

LUCIONI FAVA

**Variação cariotípica de *Astyanax bimaculatus*
(Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) nas bacias
costeiras do Brasil.**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

T

F272v
2008 Fava, Lucioni, 1979-
Variação cariotípica de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)
(Pisces : Characidae) nas bacias costeiras do Brasil / Lucioni Fava.
- Viçosa, MG, 2008.
viii, 78f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Texto em português e inglês.

Orientador: Jorge A. Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética. 2. Lambari (Peixe). 3. *Astyanax bimaculatus*.
4. Heterocromatina. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 597.48

LUCIONI FAVA

**Variação cariotípica de *Astyanax bimaculatus*
(Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) nas bacias
costeiras do Brasil.**

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

APROVADO: 28/03/2008.

Prof. Dr. Renato Neves Feio
(Co-orientador)

Prof. Dra. Gisele M. L. Del Giudice
(Co-orientadora)

Prof. Dra. Karla S. C. Yotoko

Prof. Dr. Rubens Pazza

Prof. Dr. Jorge A. Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico

aos meus pais

Manuel Lanir Fava

Maria das Graças Fava

às minhas irmãs

Luciene Fava Raulino

Lucimar Fava Alvim

à minha noiva

Fernanda Cezaria de Oliveira

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À empresa CENIBRA pelo apoio no financiamento das viagens para coletas do material de estudos “os peixes” *A. bimaculatus* e ao amigo Edson pelas grandes aventuras e pelo apoio.

Ao professor Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos pela orientação, amizade, conselhos, disponibilidade e pela presença constante nos momentos de dificuldades.

Aos membros da banca: Professores Dr. Renato Neves Feio, Dra. Gisele Mendes Lessa Del Giudice, Dra. Karla Suemy Clemente Yotoko e Dr. Rubens Pazza, pela disponibilidade e conselhos.

À Professora Dr. Silvia Pompolo responsável pelo Laboratório de Citogenética de Insetos, no prédio da Biologia Animal, sala 319i, por ceder o local para a captura das imagens.

Aos meus pais, Lanir e Maria das Graças (Lília). Sem os dois nada disso seria possível, pelo exemplo de vida, força e perseverança, aprendi a nunca desistir.

Às minhas irmãs Luciene e Lucimar, pela amizade, amor, conselhos e apoio em todos os momentos.

À minha noiva Fernanda, pela companhia, paciência, pelo apoio na realização deste trabalho e, sobretudo pelo amor.

Aos amigos de laboratórios Claudineia, Lílian, Gisele, Tuane, Denise, Geisa, Marcela, Ana Paula, Mariana, Tiago, Uedson, Hilton, Edimar, Diego,

Ivan, Henrique. Pelas boas risadas, pelo companheirismo e amizade de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Aos grandes amigos Tiago e Uedson, pela amizade, conselhos, apoio, força nos momentos de dificuldades.

Aos meus primos Maximiliano, Rafael Beluzio, Taciana, pela força, incentivo, amizade, que me ajudou a continuar caminhando.

Aos meus amigos de repúblicas João, Kassius, Bruno, Juninho, Victor, pela amizade e força.

À Deus, pela vida, sem ela não teria como realizar esse trabalho.

Aos meus amigos carangolenses e viçosenses que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIONI FAVA, filho de Manuel Lanir Fava e Maria das Graças Fava, nasceu em 07 de junho de 1979, em Carangola, Estado de Minas Gerais.

Cursou o primário na Escola Estadual Interventor Benedito Valadares, em Carangola – MG.

Em 1997, concluiu o ensino médio na Escola Estadual João Belo de Oliveira, em Carangola – MG.

Em março de 1998, iniciou o curso de graduação em Ciências pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Carangola (FAFILE), em Carangola, tendo colado grau em dezembro de 2001.

Em dezembro de 2003 concluiu o curso de pós-graduação “Lato-Sensu” em Educação Ambiental na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Carangola (FAFILE).

Em fevereiro de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de tese em março de 2008.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais sobre os Peixes da Ordem Characiformes como material de estudo. | 01 |
| 1 – INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 - A evolução cariotípica dos peixes neotropicais | 01 |
| 1.2 - A citogenética dos peixes neotropicais | 15 |
| 1.3 - Distribuição biogeográfica da fauna de peixes nas bacias do leste brasileiro | 19 |
| 2 – OBJETIVOS | 22 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODO | 23 |
| 3.1 – Material | 23 |
| 3.1.1 - Preparação dos cromossomos mitóticos (tratamento “in vivo”) | 24 |
| 3.1.2 - Classificação dos cromossomos | 26 |
| 3.1.3 - Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandamento C) | 27 |
| 3.1.4 - Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) | 28 |
| 3.1.5 - Detecção de Coloração Seqüencial com Fluorocromos (DAPI/CMA ₃) | 29 |
| 3.2 – Análise do Material | 30 |
| 4 – BIBLIOGRAFIA | 33 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 2 - Heterochromatin variability of <i>Astyanax bimaculatus</i> (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) populations in southeastern Brazil. | 42 |
| 1 - INTRODUCTION | 42 |
| 2 - MATERIALS AND METHODS | 45 |
| 3 – RESULTS | 47 |
| 4 – DISCUSSION | 60 |
| 5 – REFERENCES | 68 |
| 3 – CONCLUSÕES GERAIS | 74 |
| 4 – ANEXOS | 75 |

RESUMO

FAVA, Lucioni, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Varição cariotípica de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) nas bacias costeiras do Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-orientadores: Renato Neves Feio, Gisele Mendes Lessa Del Giudice.

O gênero *Astyanax* inclui um conjunto de aproximadamente 90 espécies hoje consideradas, junto com a maioria dos antigos Tetragonopterinae, como *incertae sedis* dentro da família Characidae. O gênero compreende peixes de pequeno tamanho e que foram definidos com base em critérios artificiais. Sete populações costeiras de uma dessas espécies, *Astyanax bimaculatus*, foram analisadas citogeneticamente com: técnicas de coloração convencional; Banda C para evidenciar blocos heterocromáticos; nitrato de prata para evidenciar regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e cromomicina A₃ para detecção de regiões ricas em guanina e citosina. As sete populações são do sudeste brasileiro: uma no rio Pardo, cinco populações da bacia do rio Doce, uma população da cabeceira do rio Piranga na mesma bacia e uma população do rio Carangola, na bacia do rio Paraíba do Sul. Todas as populações estudadas apresentaram 2n=50 e fórmula cromossômica com 6 cromossomos metacêntricos, 20 submetacêntricos, 18 subtelocêntricos e 6 telocêntricos, um par de NORs localizadas em um par de cromossomos subtelocêntricos e altos níveis de variação de padrões de heterocromatina. Todos esses estados de caráter são semelhantes aos de *A. lacustris* da bacia do São Francisco. Esta estabilidade contrasta com a grande variabilidade observada nas populações deste complexo de espécies do Paraná Superior, representadas por *Astyanax altiparanae*. A estabilidade cariotípica das populações costeiras reflete isolamento geográfico, enquanto que pelo menos parte da grande variabilidade cariotípica das populações do Paraná Superior pode ter ocorrido por um contato secundário entre esta bacia com populações das bacias costeiras. A variação de blocos heterocromáticos entre as populações isoladas desde o Quaternário foi interpretada como variação intra-específica.

ABSTRACT

FAVA, Lucioni, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2008. **Karyotypic variation of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) in the coastal basins of Brazil.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Advisers: Renato Neves Feio, Gisele Mendes Lessa Del Giudice.

The genus *Astyanax* comprises 90 species considered together with most of the old Tetragonopterinae as incertae sedis within the family Characidae. Most of the *Astyanax* are small, were classified in an artificial taxonomic system and therefore their taxonomic boundaries are poorly defined. Seven coastal populations of one of these species, *Astyanax bimaculatus* were studied cytogenetically with conventional (Giemsa) stain, heterochromatin was evidenced with C-banding, nucleolar organizing regions and associated guanine-cytosine-rich regions were evidenced with silver nitrate and chromomycine A₃. All populations are from southeastern Brazil: one in Pardo River, five in the Doce basin including four Quaternary lakes and a population in the headwaters of the Piranga River and one population from the Carangola River in the Paraíba do Sul basin. All populations shared the same 2n=50 diploid number and chromosome morphology comprising 6 metacentric, 20 submetacentric, 18 subtelocentric and 6 telocentric chromosomes, and one pair of NORs located in a pair of subtelocentrics. However, populations were characterized by high levels of variation of heterochromatic regions. All these character states were shared with *Astyanax lacustris* from the São Francisco River. This karyotypic stability stands in sharp contrast with the one reported in populations of this species complex in the Upper Paraná, today described as *Astyanax altiparanae*. It is suggested that the observed patterns are due to the relative geographic isolation of the coastal populations and that at least part of the high karyotypic variability that characterizes *A. altiparanae* may be explained by secondary contact between Upper Paraná and coastal populations. Finally, variation of heterochromatic blocks suggests that Quaternary isolation has not favored chromosomal speciation.

CAPÍTULO 1

Diversidade dos peixes da Ordem Characiformes.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A evolução dos Characiformes.

Os peixes são os vertebrados mais antigos e numerosos do planeta. Mais de 20.000 espécies atualmente são conhecidas, a maior parte vive em águas tropicais. Cerca de 8.000 espécies (40%) habitam plataforma continental de mares quentes em águas de menos de 200m de profundidade, em comparação com apenas 1.130 espécies (5%) em habitats parecidos com os mares temperados (Lowe-McConnell, 1999). A água doce comporta cerca de 8.500 (mais de 40%), a maior parte está nos grandes sistemas de rios e lagos tropicais (Cohen, 1970). O sistema amazônico compreende mais de 1.300 espécies, o Zaire (Congo), na África, possui aproximadamente 700, em comparação com 250 espécies no sistema do Mississipi, na América do Norte, e 192 em toda a Europa. Cada um dos grandes lagos: Vitória, Tanganica e Malauí, no leste da África, têm mais de 200 espécies, a maioria das quais são endêmicas, isto é, de ocorrência restrita a apenas um lago. Das 455 famílias de peixes, as sete maiores (que incluem cerca de 30% do total) – Cyprinidae, Gobiidae, Cichlidae, Labridae, Loricariidae e Serranidae – possuem representantes em águas tropicais doces e salgadas (Nelson, 1984).

Böhlke *et al.* (1978) estipulam que somente na América do Sul há mais de 2.500 espécies distribuídas em 60 famílias. A ordem Characiformes compreende o maior número de peixes conhecidos, como as piranhas, os tetras e os lambaris. São aproximadamente 1343 espécies distribuídas entre 10 famílias e em aproximadamente 237 gêneros. Destas espécies, por volta de 208 são africanas e o restante é distribuído do Sudoeste da América do Norte, América Central e América do Sul (Nelson, 1994). Essa diversidade se deve à subdivisão do continente em muitas bacias hidrográficas de tamanhos variados. Os Characiformes têm como características gerais corpos geralmente pequenos e prateados, comportamento normalmente diurno, a freqüente presença de nadadeira adiposa, a linha lateral completa ou incompleta, a presença de um órgão sensorial chamado Aparelho de Weber e a intolerância à água salgada (Weitzman & Malabarba, 1998).

Nesta ordem a família Characidae é a maior e mais complexa, apresentando por volta de 30 subfamílias (Britski *et al.*, 1988), com novas revisões, a família passou a ter 12 subfamílias e o restante é considerado como *incertae sedis* (Lima *et al.*, 2003). Os peixes que pertencem a esse grupo compartilham algumas características gerais, como corpo em forma de losango e a grande base da nadadeira anal. A família Characidae é representada por cerca de 776 espécies distribuídas em 250 gêneros com características altamente heterogêneas entre si. Muitos desses gêneros estiveram até recentemente incluídos na subfamília Tetragonopterinae, uma subfamília hoje considerada como não monofilética (Weitzman & Malabarba, 1998; Reis *et al.*, 2003). Conseqüentemente, nos dias atuais os Tetragonopterinae

compreendem apenas as duas espécies do gênero *Tetragonopterus* (*T. argenteus* e *T. chalceus*) (Lima *et al.*, 2003).

Lucena (1993) relata que as relações de parentesco entre Characidae e outros Characiformes estão sendo prejudicadas por causa da falta de conhecimento das relações filogenéticas dentro da família. A situação é complicada devido ao número de espécies e ao modo de pertencerem à família, dificultando assim, o reconhecimento dos grupos naturais dentro desta família.

Dos antigos Tetragonopterinae, 620 espécies distribuídas em 88 gêneros são na atualidade considerados *incertae sedis*, incluindo grupos abundantes em espécies como os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (Reis *et al.*, 2003).

O gênero *Astyanax* corresponde à maior unidade taxonômica dos antigos Tetragonopterinae, contém 85 espécies e subespécies nominais descritas e distribuídas amplamente na região neotropical do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Lima *et al.*, 2003). *Astyanax* necessita de uma ampla revisão para melhor definição taxonômica de suas formas e é provável que muitas espécies devam ainda ser descritas. De acordo com Melo (2000), as espécies de *Astyanax* são, em geral, similares morfologicamente e sua separação tem sido historicamente difícil.

A última grande revisão no gênero *Astyanax* foi feita por Eigenmann (1918, 1921, 1927) e, apesar desse esforço, inúmeros problemas da sistemática do referido gênero não foram resolvidos provavelmente pela falta de uma diagnose baseada em caracteres apomórficos (Melo, 2000). Conseqüentemente, a definição e os limites desse gênero ainda não são claros.

No que se refere às águas doces do Brasil Eigenmann (1927) considerou 74 espécies e subespécies e Géry (1977), mais de 62 espécies e subespécies.

Eigenmann (1921) caracterizou os peixes do gênero *Astyanax* como sendo pequenos, comprimidos, mais ou menos alongados, raramente atingindo tamanho superior a 150 mm, sendo geralmente bem menores. Os *Astyanax* apresentam duas series de dentes no pré-maxilar, a série interna com cinco, raramente quatro dentes, linha lateral completa, ausência de escamas na nadadeira caudal, ossos infra-orbitais que não cobrem completamente a face, presença de nadadeira adiposa e quatro dentes ântero-mediais grandes e largos do dentário seguidos de dentes diminutos.

Dentro do gênero *Astyanax*, o lambari de rabo amarelo, *Astyanax bimaculatus* (Fig. 1), caracteriza-se por apresentar uma mancha ovalada e escura na região umeral e outra na base da nadadeira caudal. Está espécie possui a descrição mais antiga e é considerada a mais comum do gênero. A localidade tipo, América Meridional, é incerta. Como também sua distribuição geográfica, que é muito ampla: partindo do extremo Sul da América do Sul, próximo a Buenos Aires (Argentina) e chegando as bacias do Oniroco (Venezuela) e Magdalena (Colômbia) e conseguindo adaptar desde do nível do mar até altitudes aproximadamente de mil metros (Garutti, 1995). Entre tanto Géry (1977:430) informa que a sua distribuição é um pouco maior, atingindo o Panamá, América Central. Porém, Fowler (1915: 530) relata a ocorrência desta espécie um pouco mais distante, na ilha de Trinidad Tobago, delta do rio Oniroco. Inicialmente, Eigenmann (1921: 254-259) considerou que a espécie *A. bimaculatus* compreendia várias subespécies. Porém, Garutti (1995) revisou a espécie nominal e reconheceu 30 espécies válidas. Estudos sistemáticos

sugerem que mais estudos são necessários para a determinação objetiva dos níveis reais de diversidade dentro do complexo *A. bimaculatus*.



Fig. 1 – Exemplar de *Astyanax bimaculatus*

Neste panorama, os dados citogenéticos são potencialmente informativos sobre os padrões evolutivos dos diferentes táxons de peixes de água doce neotropicais. Embora a variação cromossômica seja comum entre as espécies (White, 1977; 1978), os mecanismos de fixação de rearranjos cromossômicos são ainda motivo de muita discussão.

Os rearranjos estruturais são mais complexos e são consequência de rupturas da estrutura cromossômica durante a interfase, quando os cromossomos estão mais distendidos, metabolicamente ativos e consequentemente mais vulneráveis a variações do ambiente. As alterações estruturais dos cromossomos resultam de quebra cromossômica seguida de reconstituição em uma combinação anormal. Os rearranjos estruturais podem ser classificados em equilibrados e não equilibrados. Os rearranjos equilibrados

são identificados por não possuírem variação na quantidade de DNA do cromossomo e na informação genética ali presente. Como exemplos de rearranjos estruturais equilibrados, podem ser indicadas as inversões paracêntricas (em que ambas as quebras se localizam do mesmo lado do centrômero) (Fig.2a) e pericêntricas (em que as duas quebras estão em lados opostos do centrômero) (Fig. 2b). Ambas as inversões podem causar grandes problemas durante a gametogênese, porque a probabilidade do indivíduo ter, em determinado par de cromossomos, apenas um único cromossomo que sofreu a inversão é muito maior. Quando ocorre crossing-over nos dois tipos de inversões, ocorre a formação de um laço (loop) durante a meiose, determinando gametas com cromossomos normais, cromossomos com inversões e cromossomos com deleções e duplicações (Fig. 2c).

Os rearranjos cromossômicos não equilibrados formam cromossomos com informações genéticas modificadas através da ausência ou da duplicação de determinadas frações do cromossomo. Os rearranjos cromossômicos não equilibrados mais importantes são as deleções, as duplicações e as translocações (White, 1977; Guerra, 1988).

As deleções são rearranjos onde há a perda de qualquer parte do cromossomo, onde não esteja o centrômero (se ocorrer a perda do centrômero pode levar a uma monossomia). Existem dois tipos de deleção terminal e intersticial. A deleção terminal é mais simples, visto que ocorre somente uma quebra do cromossomo, sendo muito mais rara.

