A.C.; Buckup, P. A.; Blanco, D. R.; Kantek, D. L. Z.; Moreira-Filho, O. 2011. 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. Published online: 18 November 2011

Porto, J. I. R.; Feldberg, E.; Nakayama, C. M.; Falcão, J. N. A. 1992. checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Rev. Hydrobiol. trop.**, 25 (4): 287-299.

Reis, R. E. 2013. Conserving the freshwater fishes of South America. **International Zoo Yearbook**, 47: 1-6.

Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. 2003. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs: Porto Alegre, Brasil, p. 735.

Rosa, R., Rubert, M.; Malabarba, L. R.; Martins-Santos, I. C.; Giuliano-Caetano, L. 2009. Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the Laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, 7(4): 601-605.

Santos, A. C.; Morelli, S. 2006. Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro. **Biosci. J.**, 22(1): 145-150.

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): 1-11.

Souza, I. L.; Santos-Silva, L. K.; Venere, P. C.; Moreira-Filho, O. 2008. Molecular cytogenetics of Salminus fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, 39: 1036-1041.

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(3): 553-564.

Torres, R. A.; Matoso, D. A.; Artoni, F. R. 2004. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, 10 (2): 27-37.

Troy, P. W. 2004. Diversidade cariotípica de lambaris da subfamília Tetragonopterinae (Characidae, Characiformes). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá (MT).

Vari, P. R.; Malabarba, R. L. 1998. Neotropical ichthyology: an overview. Pp.1-11. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena C.A.S.

(eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.

Vicari, M. R.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. 2008. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janneiroensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, 122: 67-72.

Wolf, M.; Doorn, G. S. V.; Weissing, F. J. 2010. On the coevolution of social responsiveness and behavioural consistency . **Proc. R. Soc. B**, published online 25 August 2010. doi:10.1098/rspb.2010.1051. Disponivel em: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2010/08/18/rspb.2010.1051.full.html#related>