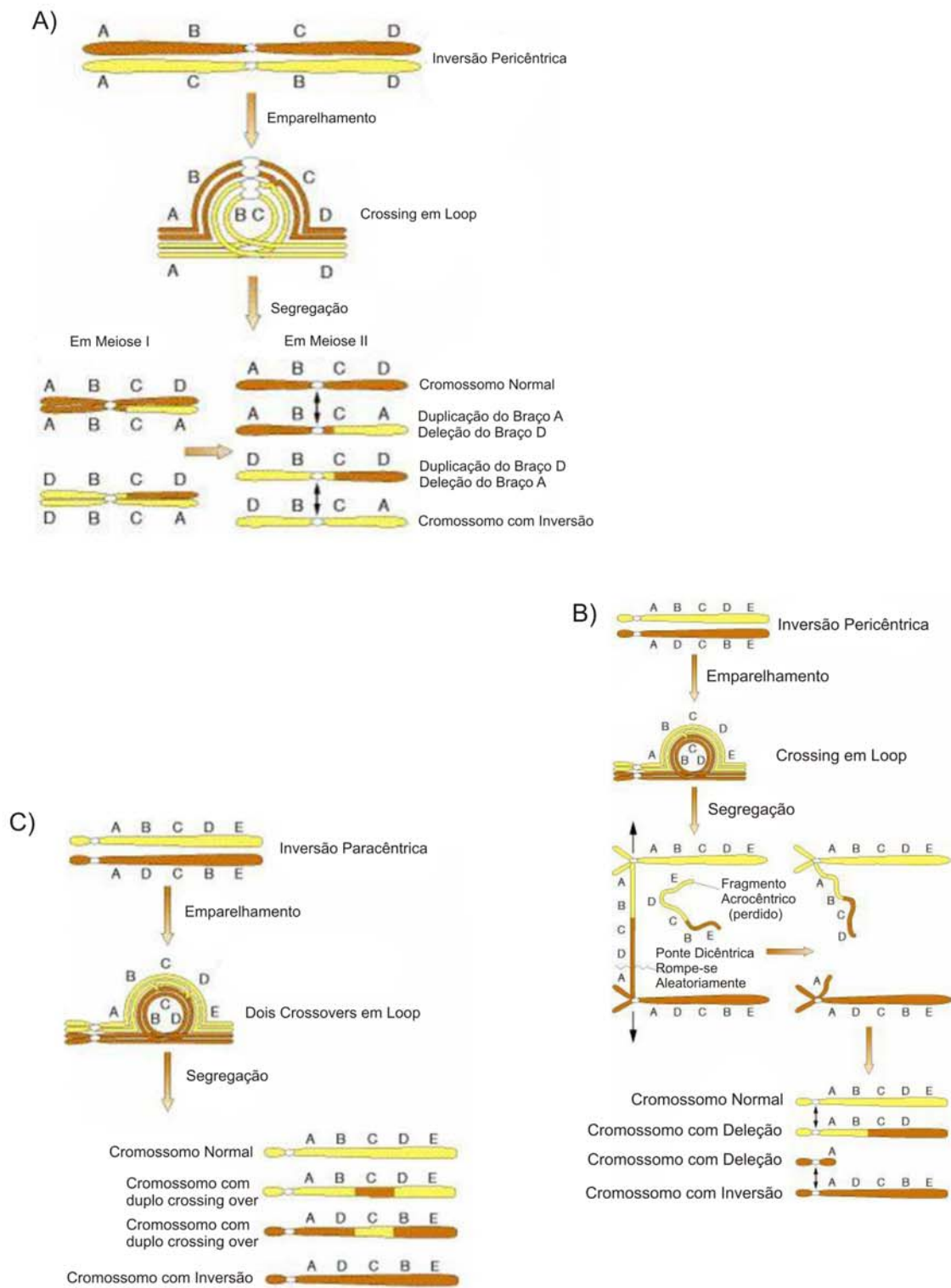


Fig. 2 - Esquemas dos produtos meióticos de cromossomos com inversão paracêntricas ou pericêntricas. a) Meiose de um par cromossômico onde um cromossomo possui uma inversão pericêntrica. b) Meiose de um par cromossômico onde um dos cromossomos possui uma inversão paracêntrica. c) a meiose após o processo de crossing-over em loop duplo. Figura: Thompson & Thompson. Genetics in Medicine, 1991

Aparentemente a perda do telômero pode comprometer a viabilidade cromossômica, pois a extremidade sem o telômero possui uma tendência a aderir em qualquer outro ponto que ocorreu uma quebra cromossômica. A deleção intersticial (ou deficiência) são rearranjos que ocorrem por causa de duas quebras, nas quais há perda do segmento cromossômico localizado entre as quebras. Em outras situações, as deleções acontecem através de crossing-over desigual entre cromossomos homólogos desalinhados ou cromátides-irmãs (White, 1977; Guerra, 1988) (Fig. 3).

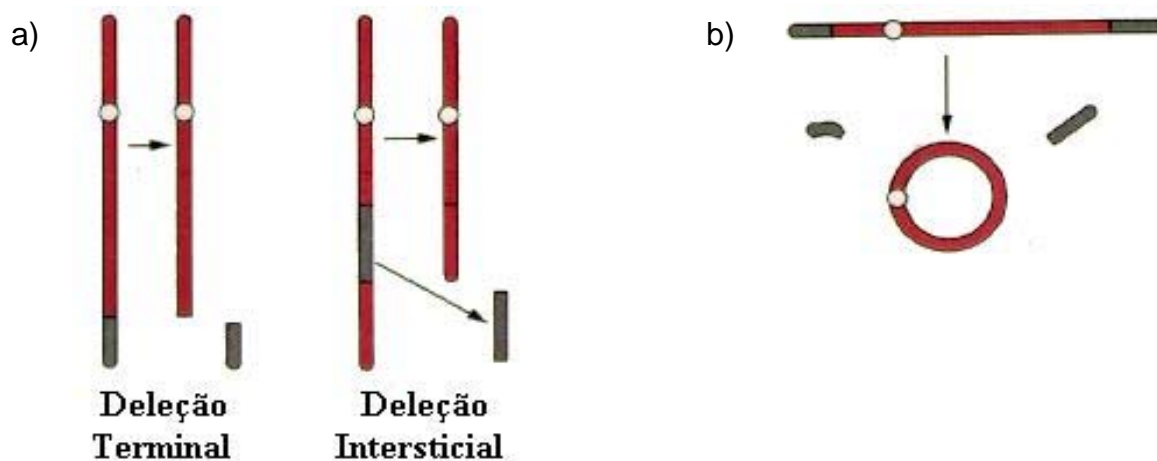


Fig. 3 – Esquema de deleções cromossômicas. a) Deleção intersticial e telomérica ou terminal. b) Fusão das regiões teloméricas e consequente circularização de um cromossomo que sofreu deleção terminal. Figura: Thompson & Thompson. Genetics in Medicine, 1991.

Por outro lado, a duplicação é a repetição anormal de uma parte qualquer de um segmento cromossômico. Esta parte do segmento duplicado pode estar localizada no mesmo cromossomo em tandem, em qualquer outro ponto do cromossomo, ou em outros cromossomos. As duplicações podem originar-se por crossing-over desigual ou por segregação anormal da meiose num cromossomo portador de uma translocação ou inversão (White, 1977; Guerra, 1988).

As translocações ocorrem em rearranjos cromossômicos não-equilibrados, porque há troca de material genético entre cromossomos não-homólogos e a exigência de que ocorra pelo menos uma quebra em cada cromossomo envolvendo a translocação. Existem dois tipos principais de translocação, as translocações recíprocas e as translocações robertsonianas (White, 1977; Guerra, 1988).

White (1977) relata que translocações recíprocas são o resultado de duas ou mais quebras em cromossomos diferentes e do reagrupamento das extremidades quebradas de maneira diferente da original (Fig. 4). Assim, podem ocorrer dois tipos de translocações recíprocas e freqüentemente devem ser de igual freqüência. O primeiro tipo é a translocação simétrica que origina dois novos cromossomos monocêntricos; o segundo é a translocação assimétrica de onde surge um cromossomo dicêntrico e um acêntrico que não é transmissível. Geralmente, só a translocação recíproca que poderá ser recuperada em experimentos e observada em populações naturais. Algumas translocações podem envolver três ou mais pontos de quebras nos cromossomos, essas translocações são denominadas de complexas ou mútuas, se estas quebras forem próximas dos centrômeros, originaram as fusões e dissociações.

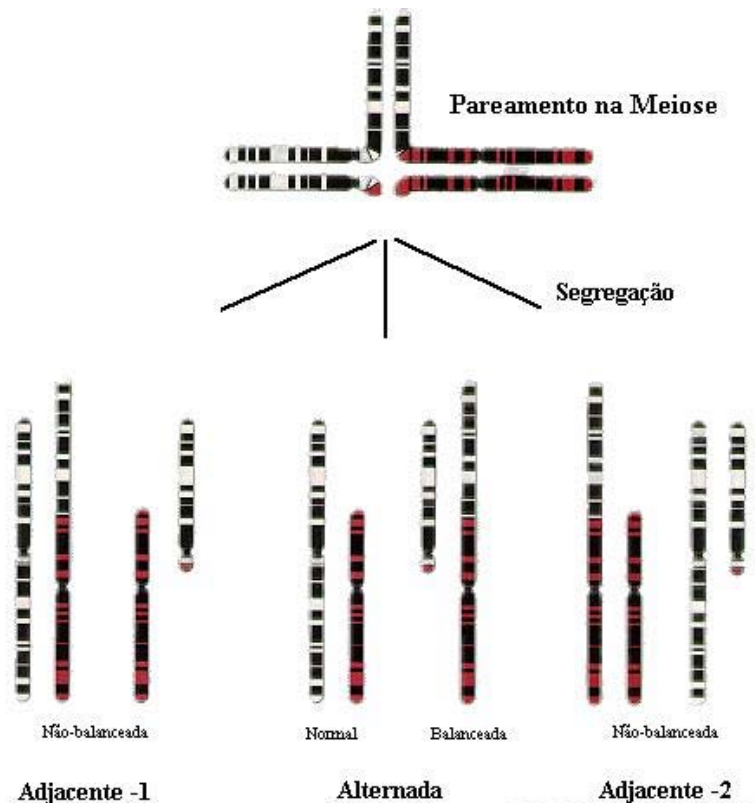


Fig. 4 – Translocação recíproca. Produtos meióticos de um indivíduo que sofreu translocação em um determinado par de cromossomos. Figura: Thompson & Thompson. Genetics in Medicine, 1991.

As translocações robertsonianas ocorrem quando dois cromossomos acrocêntricos perdem seus braços curtos e se juntam próximo à região centromérica, originando um único cromossomo derivado (Fig. 5). Essas translocações podem ser monocêntricas ou pseudodicêntricas (forma um só centrômero), dependendo do ponto de quebra dos cromossomos acrocêntricos. Ainda que resulte em um indivíduo com um cromossomo a menos, não há diferenças fenotípicas, visto que os braços curtos de uma maneira geral possuem grande quantidade de heterocromatina ou múltiplas cópias de rDNA. Todavia, esses indivíduos possuem uma maior chance de produzir gametas não equilibrados (as segregações adjacentes 1 e 2, Fig. 4) e, como conseqüência, a formação da prole com mudanças genotípicas e fenotípicas (White, 1977; Guerra, 1988).

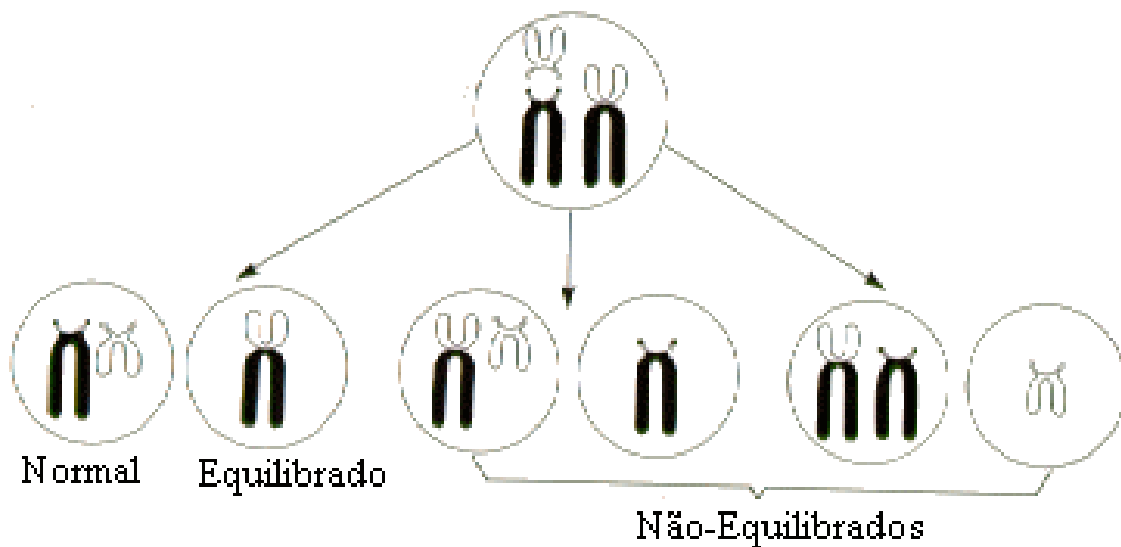


Fig. 5 – Translocações robertsonianas. Indica as translocações robertsonianas normais, equilibradas e as não equilibradas. Figura: Thompson & Thompson. Genetics in Medicine, 1991

A probabilidade de fixação de rearranjos cromossômicos é baixa quando há uma grande diminuição da fertilidade dos indivíduos heterozigotos. Quatro fatores podem, separadamente ou em combinação, influenciar para que ocorra o estabelecimento de uma nova variante cromossômica: deriva genética, direcionamento meiótico, vantagem seletiva do novo homocariótipo e intercruzamentos (White, 1977). Através de uma análise algébrica, Hedrick (1981) propõe que quatro situações representam importantes mecanismos do ponto de vista teórico: direcionamento meiótico somente; direcionamento meiótico em combinação com deriva genética; intercruzamentos em combinação com vantagem seletiva do novo homocariótipo e intercruzamento em combinação com deriva genética. Os efeitos dos rearranjos sobre o valor adaptativo ou *fitness* do heterozigoto híbrido podem mudar de acordo com o grupo de organismos. Rieseberg (2001) em seus estudos sobre rearranjos e

especiação cromossômica indica que os efeitos dos rearranjos cromossômicos reduzem o fluxo gênico, mas anula o efeito da recombinação e aumenta o efeito dos genes de isolamento, e ao mesmo tempo reduz o *fitness*. Estas informações têm implicações significantes para modelos de especiação e para os resultados do contato entre uma nova espécie e o seu progenitor. Os efeitos negativos são, porém, aparentemente mais evidentes em plantas do que em animais (Rieseberg, 2001).

Considerando a variação cariotípica dos peixes em geral, Denton (1973) informa que o número cariotípico de algumas espécies tropicais varia entre $2n=22$, já em algumas espécies de lampreias o número cariotípico varia entre $2n=174$, existindo, segundo Post (1973) dois picos de frequência entre $n=22-28$ e entre $n=46-52$. Denton (1973) realizou estudos cariotípicos que possibilitaram estabelecer que os peixes mais primitivos tivessem um número maior de cromossomos, nos quais muitos acrocêntricos. Ohno (1970) acredita que o cariótipo dos peixes primitivos apresentava $2n=48$ acrocêntricos (*apud* Mank & Avise, 2006).

Kirpichnikov (1973) considera que com a evolução, o número de cromossomos foi reduzido por causa dos rearranjos cromossômicos, os quais podem ser numéricos ou estruturais. Há basicamente dois tipos de rearranjos numéricos, as aneuploidias e as euploidias. As aneuploidias são caracterizadas pelo aumento ou redução de apenas um único cromossomo ou par cromossômico no complemento cariotípico normal da espécie, como resultado de processos de não disjunção durante a gametogênese. Nas euploidias ocorre o aumento de todo o complemento cariotípico, gerando indivíduos triploides, tetraploides ou outros múltiplos do conjunto cromossômico diplóide normal da

espécie. As espécies euploidias geralmente são resultado de problemas na gametogênese ou nos estágios iniciais da embriogênese.

Guerra (1988) indica que as variações cariotípicas estruturais são mais toleradas do que as variações numéricas. Por outro lado, Avise & Gold (1977) consideram que os rearranjos cromossômicos poderiam ser importantes para a especiação por si só, podendo levar a um isolamento reprodutivo. As variações cariotípicas também modificam a disposição do material genético, alterando os mecanismos de regulação gênica, podendo ser de importância fundamental nos processos evolutivos (Wilson *et al.*, 1974; Rieseberg, 2001). Ohno (1974) propõe um questionamento sobre a importância do cariótipo na evolução, afirmando que espécies muito próximas podem apresentar cariótipos distintos e sugere que as mudanças cariotípicas seriam mais alterações neutras acompanhando a especiação por serem inofensivas. Assim, pode-se apontar as características de um cariótipo tido como primitivo ou plesiomórfico, o que ajuda a compreender a direção e o sentido da evolução de um determinado grupo, além de permitir a análise sob o ponto de vista filogenético com bases mais sólidas.

Hinegardner & Rosen (1972) sugerem que a evolução primeiramente envolveu o aumento da quantidade de DNA, seguida por uma diminuição ao longo do processo de especiação. A duplicação do genoma aumentaria a possibilidade de futuras adaptações, à medida que estas fossem surgindo, o DNA não utilizado na nova adaptação poderia até ser perdido.

Os autores supracitados sugerem uma combinação de três possíveis eventos que poderiam ajudar a explicar a variação quantitativa do DNA durante a evolução, dos teleósteos a quantidade de DNA poderia: (1) – permanecer

constante e ser modificada por mutação ou combinação, (2) – aumentar por duplicação, ou até (3) – decrescer, porque perderia partes do genoma que não seriam mais utilizadas numa nova adaptação. A combinação desses eventos e a seleção natural, provavelmente, seriam as bases para especiação. Do mesmo modo, Kirpichnikov (1981) realizou uma comparação entre os peixes e ciclóstomos concluindo que, apesar de existir diferentes números cromossômicos em vários táxons, há uma tendência definitiva de decréscimo no número de cromossomos e na quantidade de DNA durante a evolução dos grupos primitivos para os mais altamente organizados.

O decréscimo no número de cromossomos no cariótipo, nesses casos, pode estar relacionado com a especiação. Esta em teoria ocorreria em populações pequenas e isoladas. Contudo, a especialização não é absoluta e as alterações no número de cromossomos e no conteúdo de DNA por núcleo pode ser causado por rearranjos cromossômicos, podendo resultar na adaptação a condições ambientais específicas e real necessidade de ajustamento do nível metabólico (Kirpichnikov, 1981).

Por outro lado, a evolução cariotípica estaria principalmente seguindo em direção à simetrização dos cromossomos, isto é, à formação de cromossomos com dois braços de tamanhos parecidos, o que se encontra de acordo com a hipótese de Ohno (1974). Esse processo se daria através de várias inversões pericêntricas e, desse modo, as inversões seriam recíprocas e não reguladoras, resultando no surgimento de cariótipos morfologicamente distintos (Arefjev, 1990).

1.2 - A citogenética dos peixes neotropicais.

A evolução do cariótipo na família Characidae é caracterizada por dois processos: (1) – redução do número cromossômico relativamente infreqüente, (2) – inversões freqüentes que alteram a morfologia estrutural dos cariótipos. (Oliveira et al, 1988) Uma diversidade significativa da composição morfológica dos cariótipos em função dos valores diplóides relativamente estáveis confirmaria que a evolução cromossômica em Characidae está ligada às inversões pericêntricas (Falcão & Bertollo, 1985).

Dentro do gênero *Astyanax*, estudos citogenéticos comprovaram a ocorrência de diferentes números diplóides em condições de alopatria (Morelli et al., 1983; Paganelli & Moreira Filho, 1986; Bertollo & Moreira Filho, 1986) (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferenças do número diplóide em condições de alopatria do gênero *Astyanax*.

| Localidade | Número Cromossômico | Espécie |
|----------------|---------------------|--------------------------------|
| Rio Mogi-Guaçu | 2n=46 | <i>A. fasciatus</i> |
| Rio Juquiá | 2n=48 | <i>A. fasciatus</i> |
| Rio Juquiá | 2n=50 | <i>A. bimaculatus</i> |
| Rio Mogi-Guaçu | 2n=50 | <i>A. scabripinnis paranae</i> |
| Rio Mogi-Guaçu | 2n=36 | <i>A. schubarti</i> |

Neste gênero, a espécie *Astyanax scabripinnis* tem apresentado o maior grau de variação citogenética, mostrando uma grande diversidade cromossômica. Esta espécie apresenta um número diplóide de 2n=46, 48 e 50, onde podem ser encontradas diversas formas de cromossomos supranumerários, casos de triploidia natural, além de variações no número e na morfologia das formas cromossômicas (Moreira-Filho et al., 1978; Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Dias et al., 1992; Souza & Moreira-Filho, 1995; Vicente et al,

1996; Maistro *et al.*, 1998; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Mestriner *et al.*, 2000; Pazza, 2005). Estes dados, associados a estudos morfológicos utilizando a análise de variáveis canônicas, sugerem que *A. scabripinnis* é um complexo de espécies na maioria das vezes representadas por populações isoladas nas cabeceiras de pequenos tributários de grandes bacias hidrográficas (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998).

No complexo *Astyanax altiparanae*, estudos citogenéticos têm mostrado grandes variações cariotípicas que não afetam o número diplóide de $2n=50$ (Moreira Filho, 1989; Pacheco *et al.*, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007).

Em outros táxons de peixes sul-americanos, estudos citogenéticos têm contribuído para uma melhor compreensão das relações sistemáticas, caracterizando desde grupos de peixes com cariótipos bem conservados, como de alguns gêneros de Parodontidae (Moreira-Filho, 1983), Curimatidae (Navarrete & Julio Jr., 1997; Brassesco *et al.*, 2004), Anostomidae (Galetti Jr. *et al.*, 1984) e Prochilodontidae (Pauls & Bertollo, 1983, 1990; Jorge *et al.*, 2004).

Mas, também existem outros exemplos de variação cromossômica, além do gênero *Astyanax*, como o complexo de espécies *Hoplias malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000; Pazza & Julio Jr. 2003), também como em *Apareiodon affinis* (Jorge & Moreira-Filho, 2000), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz & Bertollo, 2006), *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2000 e 2003) e *Erythrinus erythrinus* (Bertollo *et al.*, 2004).

Outros caracteres citogenéticos, como o número e a distribuição de regiões organizadoras de nucléolos (NOR), também podem ajudar a entender a evolução cariotípica nos peixes. Na família Cichlidae, Feldberg (1983) observou

que em algumas espécies a localização da NOR encontrada no primeiro par do complemento, enquanto em outras espécies a NOR foi observada em outro cromossomo do complemento, caracterizando a ocorrência de rearranjos envolvendo essa região. Almeida-Toledo & Foresti (1985) em um estudo de revisão das NORs em peixes, chegaram às seguintes conclusões:

1 – A maior parte das espécies estudadas apresenta um par de cromossomos homólogos portadores de NORs e um pequeno grupo de espécies da família Characidae observaram mais de um par de NORs.

2 – Os cariótipos que apresentam apenas um único par de NORs podem ser considerados como ancestrais das espécies com NORs múltiplas (Hsu *et al.*, 1975).

3 – O polimorfismo encontrado em função do tamanho da NOR é muito comum nos peixes, sendo também observado em mamíferos (Goodpasture & Bloom, 1975) e em outros vertebrados (Schmid, 1982).

Existe uma enorme diversidade de comportamento das NORs entre os peixes, existindo espécies cujas NORs se mostram de forma regular e uniforme e espécies que apresentam um heteromorfismo dessas regiões tanto intra como interindividualmente (Morelli, 1981). Em algumas espécies de peixes e anfíbios, a ocorrência de NORs, banda C positiva (heterocromática), precisam um estudo mais detalhado a fim de possibilitar um melhor entendimento do seu significado em termos de estrutura cromossômica (Almeida-Toledo & Foresti, 1985) e participação evolutiva.

Juntamente com as NOR, a heterocromatina (Banda C) é uma técnica de uma grande importância para o estudo da diversificação cariotípica nos peixes Neotropicais. Trabalhos realizados em alguns gêneros da família

Characiformes, por exemplo, em *Brycon* (Margarido & Galetti Jr., 1999) e *Leporinus* (Galetti Jr. *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 1998; Margarido & Galetti Jr., 2000), onde pode-se observar macroestruturas cariotípicas que são freqüentemente encontradas, mas nota-se grandes diferenças na heterocromatina entre as espécies (Pazza, 2005).

No complexo *Astyanax* encontramos vários trabalhos relatando que as marcações de heterocromatina foram utilizadas para estudos de evolução, polimorfismo, diversificação das espécies, diformismos sexual e caracterização populacional (Pazza, 2005; Artoni *et al.*, 2006; Kavalco *et al.*, 2007; Kantek *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008).

Novas técnicas estão sendo usadas para estudo dos peixes neotropicais, as análises de DNAs satélites, está proporcionando dados importantes no que diz respeito à composição da heterocromatina e a origem dos cromossomos supranumerários e sexuais (Mestrimer *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003; Pazza, 2005).

Percebe-se então que a evolução cariotípica dos peixes ainda precisa ser analisada. São muitos os processos pelos quais os cariótipos de peixes podem sofrer modificações, numéricas ou morfológicas, ao longo de sua evolução. Além do mais, cada grupo pode ter sua evolução cariotípica explicada por um processo diferente em que alguns se caracterizam por um sistema mais variável ao passo que outros são explicados por modelos mais conservadores em termos de números diplóides ou morfologia cromossômica.

Demonstra-se assim que as técnicas citogenéticas apresentam potencial informativo para vários níveis sistemáticos, desde a avaliação dos níveis de

variação genética entre populações até o teste de hipóteses evolutivas em grandes grupos (Almeida-Toledo *et al.*, 1998).

1.3 - Distribuição biogeográfica da fauna de peixes nas bacias do leste brasileiro.

As principais bacias hidrográficas do leste brasileiro, como a do Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Doce, a Paraíba do Sul, Ribeira do Iguapé, Itajaí e Jacuí, como também várias outras bacias próximas menores, apresentam um alto grau de endemismo. Bizerril (1994) catalogou 285 espécies de peixes para estas bacias, 95% delas foram consideradas espécies endêmicas, e 23.4% delas pertencem a gêneros endêmicos à região. Devido ao caráter geral de isolamento dessa região, o estudo do padrão de distribuição das bacias do leste brasileiro pode ser de grande valor para a melhor compreensão dos padrões biogeográficos em maior escala.

Padrões biogeográficos de grande interesse são apresentados pela ictiofauna das regiões costeiras do sudeste brasileiro (planalto adjacente dos rios do escudo cristalino brasileiro) (Ribeiro, 2006). Ribeiro (2006), através de análises dos processos filogenéticos derivados de eventos cladogenéticos entre as bacias dos rios litorâneos do leste brasileiro, propôs uma classificação da ictiofauna desta região em três grupos, de acordo com sua antigüidade. Os padrões mais antigos foram classificados por Ribeiro (2006) como Padrão A (Cretáceo), considerando o período inicial da diversificação da ictiofauna endêmica presente hoje nos rios litorâneos brasileiros. Pode-se citar como

exemplo para este padrão as subfamílias de Trichomycteridae, Trichogeninae (gênero *Trichogenes*) e Copionodontinae (gêneros *Glaphyropoma*, e *Copionodon*). Estas subfamílias são endêmicas dos pequenos rios do Atlântico entre São Paulo, o sudeste Rio de Janeiro e o nordeste da bacia do rio Paraguaçu.

Os eventos cladogenéticos de idade intermediária foram considerados por Ribeiro (2006) como padrão B e foram definidos por relações de grupos irmãos com representantes presentes em rios litorâneos do Brasil e outros grupos que ocorrem associados ao escudo brasileiro. Nestes casos pode-se observar, através da resolução taxonômica, uma inter-relação filogenética ao nível de gêneros. É possível citar como exemplo do Padrão B o gênero *Scleromystax* (Aspidoradini), que possui quatro espécies endêmicas às drenagens litorâneas entre os estados do Espírito Santo e Santa Catarina (Sudeste e Sul do Brasil), sendo grupo irmão do gênero mais diversificado *Aspidoras* (Britto, 2003), incluindo 18 espécies que estão espalhadas pelos rios do escudo do planalto brasileiro e em vários rios litorâneos do Brasil (Reis, 2003).

Já os eventos cladogenéticos mais recentes são considerados por Ribeiro (2006) como característicos do padrão C. O padrão C surgiu a partir de eventos vicariantes entre o planalto dos rios do escudo cristalino brasileiro e dos rios litorâneas próximos. Tais eventos vicariantes podem explicar como ocorreu a troca da fauna entre os rios do planalto com a dos litorâneos ou vice-versa.

Um exemplo do padrão C é a fauna de peixes do rio Tiête superior que possui várias espécies compartilhadas com outros rios litorâneos, como

Hollandichthys multifasciatus, *Pseudocorynopoma heterandria*,
Hyphessobrycon bifasciatus, *Hyphessobrycon reticulatus*, e *Gymnotus*
pantherinus (Langeani, 1989; Quevedo & Reis, 2002).

2 – OBJETIVOS.

Este trabalho tem como objetivos:

- 1) Caracterizar e comparar citogeneticamente sete populações de lambari do rabo amarelo (*A. bimaculatus*) das bacias do leste brasileiro.
- 2) Contextualizar os resultados com o conhecimento geomorfológico e biogeográfico atual.
- 3) Determinar o grau de extensão da variabilidade cromossômica dentro do complexo *Astyanax bimaculatus*. (incluindo, *A. altiparanae*, *A. lacustris*, *A. assuncionensis*)

3 – MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 – Material.

Os estudos citogenéticos foram realizados em sete populações de lambari de rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) que ocorrem nas lagoas Tiririca, Juiz de Fora, Curi e Marola (bacia do médio rio Doce – município de Pingo D'Água - MG), córrego São Bartolomeu (bacia rio Doce – município de Viçosa – MG), no rio Carangola (bacia do rio Paraíba do Sul – município de Carangola - MG) e rio São João (bacia do rio Pardo – município de São João do Paraíso, norte de Minas Gerais) (Fig. 5).

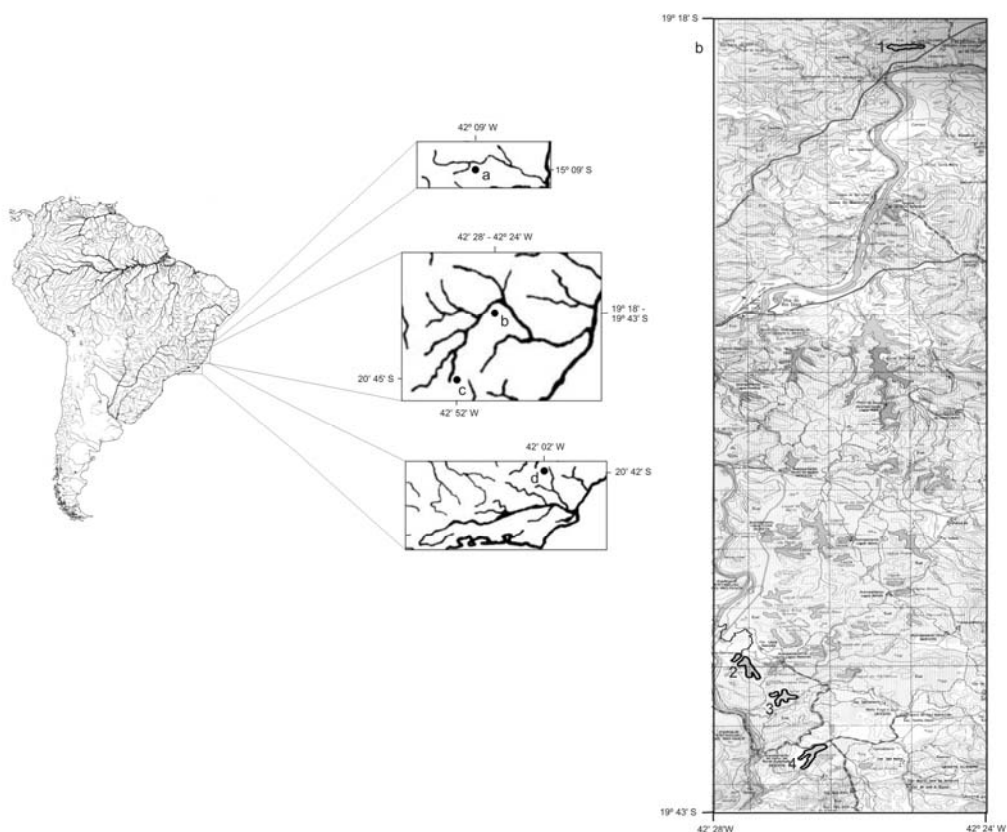


Fig. 5 – Localidades das coletas: a) Rio São João; b) Lagoas do Médio Rio Doce (1 – Lagoa Marola; 2 – Lagoa Juiz de Fora; 3 – Lagoa Curi; 4 – Lagoa Tiririca); c) Ribeirão São Bartolomeu e d) Rio Carangola.

A coleta foi realizada com redes de espera de 10 e 20 metros de comprimento, com malha variando entre 1,5 e 16 cm (distância entre nós opostos); com tarrafas e com caniço. Os espécimes foram condicionados em sacos plásticos com oxigênio e transportados ao laboratório, onde foram mantidos vivos em aquário até o seu processamento. Os espécimes destinados à análise morfológica foram fixados em formol 10% imediatamente após serem coletados e transferidos para álcool 70°. Todos os indivíduos, após sua utilização foram depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, na UFV.

3.1.1 - Preparação dos cromossomos mitóticos (tratamento “in vivo”).

O tecido utilizado para análises citogenéticas foi o rim cefálico, o qual consiste basicamente de tecido linfóide. A técnica de preparo foi originalmente descrita por Egozque (1971) e modificada para peixes por Bertollo *et al.*(1978). As divisões celulares no tecido renal cefálico anterior foram estimuladas por meio de agentes mitogênicos como fermento biológico (Hillis *et al.*, 1996) ou um antígeno comercial (Munolan®) (Molina, 1998). O comprimido de antígeno é dissolvido em 2 mL de água e injetado na cavidade peritoneal em doses diárias, na razão de um comprimido por 100 g de peso total. Geralmente, os peixes são processados após duas doses de Munolan ou após duas doses de fermento biológico administrado na mesma proporção de peso que Munolan.

Protocolo de extração de tecido renal cefálico.

01- Injetar, na cavidade peritoneal, solução aquosa de colchicina (0,025% em peso:volume) na proporção 1 mL/100 g de peso do animal.

02- Deixar em aquário bem aerado o peixe por um período de 30 a 40 min. Decorrido esse tempo, matar o animal e retirar o rim cefálico.

03- Lavar rapidamente o rim em solução hipotônica de KCl (0,075 M).

03- Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M).

05- Fragmentar bem o material, com auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até obter uma suspensão celular homogênea.

06- Colocar a suspensão obtida a 36-37 °C, durante 20 min.

08- Filtrar a solução em lã de vidro e transferi-la para um tubo Falcon de 15 mL.

07- Acrescentar gotas de fixador recém preparado (álcool metílico: ácido acético 3vv:1v) na proporção de uma gota para cada mL de suspensão; ressuspender o material e centrifugar por 10 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur. Desagregar o botão celular com vibração produzida por batidas leves do dedo indicador no fundo do tubo Falcon.

08- Adicionar, vagarosamente, 5-7 mL de fixador recém preparado, deixando-o escorrer pela parede do tubo.

09- Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar o material por 10 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante.

10- Repetir os itens 08 e 09. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1,5 a 2 mL de fixador, para obter uma concentração adequada de células. O material pode então ser guardado no refrigerador por um período aproximado de um mês, acondicionado em pequenos frascos plásticos, tipo Eppendorf, ou trabalhado imediatamente conforme os seguintes passos:

11- Pingar 3 a 4 gotas de suspensão, com pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, aquecida em água destilada a 80 °C.

12- Eliminar o excesso de material e fixador, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro.

13- Secar ao ar.

14- Corar com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 7- 10 min.

15- Lavar a lâmina com água de torneira e deixar secar ao ar.

3.1.2 - Classificação dos cromossomos.

Os cromossomos mitóticos foram classificados de acordo com Levan *et al.* (1964), com base no índice relação de braços (RB = comprimento do braço maior / comprimento do braço menor), da seguinte forma:

| | |
|-------------|----------------------|
| 1,00 – 1,69 | metacêntrico (m) |
| 1.70 – 2.99 | submetacêntrico (sm) |
| 3,00 – 6,99 | subtelocêntrico (st) |
| 7,00 | telocêntrico (t) |

3.1.3 - Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandamento C).

Bandamento é uma abordagem química ou molecular que permite determinar a organização do cromossomo eucarioto por meio da diferenciação longitudinal dos braços cromossômicos (Sumner, 1972). O padrão de heterocromatina constitutiva das espécies tem sido um dado cariotípico muito relevante em estudos de peixes neotropicais (Almeida-Toledo, 1998).

Para o estudo da heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica de Sumner (1972), com pequenas modificações:

1-Tratar o material, preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2 N em temperatura de 42 °C, por 6 min.

2- Lavar em água deionizada e secar ao ar.

3- Incubar a lâmina por 30 s, em solução de Ba (OH)₂ 8H₂O, a 5 %, a 42 °C, recém preparada e filtrada. O tempo do tratamento do hidróxido de bário deve ser determinado para cada espécie.

4- Lavar rapidamente em solução de HCl 0,2 N.

5- Lavar várias vezes em água deionizada e secar ao ar.

6- Incubar em solução 2X SSC, a 60 °C, por 1 h.

7- Lavar várias vezes em água deionizada e secar ao ar.

8- Corar em Giemsa, diluído a 2% em tampão fosfato pH 6.8, durante 20-30 minutos. Pode-se corar com Giemsa 5% por 5 a 10 minutos.

9- Lavar em água corrente e secar ao ar.

3.1.4 - Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs ou RONS).

As NORs são regiões dos cromossomos envolvidas na transcrição de RNA ribossômico, e conforme a sua função nas células, elas podem ser detectadas pela técnica de tratamento com nitrato de prata, que mostra essas regiões manchadas de preto em alguns cromossomos. Características das NORs têm sido usadas para propor hipóteses sobre tendências evolutivas dos cariótipos (Almeida-Toledo, 1998).

A caracterização das regiões organizadoras foi feita seguindo a técnica descrita por Howell & Black (1980), com algumas modificações:

1- Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica para cromossomos mitóticos, uma gota de solução aquosa de gelatina 2% (acrescida de ácido fórmico diluído na relação de 1 mL/100 mL de solução de gelatina).

2- Adicionar sobre a gota de gelatina duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata 50%. Cobrir com lamínula.

3- Incubar em estufa a 70 °C, por um período de 3 a 8 min, monitorando a coloração da lâmina e dos cromossomos, ao microscópio.

4- Quando as NORs e os nucléolos assumirem uma coloração preta ou marrom e os cromossomos um tom amarelado, lavar bem em água deionizada

com o auxílio de uma pisseta, possibilitando que a lamínula seja retirada pelo jato d'água.

5- Corar com solução de Giemsa (1% em tampão fosfato, pH 6,8) durante 1 min. Lavar em água destilada e secar ao ar.

3.1.5 - Detecção de Coloração Seqüencial com Fluorocromos (DAPI/CMA₃).

Os fluorocromos são corantes que ao serem excitados por uma fonte de luz bastante energética fluorescem emitindo luz, dependendo do comprimento de onda absorvido.

Para realizar a observação foi utilizado um microscópio de fluorescência composto de fonte luminosa, lentes de aumento adequadas e jogos de filtro capazes de filtrar a luz de determinados comprimentos de onda.

Uma grande variedade de fluorocromos vem sendo utilizada na coloração de cromossomos em estudos citogenéticos, produzindo um padrão característico de bandas fluorescentes, conforme a especificidade do fluorocromo. Duas categorias são conhecidas de acordo com a afinidade por seqüências de DNA: aqueles que são específicos para AT, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), Quinacrina, Hoechst 33258 e os específicos para GC, Cromomicina A3, Mitramicina, Actinomicina D (Menezes, 1997).

Para a caracterização dos fluorocromos foi utilizado o protocolo proposto por Schweizer (1980):

- 1- Colocar sobre o material 150 μL de solução de distamicina ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$), cobrir com uma lamínula e deixar por 15 min no escuro.
- 2- Retirar a lamínula e lavar a lâmina em água corrente.
- 3- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 min e deixar secar ao ar.
- 4- Mergulhar a lâmina em solução DAPI ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 min no escuro.
- 5- Lavar a lâmina em água corrente.
- 6- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 min e deixar secar ao ar.
- 7- Colocar sobre o material 150 μL de solução de Cromomicina A₃ ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro. Retirar a lamínula e lavar a lâmina em água corrente.
- 8- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 min.
- 9- Após secar levemente ao ar, montar com solução de sacarose e manter guardada no escuro à temperatura ambiente por 15 dias, ou 7 dias a 37 °C em estufa.
- 10- Analisar em microscopia de epifluorescência utilizando primeiramente o filtro WB (330 a 385 nm), para a CMA₃ e, em seguida, o WU (450 a 480 nm) para o DAPI.

3.2 – Análise do Material.

Para uma segura análise a respeito da montagem dos cariótipos das sete localidades onde os espécimes do lambari de rabo amarelo (*A. bimaculatus*) foram coletados, obteve-se uma média de quinze metáfases por lâmina analisada por indivíduo. Essas metáfases foram analisadas em um microscópio Olympus CX41 e fotografadas em um microscópio OlympusTM BX60 (com uma objetiva de 100x) ligado à uma câmera CCD (Optronics, modelo DEI-470). As imagens foram capturadas em alta definição, o que permitiu a realização de medidas relativamente precisas dos cromossomos, com o auxílio do programa Image-Pro[®] Plus, versão 3.1 (Media Cybernetics, 1998). Porém, o trabalho final das imagens foi realizado em outro programa: Adobe[®] Photoshop, versão 7.0.1 (Adobe Systems, 1996).

Os cromossomos foram identificados em função entre os braços (AR), dividindo-se o tamanho do braço maior pelo tamanho do braço menor, seguindo a regra criada por Levan *et al.* (1964), na qual os cromossomos são classificados em metacêntricos (m, AR = 1,00 – 1,69), submetacêntrico (sm, AR = 1,70 – 2,99), subtelocêntrico (st, AR = 3,00 – 6,99) e telocêntrico (t, AR > 7,00). Cada cromossomo do complemento cariotípico, bem como os braços dos cromossomos dessa espécie de peixe destas sete localidades teve seu tamanho medido tanto de modo absoluto como de modo relativo. A medida absoluta foi a média dos tamanhos de cada cromossomo nas quinze metáfases analisadas por lâmina de modo a evitar problemas relacionados a diferentes graus de condensação de cada cromossomo. Já a medida relativa foi realizada comparando o tamanho de cada cromossomo com o tamanho do cromossomo

maior do complemento, e seu valor também foi resultado de uma média das quinze metáfases analisada por lâmina. No momento que as relações entre os tamanhos dos cromossomos foram definidas, o cariótipo foi montado seguindo a proposta de Levan *et al.* (1964), em função da razão dos braços, em ordem decrescente.

Com os padrões observados com os bandamentos C, NOR, e os tratamentos com fluorocromos, foram construídos os cariótipos para as localidades onde os espécimes de lambari do rabo amarelo (*A. bimaculatus*) foram coletados para o estudo do presente trabalho, facilitando a comparação entre os cariótipos dessa espécie.

4 – BIBLIOGRAFIA.

- Almeida-Toledo L. F., M. F. Z. D. Silva, C. B. Moysés, S. B. A. Fonteles, C. E. Lopes, A. Akama & F. Foresti. 2003. Chromosome Evolution in Fish: Sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes, Sternopygidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, Suíça, v. 98.
- Almeida-Toledo L. F., M. F. Z. D. Silva, S. A. Toledo Filho, F. Foresti. 2000. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma, Belim – Alemanha**. v. 109, n. 3, p. 197-200.
- Almeida-Toledo, L. F. 1998. Cytogenetic Markers in Neotropical Freshwater Fishes. Pp.583-588. In: Malabarba et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs. p 603
- Almeida-Toledo, L. F. & F. Foresti. 1985. As regiões organizadoras de nucléolos em peixes. **Ciência e Cultura**, 137: 448-453.
- Arefjev, V. A. 1990. Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the descriptionj of somatic karyotypes for six of tetras. **Caryologia**, v.43, n. 3-4: 305-319.
- Artoni, R. F., O. A. Shibatta, M. C. Gross, C. H. Schneider, M. C. Almeida, M. R. Vicari & L. A. C. Bertollo. 2006. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil).**Neotropical Ichthyologic**, 4(2):197-202.
- Avise, J. C. & J. R. Gold. 1977. Chromosomal divergence and speciation in two families of North American fishes. **Evolution**, 31, 1–13.
- Bertollo, L. A. C., C. Oliveira, W. F. MOLINA, V. P. Margarido, M. S. Fontes, M. C. Pastori, J. N. Falcão & A. S. Fenocchio. 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity (Edinburgh)**, Inglaterra, v. 93, p. 228-233.
- Bertollo, L. A. C., G. G. Born, J. A. Dergam, A. S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, Holanda, v. 8, n. 7, p. 603-613.
- Bertollo, L. A. C., O. Moreira-Filho & P. M. Galetti Jr. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of fish biology**, v. 28, p. 153-159.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomics considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, I (2): 103-120

- Bizerril, C.R.S.F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biologica Leopoldensia** 16 :51-80.
- Böhlke, J. E., S. H. Weitzman & N. A. Menezes. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **ACTA Amazônica**, 8 (4): 657-677.
- Brassesco, M. S., M. C. Pastori, H. A. Roncati & A. S. Fenocchio. 2004. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, 3(2): 293-301.
- Britski, H. A., Y. Sato & A. B. S. Rosa. 1988. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3^a ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação, CODEVASF, 115p.
- Britto, M. R. 2003. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 153(1): 119–154.
- Caetano, L. G., L. C. Jorge, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2001. Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, Japão, v. 66, p. 59-64.
- Cohen, D. M. 1970. **How many recent fishes are there?** Proceedings of the California Academy of Sciences. 4th series, 38, 341-346.
- Denton, T. E. 1973. **Fish chromosome methodology**, Charles C. Thomas Publisher, Illinois, 166p.
- Dias, A. L., C. Oliveira & O. Moreira-Filho. 1992. Ocorrência de triploidia natural em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). In: **IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**. Rio de Janeiro. p.25
- Diniz, D. & L. A. C. Bertollo. 2006. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 453-458.
- Domingues, M. S., M. R. Vicari, V. Abilhoa, J. P. Wamser, M. M. Cestari, L. A. C. Bertollo, M. C. Almeida & R. F. Artoni. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, 5(1): 37-44.
- Egozque, J. 1971. **Técnicas em Citogenética**. Editorial Espaxs, Barcelona, p 144.

- Eigenmann, C.H. 1927. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 311-428.
- Eigenmann, C.H. 1921. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 209-310.
- Eigenmann, C.H. 1918. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 103-208.
- Falcão, J. N. & I. A. C. Bertollo. 1985. Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **Journal of Fish Biology**, v. 27, p. 603-610.
- Feldberg, E. 1983. **Estudos citogenéticos em 10 espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes)**. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos – SP.
- Fernandes, C. A. & I. C. Martins-Santos. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141: 328-332.
- Fowler, H. W. 1915. Fishes of Trinidad, Grenada, and St. Lucia, British West Indies. Proc. Acad. Nat. Sci. Phil., p.520-546.
- Galetti Jr., P. M., C. A. Mestriner, P. C. Verene & F. Foreste. 1991. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of family Anostomidae (Characiformes). **Cytogenetics and Cell Genetics**. 56:116-121.
- Galetti Jr., P. M., F. Foresti, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae fish on the basis of the Nucleolar Organizing Regions. **Caryologia** (Firenze), v. 37, n. 4, p. 401-406.
- Garutti, V. 1995. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada do pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. Tese de Livre Docência em Zoologia (Vertebrados), Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo. 286p.
- Géry, J. 1977. **Characoids of the World**. T. F. H. publications 672 p.
- Giuliano-Caetano L., L. C. Jorge, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2001. Comparative cytogenetics studies in *Hoplerthrinus unitaeniatus* populations. **Cytologia**. 66:39-43.

- Goodpasture, C. & S. E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, Berlin, 53: 37-50.
- Guerra, M. 1988. **Introdução à Citogenética Geral**. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro – RJ. 141p.
- Hedrick, P. W. 1981. The establishment of chromosomal variants. **Evolution**, 35(2): 322–332.
- Hillis, D. M., Moritz, C. & B. K. Madle. 1996. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts – USA. p.121-166.
- Hinegardner, R. & D. E. Rosen. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **The American Naturalist** 106, 621-644.
- Howell, W.M. & D. A. Black. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014 – 1015.
- Hsu, T. C., S. E. E. Spirito. & M. L. Pardue. 1975. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, 53: 25-33.
- Jesus, C. M., P. M. Garutti Jr., S. R. Valentini & O. Moreira-Filho. 2003. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**. 118:25-32.
- Jorge, L. C., A. L. Bottegoni, F. Barros & S. Sánchez. 2004. **Caracterización cromosómica de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) de la región nordeste argentina**. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Universidad Nacional Del Nordeste. Resumo: V-018.
- Jorge, L. C. & O. Moreira-Filho. 2000. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces: Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**, 109: 267-273.
- Kantek, D. L. Z., R. B. Noletto, A. S. Fenocchio & M. M. Cestari. 2007. Cytotaxonomy, Heterochromatic Polymorphism and Natural Triploidy of a Species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) Endemic to the Iguazu River Basin. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**. Vol.50, n. 1 : pp.67-74,.
- Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2007. Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 30, 3, 529-535.
- Kirpichnikov, V. S. 1981. The evolution of Karyotypes among cyclostomes and fishes. In: **Genetic Bases of Fish Selection**. Springer-Verlag, New York. 410p.

- Kirpichnikov, V. S. 1973. On karyotype evolution in Cyclostomata and Pisces. **Ichthyologia**, 5, 55–77.
- Langeani, F. 1989. **Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): taxonomia**. Unpublished M.Sc. Thesis. Universidade de São Paulo. São Paulo, 231p
- Levan, A., K. Fredga, & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. P. da Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Cassati, V. A. Bertaco, C. Moreira, & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. p.106. In: Reis, R., Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre – RS.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Edusp – São Paulo. p.20-21.
- Lucena, C. A. S. 1993. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osthariophysi, Characiformes)**. São Paulo – SP. Tese de Doutorado, Instituto Biociências, Universidade de São Paulo. 158p.
- Maistro, E.L., F. Foresti & C. Oliveira. 1998. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology** 21: 201-206.
- Mank, J. E. & J. C. Avise. 2006. Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. **Genetica**, 127: 321–327.
- Margarido, V. P. & P. M. Garutti Jr. 2000. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**, 23 (3): 569-573.
- Margarido, V. P. & P. M. Garutti Jr. 1999. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 22 (3): 357-361.
- Melo, F. A. G. de. 2000. **A Serra dos órgãos como barreira biogeográfica para peixes dos gêneros *Astyanax* Baird e Girard (1854) e *Deuterodon* Eigenmann (1907) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Pós – Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia). 139p.

- Menezes, M. B. F. 1997. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de Mestrado, UFV, Viçosa (MG).
- Mestriner, C. A., P. M. Galetti Jr., S. R. Valentini, I. R. G. Ruiz, L. D. S. Abel, O. Moreira-Filho & J. P. M. Camacho. 2000. Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, 85: 1-9.
- Mizoguchi, S. M. H. N. & I. C. Martins-Santos. 1998. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 21: 55-61.
- Molina, W., M. Schimid & P. M. Galetti Jr. 1998. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fishes genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, 94: 141-149.
- Morelli, S., L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae)ii. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia** (Firenze), v. 36, n. 3, p. 245-250.
- Morelli, S. 1981. **Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces – Characidae)**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos – SP. 219p.
- Moreira-Filho, O. & L. A. C. Bertollo. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, 14: 331-357.
- Moreira-Filho, O. 1989. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. Tese Doutorado, programa de Pós – Graduação Ecologia e Recursos Naturais, UFSCAR, São Carlos, SP, 135 p.
- Moreira-Filho, O. 1983. **Estudos na família Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco, SP: Aspectos citogenéticos e considerações correlatas**. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos – SP.
- Moreira-Filho, O., P. M. Galetti Jr. & L. A. C. Bertollo. 1978. Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces: Characidae). **Ciências e Cultura** Sup. 30, 548-549.
- Navarrete, M. C. & H.F. Júlio Jr. 1997. Cytogenetic analysis of four Curimatids from the Paraguay basin (Pisces: Characiformes: Curimatidae). **Cytologia**, Japão, v. 62, p. 241-247.

- Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd edition, John Wiley e Sons. New York – USA, 600p.
- Nelson, J. S. 1984. **Fishes of the World**. 2nd edn. New York, John Wiley.
- Oliveira, C., L.F. Almeida-Toledo, F. Foresti, H.A. Britski & S.A. Toledo Filho. 1988. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**. 11: 577-624.
- Ohno, S. 1974. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In: John, B. ed. **Animal Cytogenetics**. Gebrüder Borntraeger, Berlin. v. 4. Chordata 1, 92p.
- Ohno, S. 1970. **Evolution by Gene Duplication**. Springer-Verlag, New York, 160p.
- Pacheco, R.B., L. Giuliano-Caetano & A.L. Dias. 2001. Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, 5: 109-114.
- Paganelli, H.H. & O. Moreira-Filho. 1986. Considerações cariotípicas de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) de três bacias hidrográficas. In: **Proc. XIII Congresso Brasileiro de Zoologia**. 120 p.
- Pauls, E. & L. A. C. Bertollo. 1990. Distribution of a supernumerary chromosomes system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica** 81: 117-123.
- Pauls, E. & L. A. C. Bertollo. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36 (4): 307-314.
- Pazza, R. 2005. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos – SP. 124p.
- Pazza, R. & H. F. Júlio Jr. 2003. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain (Brazil). **Cytologia**, Japão, v. 68, p. 159-163.
- Post, A. 1973. Chromosomes of two fish-species of the genus *Diretmus* (Osteichthyes, Beryciformes: Diretmidae). In: Schröder, J. H., ed. **Genetics and Mutagenesis of Fish**, 103-111. Springer-Verlag, Berlin.
- Quevedo, R. & R. E. Reis. 2002. Pogonopoma obscurum: a new species of loricariid catfish (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil, with comments on the genus Pogonopoma. **Copeia**, 2002: 402–410.
- Reis R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre – RS. 742p.

- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 225-246.
- Rieseberg, L. H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology e Evolution**, 16(7): 351–357.
- Schmid, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, Berlin, 87: 327-344.
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI – bands) in human chromosomes. **Cytogenetics Cell and Genetics**, v.27, p.190-193.
- Souza, I. L. & O. Moreira-Filho. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae) I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, 60: 1-11.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75:304-306.
- Vicente, V. E., L. A. C. Bertollo, S. R. Valentini & O. Moreira-Filho. 2003. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae), Satelliti DNA, G- and C-banding. **Genetica**, 119(2): 115-120.
- Vicente, V. E., O. Moreira-Filho & J. P. M. Camacho, 1996. Sex-ratio distortion associated to the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, 74: 70-75.
- Vicari, M. R., R. B. Noleto, R. F. Artoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo .2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (suppl), 173-179.
- Weitzman, S. H. & L. R. Malabarba. 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. Lucena. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre – RS, 603p.
- White, M. J. D. 1978. **Modes of Speciation**. W. H. Freeman, San Francisco – USA.
- White, M. J. D. 1977. **Os cromossomos**. Companhia Editora Nacional, São Paulo – SP. 196p.

Wilson, A. C., V. M. Sarich & L. R. Maxson. 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A**, 71, 3028–3030.

CAPÍTULO 2

Heterochromatin variability of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae) populations in southeastern Brazil.

1 - Introduction

The Neotropical freshwater fish fauna is considered the richest in the World, and 350 years after the first taxonomic descriptions, phylogenetic relationships within large taxa are still unclear. The family Characidae represents a paradigm of systematics in a state of flux. The monophyly of its former largest subfamily, the Tetragonopterinae is considered as doubtful (Lima *et al.*, 2003) and most of the old Tetragonopterinae genera such as *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* are in a *incertae sedis* condition within the family, comprising 620 species distributed in 88 genera (Lima *et al.*, 2003).

The genus *Astyanax* is the largest taxon within the old Tetragonopterinae, it includes 85 nominal species and subspecies, some of them occurring from southern United States to northern Argentina (Lima *et al.*, 2003). The last revisionary work on *Astyanax* was realized by Eigenmann (1918, 1921, 1927), who recognized 74 species and subspecies. However, many systematic problems such as the taxonomic boundaries of the genus are still unresolved (Melo, 2000).

One of its species, *Astyanax bimaculatus* was described by Eigenmann (1912, 252-254) and diagnosed, among other characters by possessing two spots, one rounded at the humeral region and another one extending from the base of the caudal fin to the median caudal rays; two series of pre-maxillary teeth, the inner one with five or, more rarely, four teeth; complete lateral line; caudal fin scaleless; infraorbital bones that do not cover the cheek, adipose fin; and four anterior medial large teeth followed by much smaller teeth. In 1995, Garutti recognized 30 valid species and current taxonomy validates 13 species within the nominal *A. bimaculatus* complex (Lima *et al.*, 2003). Within this context, we considered this suite of characters as diagnostic for a putative natural group.

Ever-mounting cytogenetic evidences allow characterization of trends within Neotropical Characiformes. On the conservative side, four families regarded as monophyletic (Vari, 1983), the Parodontidae, Curimatidae, Anostomidae and Prochilodontidae are characterized by $2n=54$ and relatively stable chromosome morphology (Moreira-Filho, 1983; Galetti Jr. *et al.*, 1984; Pauls & Bertollo, 1983; 1990; Navarrete & Julio Jr., 1997; Brassesco *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2004). Within these taxa, however, some species such as *Apareiodon affinis* have as much as ten cytotypes (Jorge & Moreira-Filho, 2000). On the variable extreme, the family Erythrinidae has high levels of chromosome variability within and among populations. Seven karyotypes are currently recognized within *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Bertollo *et al.*, 2000). Giuliano-Caetano & Bertollo (1988) report the occurrence of four $2n=48$ cytotypes in an Amazonian population of *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829), whereas in the Doce River basin

this species is $2n=52$. A population of *H. unitaeniatus* from the São Francisco basin shows extensive within and among individual karyotypical variability (Diniz & Bertollo, 2006).

In Characidae, cytogenetic patterns of variation within *Astyanax* suggest different patterns of chromosomal evolution. Although $2n=50$ is a common diploid number, many species have diverged from it, such as *A. schubarti* Britski, 1964 ($2n=36$) (Morelli *et al.* 1983). Two other well studied species, *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) have been characterized with high levels of diploid number variation. *A. fasciatus* diploid number ranges from $2n=45$ to $2n=48$ (Morelli *et al.* 1983; Paganelli, 1990; Justi, 1993; Daniel-Silva, 1996; Vale & Martins-Santos, 1999, Pazza *et al.*, 2006). *A. scabripinnis*, a species complex of fishes adapted to headwater environments, has still higher levels of diploid number variation, with cytotypes $2n=46$, $2n=48$, and $2n=50$ (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Maistro *et al.*, 2000).

Within the *A. atiparanae* complex, all cytogenetic studies indicate a stable $2n=50$ diploid number (reviewed in Pacheco *et al.*, 2001). However, differing chromosome morphologies allow the characterization of three cytotypes collected in sympatry in the Claro River (Pacheco *et al.*, 2001), a tributary of the Upper Paraná basin. The objective of this study was to characterize the karyotypes of populations of *A. bimaculatus* in three Brazilian coastal basins, including populations isolated during the Quaternary (10,000 years) and to discuss some aspects of karyotypical evolution of this species complex.

2 - Materials and methods

Eighty-six specimens (36 males and 50 females) were collected in three coastal basins (Fig. 1 and Table 1). Within the Doce River drainage, four lakes were sampled. Chromosome preparations were obtained from kidney cells by the direct method according to Bertollo *et al.* (1978). Mitoses were stimulated in vivo with Munolan®, a commercial immune system enhancer composed of fungal and bacterial lysate. Cell division was stimulated in vivo with 2 daily applications (1 pill dissolved in mL of water/100g body weight) of lysate. The nucleolus organizer region (NOR) was evidenced with silver nitrate staining according to Howell & Black (1980), and fluorochrome staining was carried out according to Schmid (1982). Metaphases images were obtained in a BX 60 Olympus microscope and chromosomes measurements were obtained using Image Pro-Plus® and chromosomes were classified as metacentrics (m), submetacentrics (sm), subtelocentrics (st) and telocentrics (t) based on centromeric index values as proposed by Levan *et al.* (1964). Acrocentrics were considered as telocentrics in the revised literature. FN (fundamental number) was determined considering all chromosomes as bi-armed, except for telocentrics, which were considered as having one arm. Presence, location and intensity of C⁺ regions were coded in a binary matrix and data were subject to unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) similarity analysis among populations using TFPGA (Miller, 1997, available at (<http://www.marksgeneticsoftware.net/>)). The binary

matrix included data from the São Francisco population reported by Paganelli (1990).

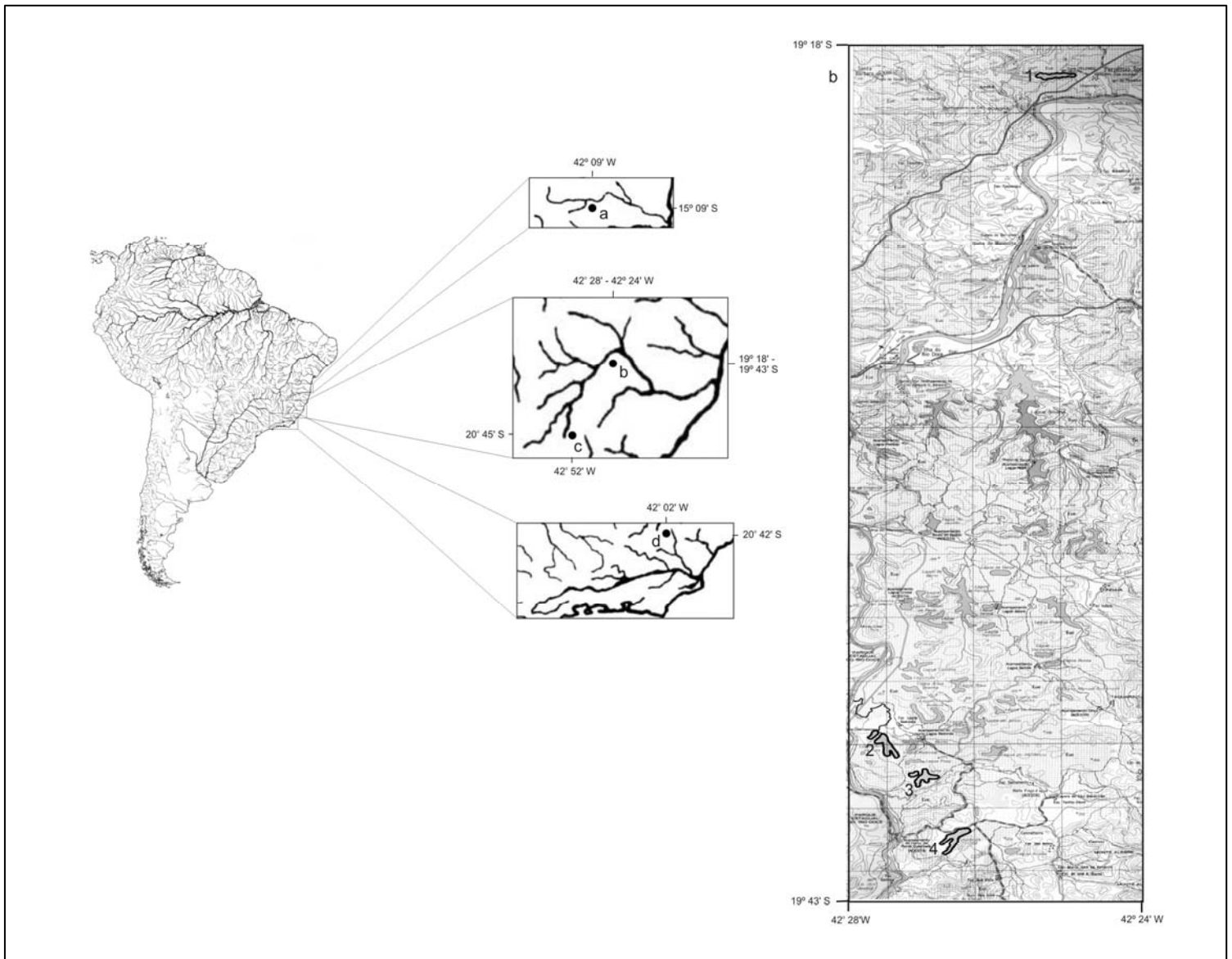


Fig. 1 – Location of collections: a) São João River; b) Middle Doce River lakes (1 – Marola Lake ; 2 – Juiz de Fora Lake; 3 – Curi Lake; 4 – Tiririca Lake); c) São Bartolomeu Spring; d) Carangola River.

3 – Results

All populations were characterized by the same karyotypic formula 6 metacentrics, 20 submetacentrics, 18 subtelocentrics and 6 telocentrics (Figs. 2, 3, 4 and 5) and no sex chromosomes were detected. Likewise, NORs were always present as one pair, located on a pair of st chromosomes corresponding to pairs 18 or 19 (Figs. 6 and 7). These chromosomes were always associated to regions that showed intense CMA₃ fluorescence (Figs. 8 and 9). C- banding patterns showed high levels of variation among lakes within the Doce River Basin and among drainages (Figs. 10, 11, 12 and 13), but clustering based on presence and absence of C bands were not consistent with geographic distribution of samples (Fig. 14).

Table 1 – Karyotypic results obtained in specimens of *A. bimaculatus* obtained from seven populations.

| Locale | Basins | GPS | Sample size (males/females) | Number of C-banded chromosomes |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| São Bartolomeu Spring | Doce River | 20° 45' 30.18" S; 42° 52' 27.04 O | 19 (10/9) | 18 |
| Curi Lake | Doce River | 19° 43' 11.06" S; 42° 28' 09.96" O | 6 (1/5) | 18 |
| Juiz de Fora Lake | Doce River | 19° 42' 15.78" S; 42° 28' 58.35" O | 3 (1/2) | 18 |
| Marola Lake | Doce River | 19° 44' 50.33" S; 42° 26' 52.55" O | 26(11/15) | 16 |
| Tiririca Lake | Doce River | 19° 18' 51.48" S; 42° 24' 13.51" O | 12 (5/7) | 18 |
| Carangola River | Paraíba do Sul River | 20° 42' 12.14" S; 42° 02' 18.10" O | 13 (5/8) | 18 |
| São João River | Pardo River | 15° 09' 83.6" S; 42° 09' 74.4" O | 7 (3/4) | 28 |

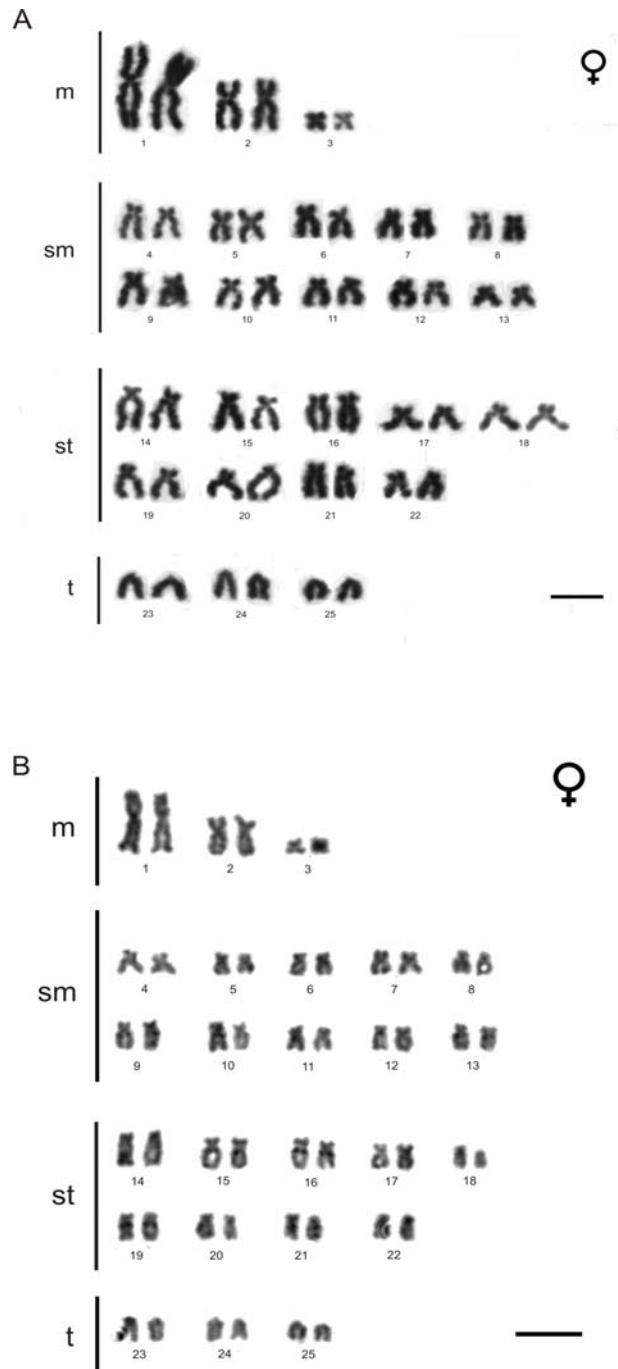


Fig. 2 – Giemsa-stained karyotypes. a) São Bartolomeu Spring; b) Curi Lake. Bar indicates 10 μm.

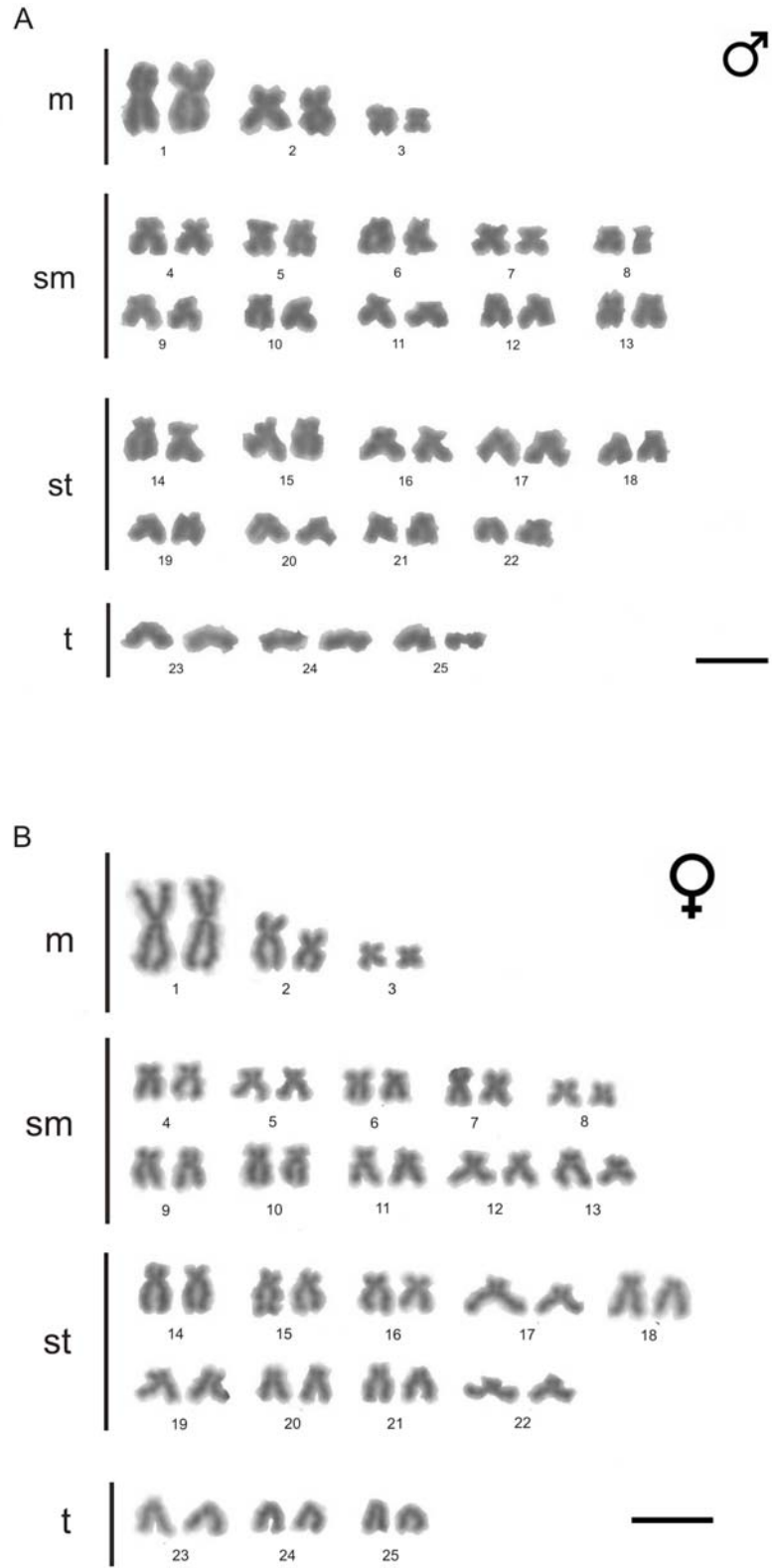


Fig. 3 – Giemsa-stained karyotypes. a) Juiz de Fora Lake b) Marola Lake. Bar indicates 10 μm.

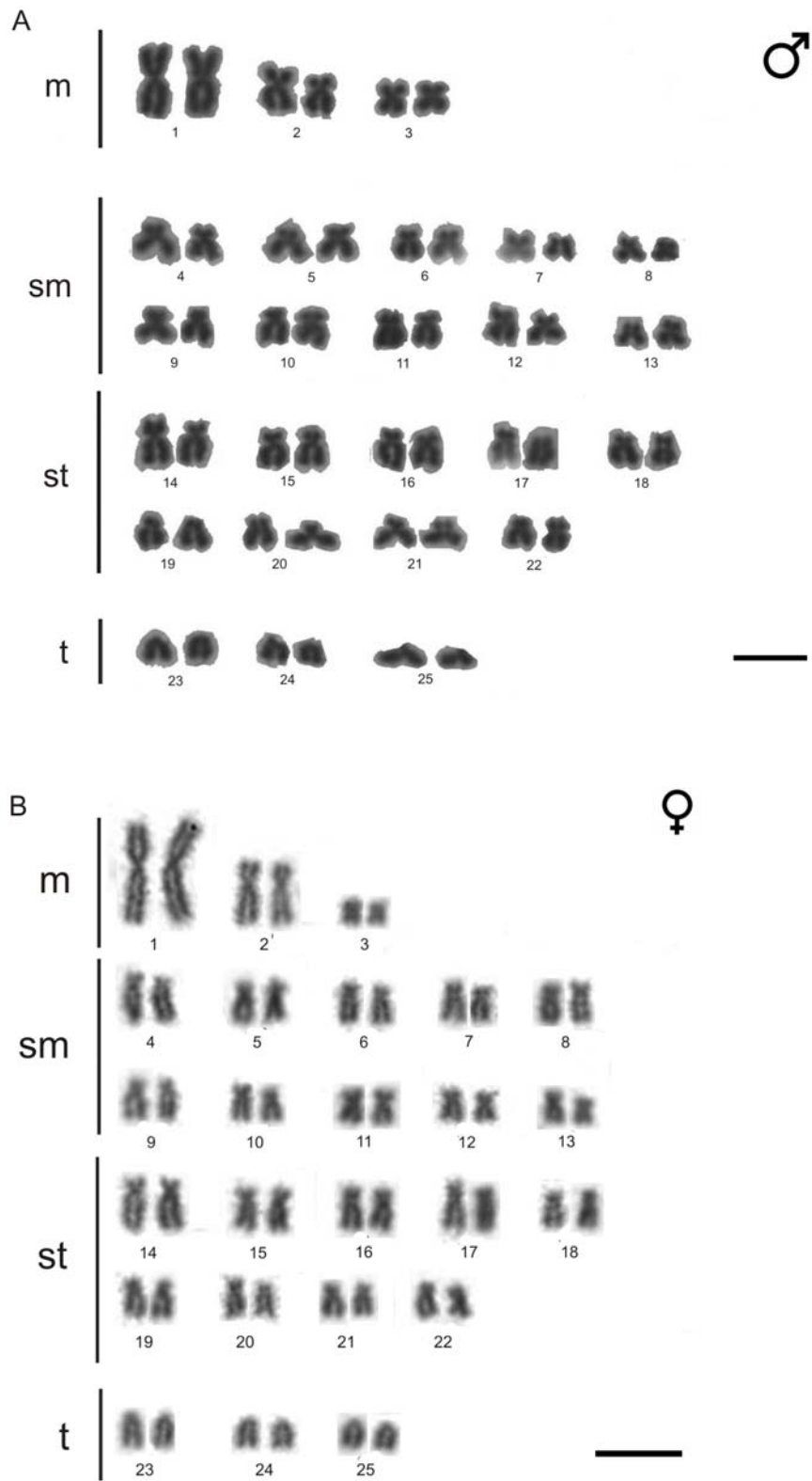


Fig. 4 – Giemsa-stained karyotypes. a) Tiririca Lake; b) Carangola River. Bar indicates 10 μm.

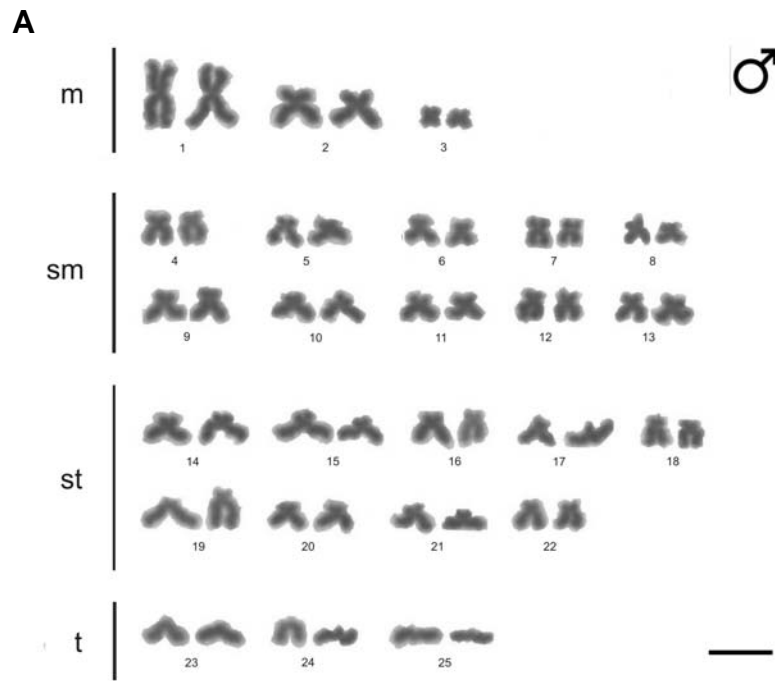


Fig. 5 – Giemsa-stained karyotypes . a) São João River. Bar indicates 10 μ m.

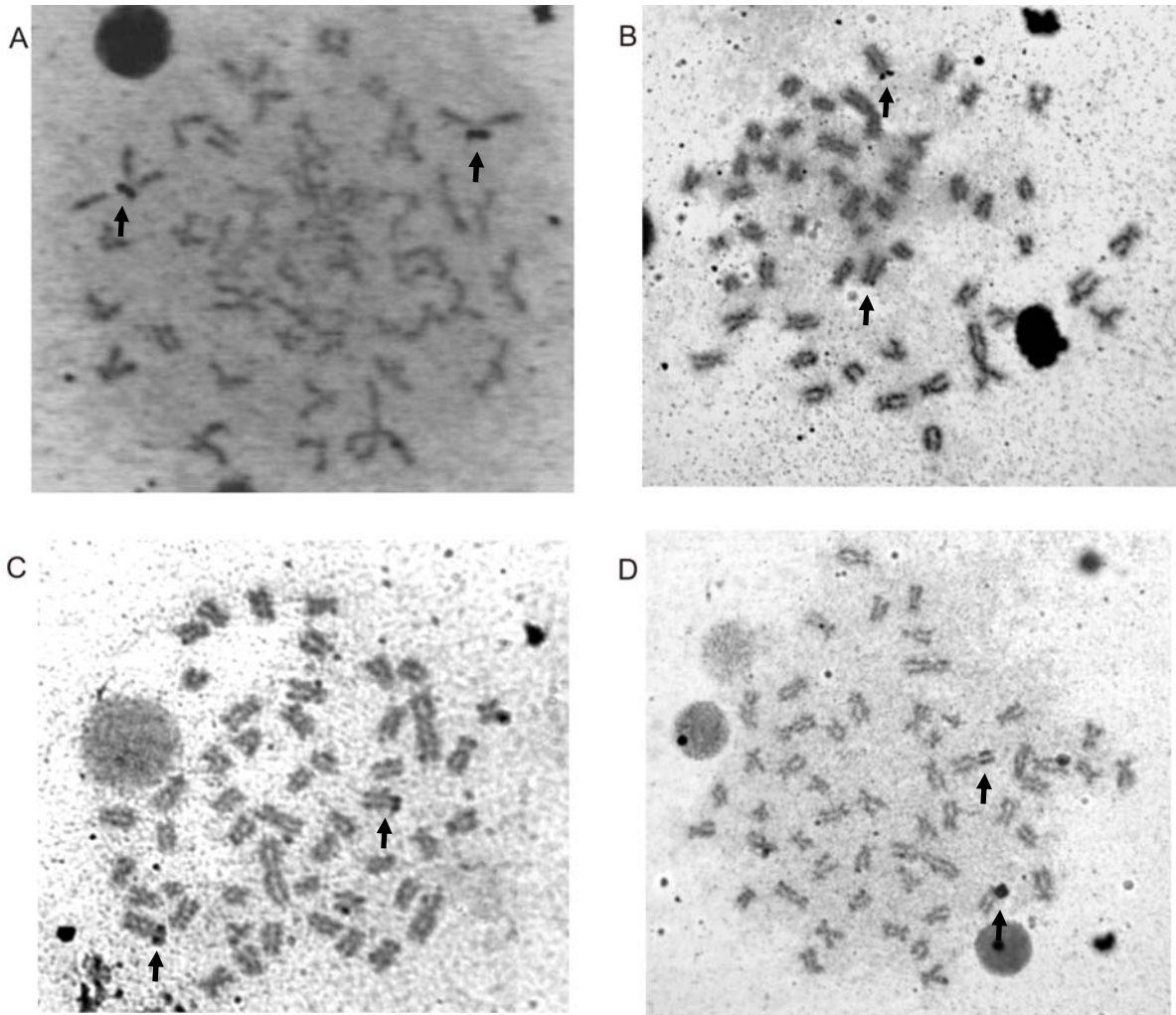


Fig. 6 – Ag-NOR-bearing chromosomes . a) São Bartolomeu Spring; b) Curi Lake; c) Juiz de Fora Lake; d) Marola Lake. Arrows indicate NOR-bearing chromosomes.

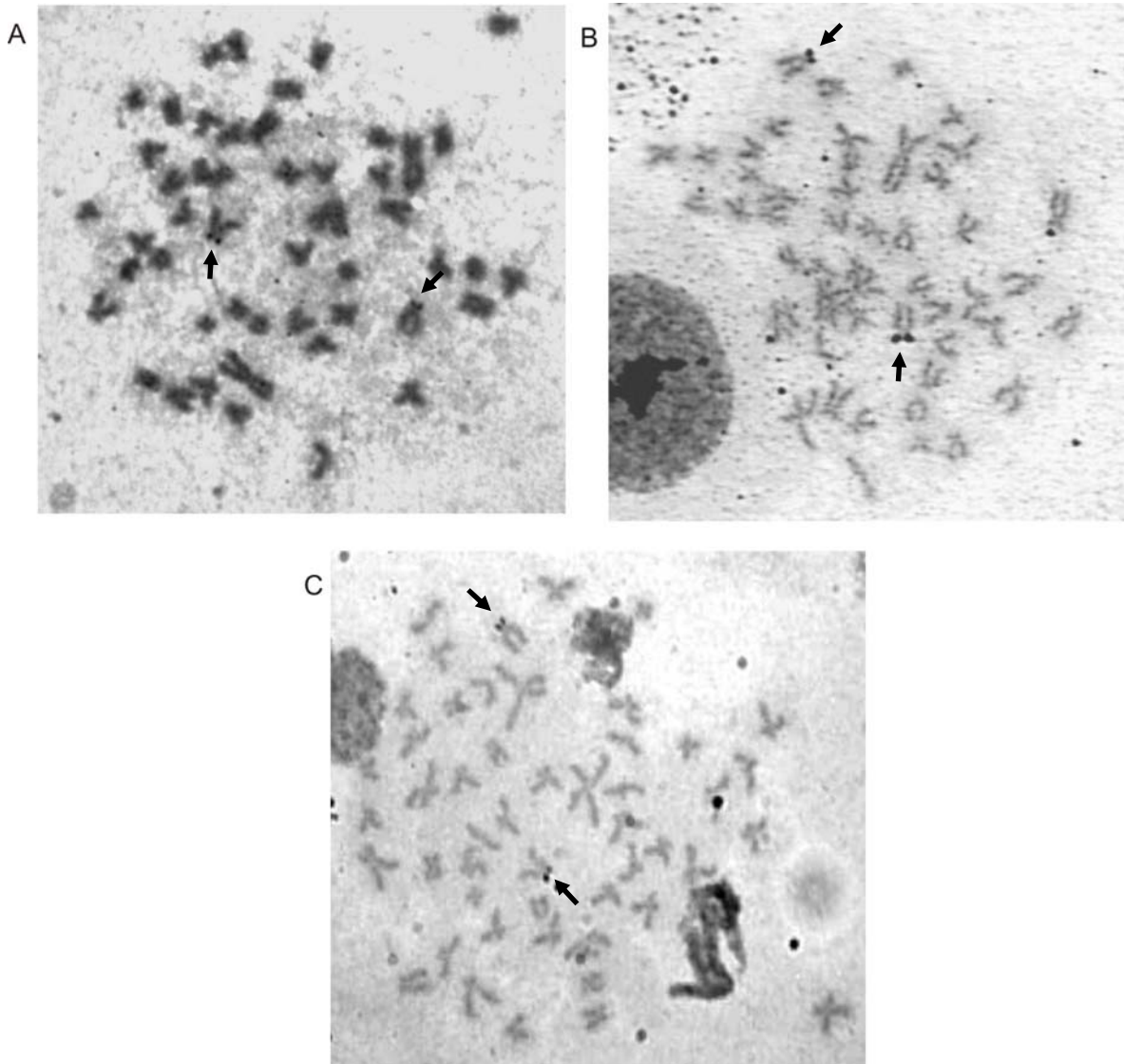


Fig. 7 – NOR-bearing chromosomes stained with silver nitrate. a) Tiririca Lake; b) Carangola River; c) São João River. Arrows indicate NOR-bearing chromosomes.

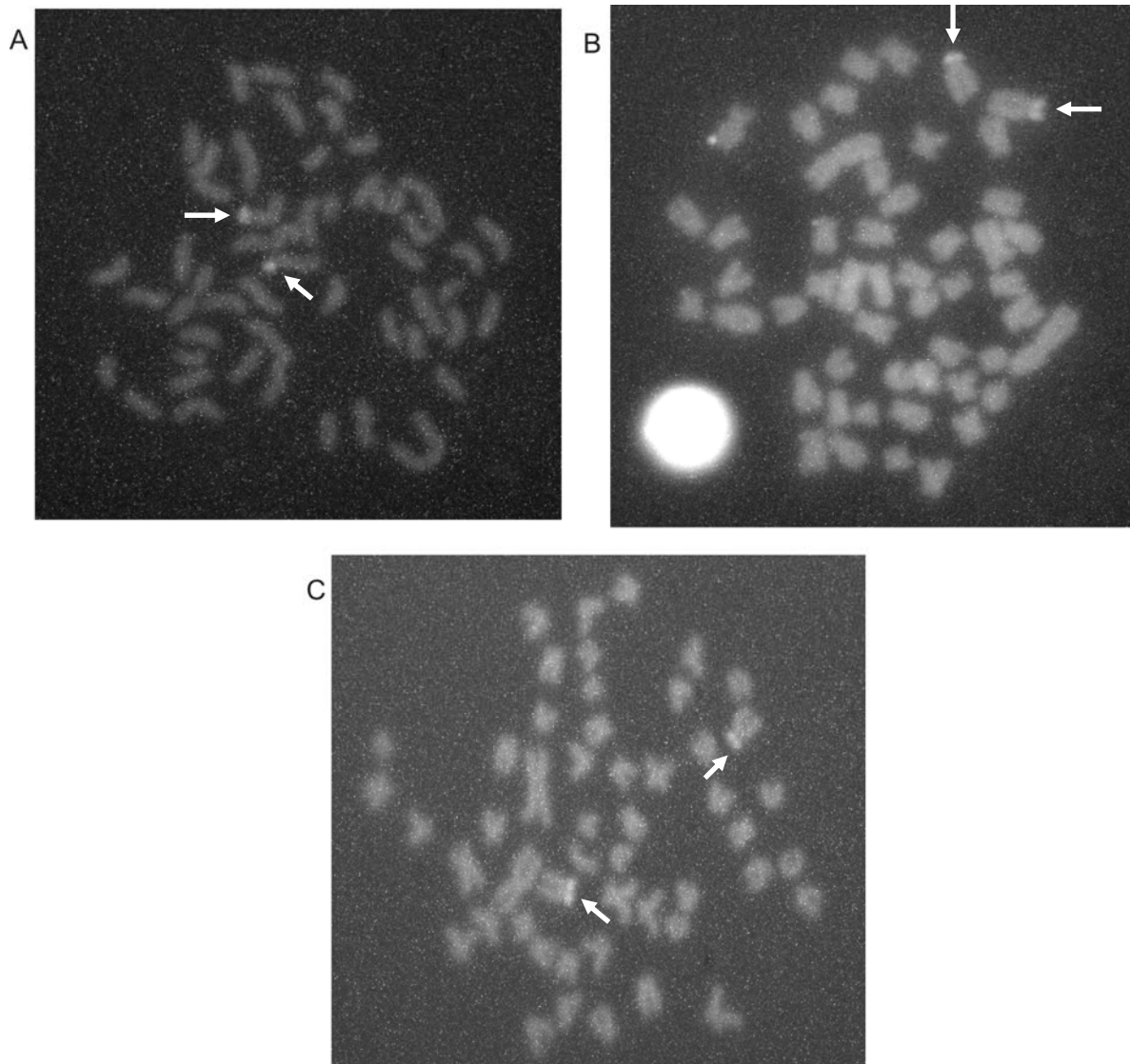


Fig. 8 – CMA₃ fluorescence chromosomes; a) São Bartolomeu Spring; b) Juiz de Fora Lake; c) Marola Lake.

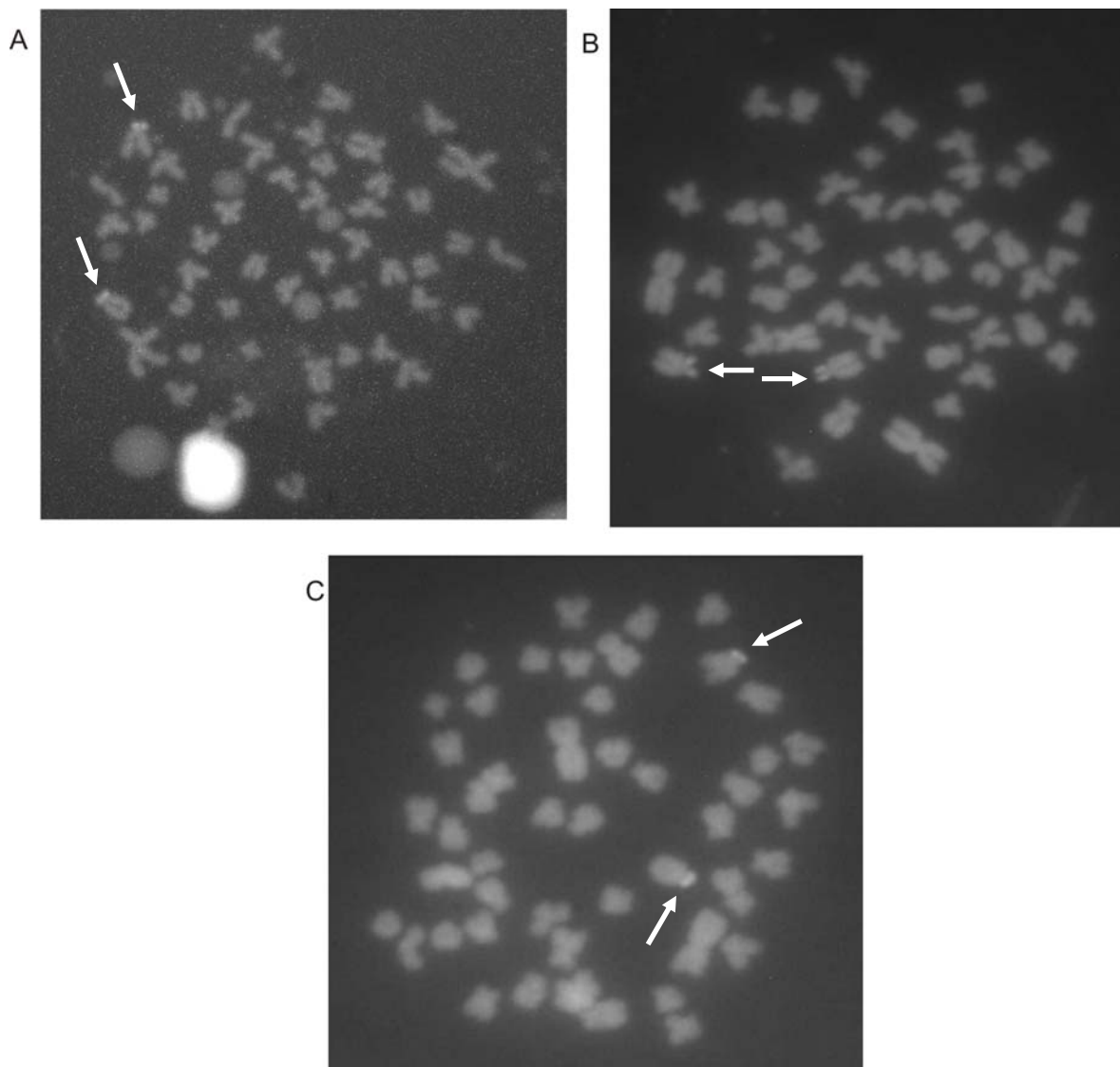


Fig. 9 – CMA₃ – treated chromosomes; a) Tiririca Lake; b) Carangola River; c) São João River. Arrows indicate GC-rich regions.

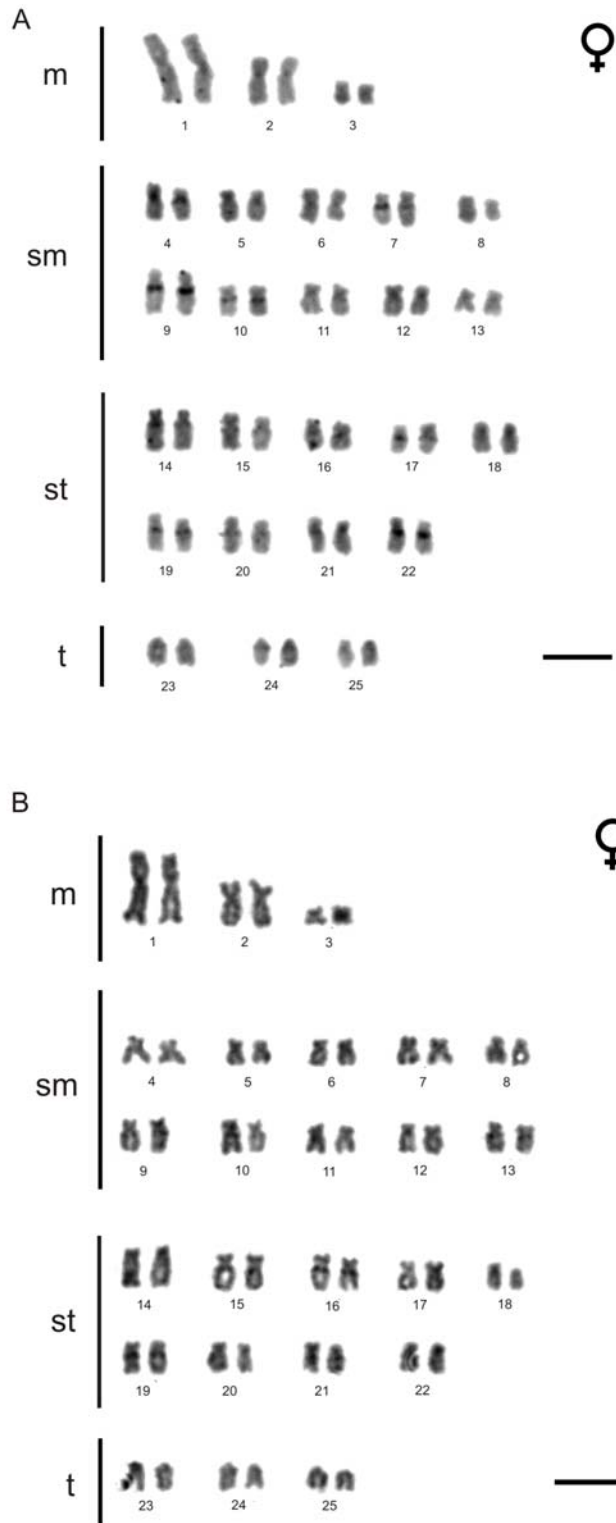


Fig. 10 – C-banded karyotypes: a) São Bartolomeu Spring; b) Curi Lake. Bar below karyotypic 10 μm .

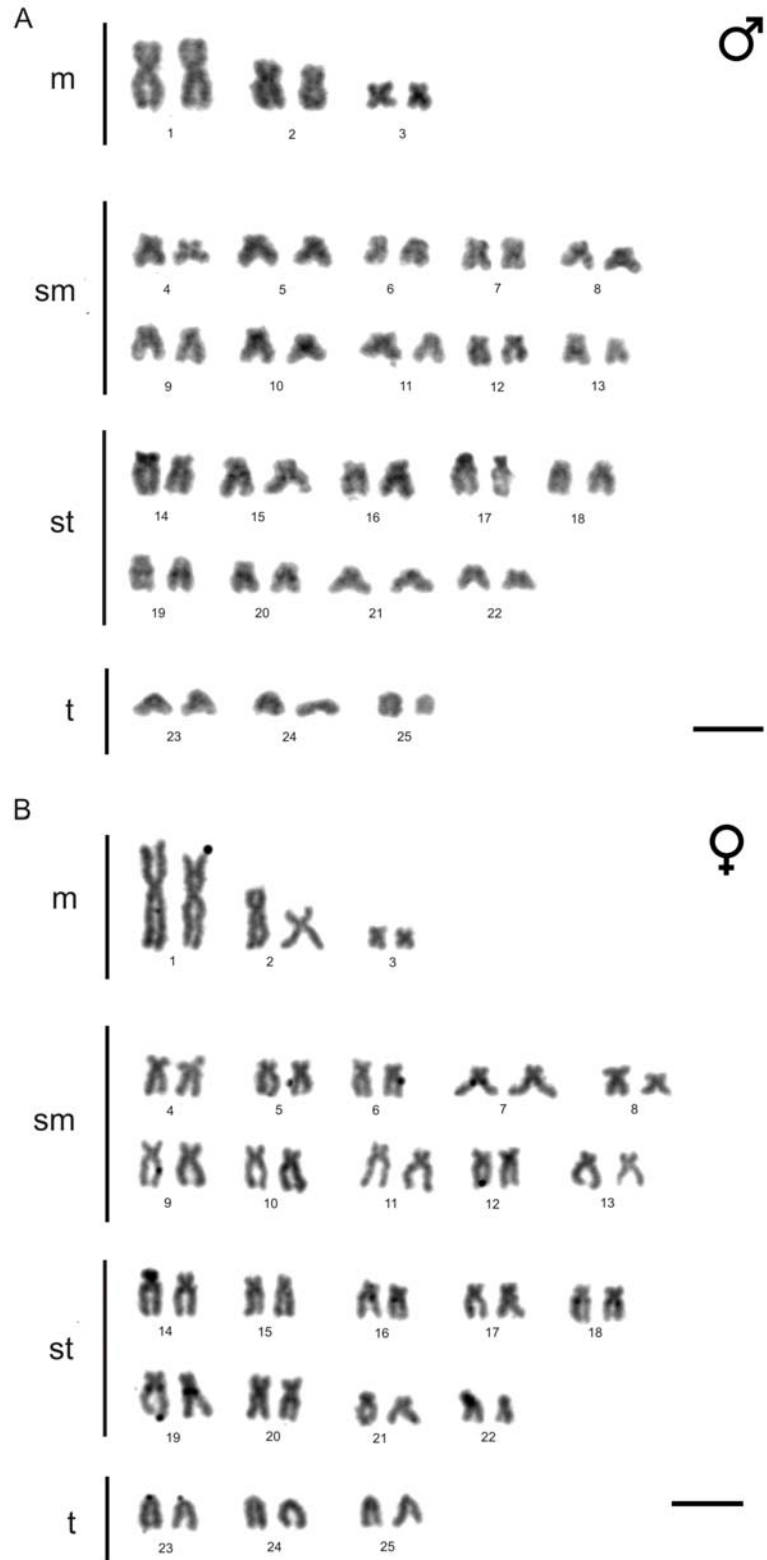


Fig. 11 – C-banded karyotypes: a) Juiz de Fora Lake b) Marola Lake. Bar indicates 10 µm.

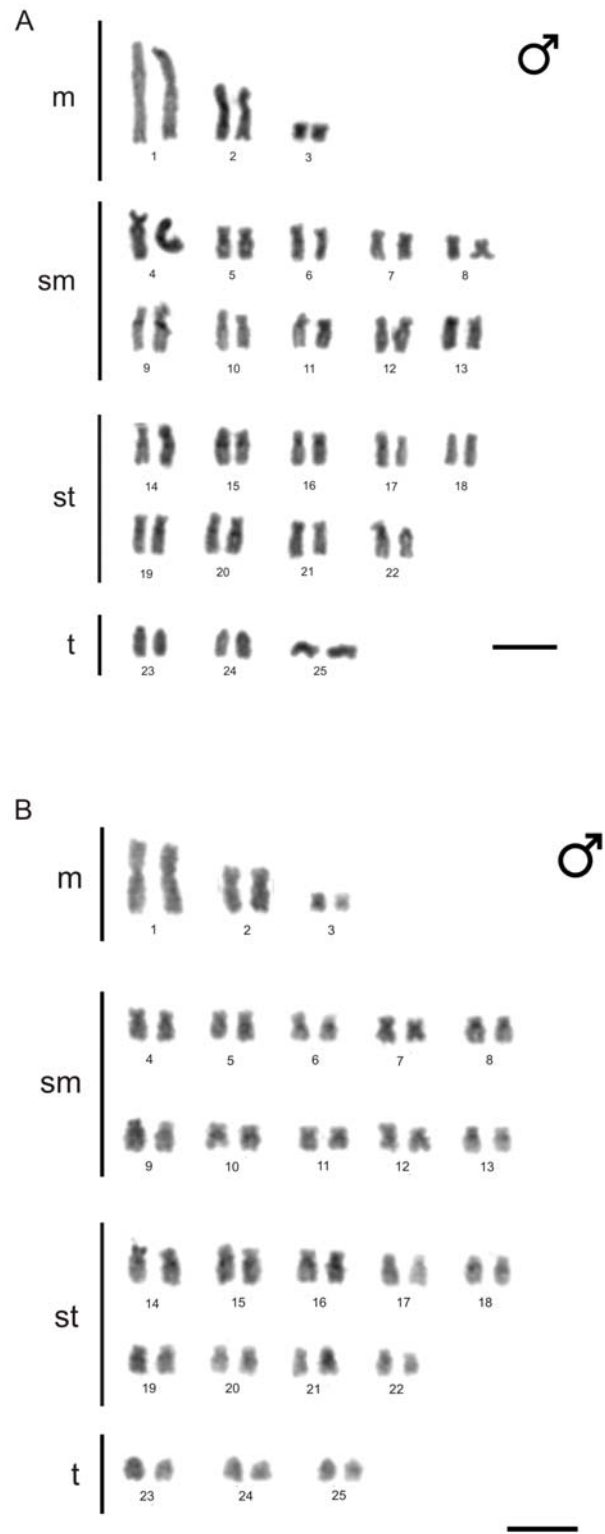


Fig. 12 – Karyotypic C Bands: a) Tiririca Lake; b) Carangola River. Bar indicates 10 μ m.

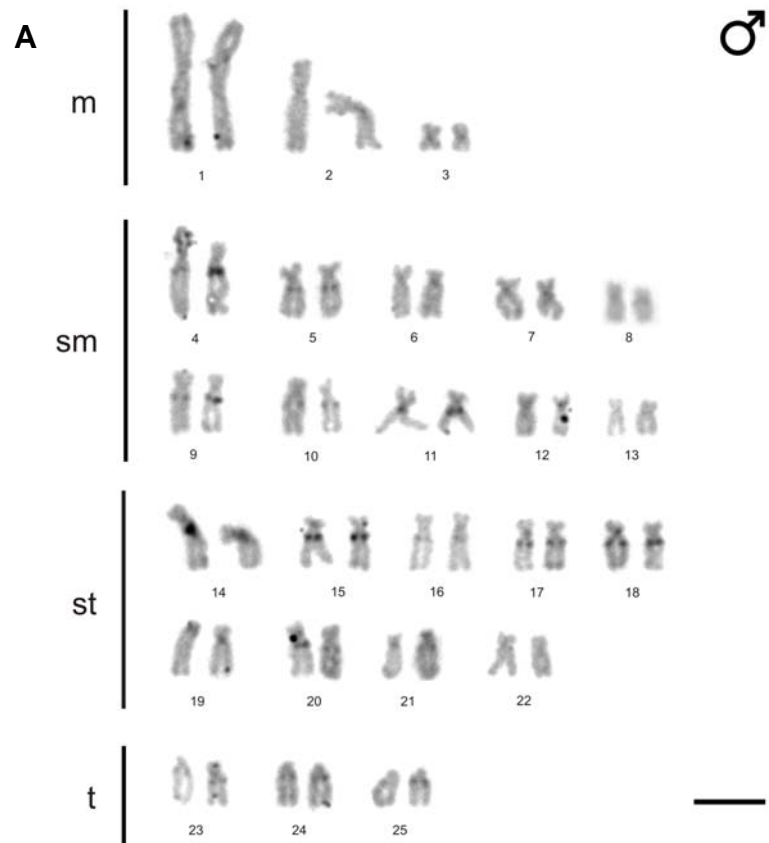


Fig. 13 – Karyotypic C Bands: a) São João River. Bar indicates 10 μ m.

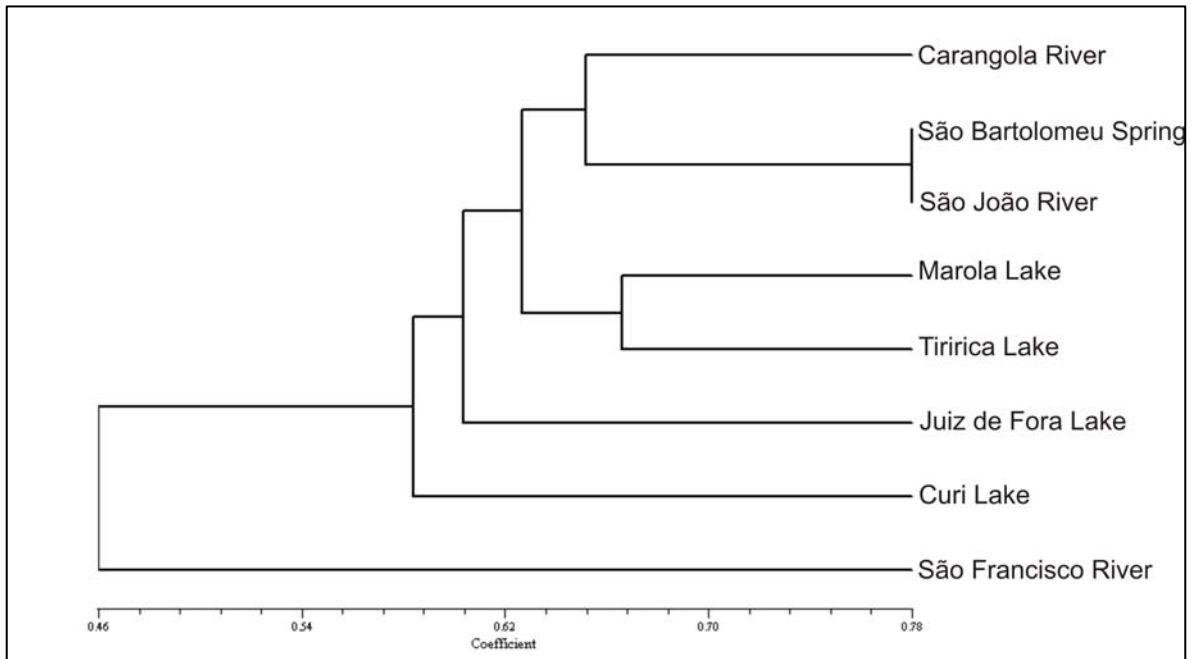


Fig. 14 – C-banding patterns-based phenogram of seven populations of *Astyanax bimaculatus*, compared with a population of *A. lacustris* from the São Francisco River.

4 – Discussion

All analyzed populations shared the same diploid number, NOR number and position and karyotypic formulae. This karyotypical character stability stands in sharp contrast with reports on cytogenetic studies carried on populations *A. altiparanae* Garutti & Britski, 2000, another member of the *A. bimaculatus* species complex in the Upper Paraná. In this basin, the first population studied cytogenetically was sampled in Meia-Ponte River, in the Paranaíba Basin (Jin & Toledo, 1975); these authors reported a chromosome formula of 26sm+24t. Morelli *et al.* (1983) reported two cytotypes for the Mogi-Guaçu River and another from the Juquiá River, an eastern coastal basin. Although these authors

mentioned different chromosome formulae, they reported difficulties in assessing identification of all chromosomes classes and concluded that geographic differences were “non significant”. Paganelli’s (1990) study was the first to indicate unambiguous karyotypic differences among populations of this species complex. She studied populations from five basins and obtained a stable chromosome formula of $6m+26sm+10st+6t$ for *A. bimaculatus* (valid as *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)) from the São Francisco basin and for *A. bimaculatus* (valid as *Astyanax asuncionensis* Géry, 1972) from the Paraguai basin. The same chromosome formula was indicated for the Trairi River, in northeastern Brazil and even for the Doce basin. In the Upper Paraná basin, Paganelli also reported a second cytotype for the Mogi Guaçu River, consisting of $6m+24sm+12st+8t$. In a more southerly Upper Paraná tributary, the Claro River, Pacheco *et al.* (2001) indicated three cytotypes of *A. altiparanae* which differed in their numbers of submetacentrics and telocentrics (cytotype A: $10m+26sm+4st+10t$; cytotype B: $10m+24sm+4st+12t$, and cytotype C: $10m+22sm+4st+14t$). Fernandes & Martins-Santos (2004) indicated that an *A. altiparanae* population from Índios River differed from a Paraná River population in their chromosome formulae ($6m+30sm+4st+10t$ and $6m+26sm+6st+12t$ respectively). Finally, Domingues *et al.* (2007) compared two populations from the Upper Paraná (Tibagi River) and the Lower Paraná (Iguaçu River) and also observed differences between them ($6m+28sm+8st+8t$ and $6m+30sm+8st+6t$ respectively).

In the karyotypically stable $6m+26sm+10st+6t$ populations (including one of the Upper Paraná populations), Paganelli (1990) also reported NORs restricted to

one pair of subtelocentrics; nevertheless, in most other Upper Paraná populations, levels of NOR variation are much higher (Table 2)

Table 2. Variation of NOR among populations of the *A. bimaculatus* complex.

| Locale | Basin | location of one pair of NORs | (number) and location of multiple NORs | References |
|----------------------------|---------------|------------------------------|--|-----------------------------------|
| Mogi-Guaçu River | Upper Paraná | subtelocentrics | | Paganelli (1990) |
| São Francisco River | São Francisco | subtelocentrics | | Paganelli (1990) |
| Paraguai River | Paraguai | subtelocentrics | | Paganelli (1990) |
| Doce River | Doce | subtelocentrics | | Paganelli (1990) |
| Claro River | Upper Paraná | | (1-4) submetacentrics, subtelocentrics, telocentrics | Pacheco <i>et al.</i> (2001) |
| Índios River | Upper Paraná | | (1-10) metacentrics, submetacentrics, telocentrics | Fernandes & Martins-Santos (2004) |
| Paraná River | Upper Paraná | telocentrics | | Fernandes & Martins-Santos (2004) |
| Tibagi River | Upper Paraná | | (1-4) submetacentrics | Domingues <i>et al.</i> (2007) |
| Iguaçu River | Lower Paraná | submetacentrics | | Domingues <i>et al.</i> (2007) |
| Rio Mogi-Guaçu | Upper Paraná | | (1-5) subtelocentrics | Morelli <i>et al.</i> (1983) |

Besides methodological problems such as varying levels of chromosomal resolution, it is obvious that the Upper Paraná *A. altiparanae* populations are characterized by much higher levels of karyotypical differentiation and NOR variation than the ones observed in the São Francisco *A. lacustris* and coastal representatives of the *A. bimaculatus* species complex. One pair of NORs is likely to represent a primitive character state and therefore its occurrence in Doce, Paraíba do Sul and Pardo coastal populations should not be considered as a phylogenetically informative character for understanding the systematics of the species complex. However, the complex levels of NOR variation in the Upper Paraná basin may result from the same processes of population vicariance and stream capture discussed below.

The most informative variation among studied populations was on heterochromatic blocks, and our results are the first to indicate that alterations of heterochromatin occur in a 10,000 year time window. Among population differentiation may be explained by selective or neutral processes. Selective pressure may be due to the possible action of heterochromatin as a defensive shield of vital genomic regions against external disruptive factors, as a facilitator of interactions between homolog chromosomes during meiosis (Dernburg *et al.*, 1996), and/or as a fertility barrier protecting ribosomal cistrons of mutations and permutations (Yunis & Yasmineh, 1971; Sumner, 2003). However, lack of geographic correlation shown in the phenogram suggests that heterochromatin addition and/or reduction have occurred following a random pattern and much of it may be homoplastic. One interesting characteristic of the distribution of heterochromatin in the analyzed populations is their interstitial location, near to the centromeric region, suggesting a equilocal distribution of these sites (John, 1988). This pattern is more evident in the São João River population. Interstitial heterochromatin distribution has also been observed in other fish species such as *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 1999), *Hoplosternum littorale* (Pazza *et al.*, 2005) and in *Astyanax altiparanae* (Daniel-Silva & Almeida Toledo, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007). It has been suggested that the spatial disposition of the chromosomes during the initial phases of meiosis promotes the physical contact between equilocal heterochromatic regions of the homologous and non-homologous chromosomes, acting as a homogenization factor of the satellite DNA at this location (Schweizer & Loidl, 1987). This

hypothesis could explain the pattern found in *A. scabripinnis* populations where a satellite DNA is distributed in every distal heterochromatin but not in the proximal ones (Mantovani *et al.*, 2000), what was also observed in others *Astyanax* species (Kavalco *et al.*, 2007). The occurrence of the interstitial heterochromatin in another *Astyanax* closely related species suggested that this character state is a plesiomorphy for at least some specie of this genus. However, in *A. scabripinnis* these blocks are more frequently observed in one-armed chromosomes whereas in *A. bimaculatus* they occur in several biarmed chromosomes.

Intra-population polymorphisms involving C-banding patterns have also been reported in an Upper Paraná population of *A. scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2000) and they may be rather common in *Astyanax* species. In the Doce Basin, molecular populational data (Paiva *et al.*, 2006) suggest that there is only one species of *A. bimaculatus* in this drainage and therefore addition and reduction of heterochromatic blocks are considered as within-species variation. This same trend has been observed in populations of trahiras *H. malabaricus* inhabiting this lake system (Jacobina, 2008). Considering our data in the Doce River Basin, we suggest that 10,000 years of vicariance have not resulted in major alterations of chromosome structure that could be interpreted as a speciation process. Karyotypic stability seems to characterize other species within this species complex, such as the São Francisco River *Astyanax lacustris*. Considering all available data, we suggest that major geomorphologic processes have been responsible for the differentiation of *A. bimaculatus* and that coastal lineages of this species complex are characterized by plesiomorphic chromosomal formulae and

NOR numbers, while heterochromatic variation was not consistent with Quaternary chromosomal speciation processes.

In *A. altiparanae*, high levels of cytogenetic variation involving chromosome formulae and NOR number and position may represent the existence of more than one evolutionary lineage, or even the admixture of lineages, due to large scale geologic processes and/or human-mediated dispersal involving faunal exchanges among tributaries of the Upper Paraná or even between the Upper Paraná and coastal basins. These highly complex processes involve the evolution of the Upper Paraná, of the coastal basins and interchanges between these regions.

Beurlen (1970) indicates that current drainage configuration is a rather recent feature in South American hydrology. The Paraná basin is intra-cratonic and includes very old components of the continental crust (Fúlfaro *et al.*, 1982). During the Tertiary, and following depression of the foreland basin in the Pampas and Chaco, the Paraná basin tilted toward the west, also causing an elevation on the oriental slope of the Serra do Mar (Beurlen, 1970). In the earliest Tertiary, the upper course of the Paraná and its tributaries flew northwards to the São Francisco and Tocantins basins, turning to a southern direction due to the development of a transversal updoming during the Tertiary.

On the other hand, the palaeohidrology of the coastal basins started when South America separated from Africa in the Late Cretaceous (Ribeiro, 2006). Traditionally, the distribution of coastal fish faunas has been ascribed to the effects of eustatic levels (e.g. Weitzman & Menezes, 1988); in his review, however, Ribeiro (2006) demonstrates a much more complex (and older) scenario involving

megadome uplifts, rifting, vertical movements between rifted blocks and the erosive retreat of the South American eastern margin. Considering this complex geomorphological scenario, we hypothesize that high levels of karyotypic variability in the Upper Paraná region may result from secondary contact of coastal of *A. bimaculatus* and continental *A. altiparanae* populations, corresponding to the latest geological events (Ribeiro, 2006). Faunal exchanges between the coastal and the Paraná basins seem to have affected much of southeastern Brazil. They explain fish community composition studies in the coastal Itatinga River (Serra *et al.*, 2007), which shares three species with a west-flowing Upper Paraná tributary, the Tietê River. Dergam *et al.* (1998) reported high molecular similarity between populations of *Hoplias malabaricus* from the Iguaçu River and coastal populations. Dergam *et al.* (2002) also indicate for the erythrinid fish *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) the existence of closely related haplotypes between the Doce and Upper Paraná populations which they assigned to Tertiary contact events between these two drainages. The existence of Quaternary active faults in many regions may have allowed for recent faunal exchange between the coastal and continental basins (Saadi, 1993). In southeastern Brazil these events occurred in the Upper Tietê River and in the headwaters of coastal rivers such as Ribeira do Iguape. Langeani (1989) was the first to test the hypothesis that coastal rivers shared species with the Tietê basin, including *Hollandichthys multifasciatus*, *Pseudocorynopoma heterandria*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon reticulatus*, and *Gymnotus pantherinus* (Langeani, 1989; Quevedo & Reis, 2002). In the Upper Iguaçu River, *Mimagoniates microlepis* (Weitzman *et al.*, 1988) is also

shared with coastal drainages. More recently, Ingenito *et al.* (2004) added *Hyphessobrycon griemi*, *H. bifasciatus*, e *H. reticulatus* which overlap the Iguaçu and coastal rivers distribution. Dergam *et al.* (1998) also found high levels of molecular similarity between *Hoplias malabaricus* populations from the Iguaçu and coastal rivers. Up north, Vari & Harold (2001) indicate that *Piabina argentea* occurs in the Upper Paraná, the São Francisco and other coastal drainages such as the Itapicurú, Paraíba do Sul and the Itapemirim rivers.

Our data indicate high karyotypical stability in coastal populations of the *A. bimaculatus* complex and on *A. lacustris* from the São Francisco. In the Doce Basin, it is evident that Late Quaternary vicariance has promoted only heterochromatin rearrangements at the populational levels.

5 - References

- Artoni, R. F. & L. A. C. Bertollo. 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica** v. 106 p. 209-214.
- Bertollo, L. A. C., G. G. Born, J. A. Dergam, A. S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, Holanda, v. 8, n. 7, p. 603-613.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, 1 (2): 103-120
- Beurlen, K. 1970. **Geologie von Brasilien**. Gebrüder Borntraeger. p. 444.

- Brassescio, M. S., M. C. Pastori, H. A. Roncati & A. S. Fenocchio. 2004. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, 3(2): 293-301.
- Daniel-Silva, M. de F. Z. & L. F. Almeida-Toledo. 2001. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characiformes, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, p. 209-215.
- Daniel-Silva, M. F. Z. 1996. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 176p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, SP.
- Dergam, J. A., S. R. Paiva, C. E. Schaeffer, A. L. Godinho & F. Vieira. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto - SP, v. 25, n. 4, p. 379-387.
- Dergam, J. A., H. I. Suzuki, O. A. Shibatta, L. F. Duboc, H. F. Júlio Jr., L. Giuliano-Caetano & W. C. I. V. Black. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers. **Genetics and Molecular Biology**, 21: 493-496.
- Dernburg, A. F., J. W. Sedat & J. S. Hawley. 1996. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. **Cell** 86: 135-146.
- Diniz, D. & L. A. C. Bertollo. 2006. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 453-458.
- Domingues, M. S., M. R. Vicari, V. Abilhoa, J. P. Wamser, M. M. Cestari, L. A. C. Bertollo, M. C. Almeida & R. F. Artoni. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, 5(1): 37-44.
- Eigenmann, C.H. 1927. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 311-428.
- Eigenmann, C.H. 1921. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 209-310.

- Eigenmann, C.H. 1918. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 103-208.
- Eigenmann, C. H. 1912. **The American Characidae**. Mem. Mus. Comp. Zool. 43: 252-254.
- Fernandes, C. A. & I. C. Martins-Santos. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141: 328-332.
- Fúlfaro, V. J., A. R. Saadi, M. V. Santos & R. B. Vianna. 1982. Compartimentação e evolução tectônica da bacia do Paraná. **Revista Brasileira de Geociências**, 12 (4): 590-611.
- Galetti Jr., P. M., F. Foresti, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae fish on the basis of the Nucleolar Organizing Regions. **Caryologia** (Firenze), v. 37, n. 4, p. 401-406.
- Garutti, V. & H. A. Britski. 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. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia – PUCRS**. Série Zoologia. Porto Alegre, v.13,p. 66-88.
- Giuliano-Caetano, L. & L. A. C. Bertollo. 1988. Karyotype Variability In: *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, n. 2, p. 299-306.
- Howell, W.M. & D. A. Black. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014 – 1015.
- Ingenito, L. F. S., L. F. Duboc & V. Abilhoa. 2004. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR, 7(1): 23–36.
- Jacobina, U. P. 2008. **Variação cariotípica em populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) em lagos do sudeste do Brasil**. 79p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG.
- Jin, S. M & V. Toledo. 1975. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Ciência e Cultura**, 27, 1122-1124.

- John, B. 1988. The biology of heterochromatin. Verma, R. S. (ed) Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects. **Cambridge University Press**, New York, pp 1-147.
- Jorge, L. C., A. L. Bottegoni, F. Barros & S. Sánchez. 2004. **Caracterización cromosômica de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) de la región nordeste argentina**. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Universidad Nacional Del Nordeste. Resumo: V-018.
- Jorge, L. C. & O. Moreira-Filho. 2000. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces: Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genética**, 109: 267-273.
- Justi, A. J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. 83p. São Carlos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2007. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 329-335.
- Langeani, F. 1989. **Ictiofauna do alto curso do rio Tietê (SP): taxonomia**. Unpublished M.Sc. Thesis. Universidade de São Paulo. São Paulo, 231p
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.
- Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. P. da Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Cassati, V. A. Bertaco, C. Moreira, & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. p.106. In: Reis, R., Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre – RS.
- Maistro E.L., C. Oliveira & F. Foresti. 2000. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae, Tetragonopteridae). **Genetics and Molecular Biology**. 2:365-369. 178.
- Mantovani, M., L. D. S. Abel, C. A. Mestriener & O. Moreira-Filho. 2000. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding Karyotypic evolution. **Genetica**. v.109: 161-168.

- Melo, F. A. G. de. 2000. **A Serra dos órgãos como barreira biogeográfica para peixes dos gêneros *Astyanax* Baird e Girard (1854) e *Deuterodon Eigenmann* (1907) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Pós – Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia). 139p.
- Moreira-Filho, O. & L. A. C. Bertollo. 1991. *Astyanax Scabripinnis* (Pisces, Characidae): A Species Complex. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto - SP, v. 14, n. 2, p. 331-357.
- Moreira-Filho, O. 1983. **Estudos na família Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco, SP: Aspectos citogenéticos e considerações correlatas**. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos – SP.
- Morelli, S., L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae)ii. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia** (Firenze), v. 36, n. 3, p. 245-250.
- Navarrete, M. C. & H.F. Júlio Jr. 1997. Cytogenetic analysis of four *Curimatids* from the Paraguay basin (Pisces: Characiformes: Curimatidae). **Cytologia**, Japão, v. 62, p. 241-247.
- Pacheco, R.B., L. Giuliano-Caetano & A.L. Dias. 2001. Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, 5: 109-114.
- Paganelli, H. H. 1990. **Diversidade cromossômico no gênero *Astyanax*, com especial referência a *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas**. 115p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Paiva, S. R., J. A Dergam & F. Machado. 2006. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, 560:393–404.
- Pauls, E. & L. A. C. Bertollo. 1990. Distribution of a supernumerary chromosomes system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica** 81: 117-123.
- Pauls, E. & L. A. C. Bertollo. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36 (4): 307-314.

- Pazza, R., K. F. Kavalco & L. A. C. Bertollo. 2006. Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 313-319.
- Pazza, R., K. F. Kavalco, L. F. Almeida-Toledo & L. A. C. Bertollo. 2005. *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. **Caryologia**, v. 58, n. 4, p. 339-344.
- Quevedo, R. & R. E. Reis. 2002. Pogonopoma obscurum: a new species of loricariid catfish (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil, with comments on the genus Pogonopoma. **Copeia**, 2002: 402-410.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 225-246.
- Saadi, A. (1993) Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretações preliminares. **Geonomos**, 1, 1-15.
- Schmid, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, Berlin, 87: 327-344.
- Schweizer, D. & J. Loidl. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosomes Today** v. 9, p. 61-74.
- Serra, J. P., F. R. Carvalho & F. Langeani. 2007. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. **Biota Neotropica**, v. 7 (1):131-136.
- Sumner, A. T. 2003. **Chromosomes Organization and Function**. Blackwell Publishing. USA.
- Vale, J. D. & I. C. Martins-Santos. 1999. Análise citogenética em duas espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae) da bacia do Paranapanema, pp.95. In: **Congresso Nacional de Genética**, 45. Gramados, RS, Genetic and Molecular Biology.
- Vari, R. P. & A. S. Harold. 2001. Phylogenetic study of the neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the cis-andean species. **Smithsonian Contributions to Zoology**, 613: 1-239.

- Vari, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology** 378: 60 p.
- Yunis, J. J. & W. G. Yasmineh. 1971. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function. **Science**. v. 174. no. 4015, pp. 1200 – 1209.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. & Weitzman, M.J. 1988. Phylogenetic biogeography of glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns (P.E. Vanzolini & W.R. Heyer, eds.)**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 379-427.

3 – CONCLUSÕES GERAIS

1 - A estabilidade cariotípica das populações costeiras de *Astyanax bimaculatus* assemelha-se ao indicado para *Astyanax lacustris* da bacia do rio São Francisco e contrasta com os dados das populações de *Astyanax altiparanae* do Paraná Superior.

2 – O padrão partilhado pelas populações costeiras e a do São Francisco deve ser considerado um caráter plesiomórfico no complexo *A. bimaculatus*.

3 – A alta variabilidade de *A. altiparanae* pode ter ocorrido por um contato secundário entre as populações do Alto Paraná e as populações das bacias costeiras.

4 – A variação de blocos heterocromáticos entre as populações isoladas desde o Quaternário é consistente com variação intra-específica.

4 – Anexos.

| | | | | | | | |
|--------|--|--|--|--|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Par 22 | Marcação intersticial, forte, braço longo. | Marcação telomérica, forte, braço curto. | Marcação telomérica, forte, braço curto. | Marcação telomérica, forte, braço curto. | Marcação centromérica, fraca. | Não evidenciou marcação. | Não evidenciou marcação. |
| Par 23 | Marcação intersticial, forte, braço longo. | Marcação centromérica, forte | Marcação centromérica, forte. | Marcação centromérica, forte. | Marcação centromérica, fraca | Marcação centromérica, fraca. | Marcação intersticial, fraca, braço longo. |
| Par 24 | Marcação intersticial, forte, braço longo. | Não evidenciou marcação. | Não evidenciou marcação. | Marcação intersticial, fraca, braço longo. | Marcação centromérica, fraca | Não evidenciou marcação. | Marcação intersticial, fraca, braço longo. |
| Par 25 | Não evidenciou marcação. | Marcação telomérica, fraca. | Não evidenciou marcação. | Marcação intersticial, fraca, braço longo. | Não evidenciou marcação. | Não evidenciou marcação. | Marcação intersticial, fraca, braço longo. |

Anexo 2 – Matriz numérica utilizada para a construção do fenograma.

NUMBER OF INDIVIDUALS: 8

TITLE: *Astyanax bimaculatus costeiros* (IX-03-95)

NUMBER OF FRAGMENTS: 150

(12(12(1X,A5),/),6(1X,A5))

p1m1 p1t1 p1c1 p1i1 p1f1 p1p1 p2m2 p2t2 p2c2 p2i2 p2f2 p2p2
p3m3 p3t3 p3c3 p3i3 p3f3 p3p3 p4m4 p4t4 p4c4 p4i4 p4f4 p4p4
p5m5 p5t5 p5c5 p5i5 p5f5 p5p5 p6m6 p6t6 p6c6 p6i6 p6f6 p6p6
p7m7 p7t7 p7c7 p7i7 p7f7 p7p7 p8m8 p8t8 p8c8 p8i8 p8f8 p8p8
p9m9 p9t9 p9c9 p9i9 p9f9 p9p9 p10m1 p10t1 p10c1 p10i1 p10f1 p10p1
p11m1 p11t1 p11c1 p11i1 p11f1 p11p1 p12m1 p12t1 p12c1 p12i1 p12f1 p12p1
p13m1 p13t1 p13c1 p13i1 p13f1 p13p1 p14m1 p14t1 p14c1 p14i1 p14f1 p14p1
p15m1 p15t1 p15c1 p15i1 p15f1 p15p1 p16m1 p16t1 p16c1 p16i1 p16f1 p16p1
p17m1 p17t1 p17c1 p17i1 p17f1 p17p1 p18m1 p18t1 p18c1 p18i1 p18f1 p18p1
p19m1 p19t1 p19c1 p19i1 p19f1 p19p1 p20m2 p20t2 p20c2 p20i2 p20f2 p20p2
p21m2 p21t2 p21c2 p21i2 p21f2 p21p2 p22m2 p22t2 p22c2 p22i2 p22f2 p22p2
p23m2 p23t2 p23c2 p23i2 p23f2 p23p2 p24m2 p24t2 p24c2 p24i2 p24f2 p24p2
p25m2 p25t2 p25c2 p25i2 p25f2 p25p2

(A5,3X,150A1)

Saoba

110000101000000000101000000000000000100110000000100110100110000
000101000000000100100100100110000100100000000100110100100100110
100110100110100110000000

Curio

11000011000000000000000000110000110001110000000000100100100100000
000101000100100110011100100100110110001101000100110101000100100
110011101010000000110000

