

NATÁLIA COUTINHO SANCHES

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR DE *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842) E
Deuterodon pedri EIGENMANN, 1908 (TELEOSTEI, CHARACIDAE) DO ALTO RIO
SANTO ANTÔNIO, MINAS GERAIS, BRASIL

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

S211e
2014 Sanches, Natália Coutinho, 1984-
Estudo citogenético e molecular de *Astyanax scabripinnis*
(JENYNS, 1842) e *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1908
(TELEOSTEI, CHARACIDAE) do Alto Rio Santo Antônio,
Minas Gerais, Brasil / Natália Coutinho Sanches. – Viçosa, MG,
2014.

vi, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Peixe - Citologia. 2. Characiformes. 3. *Astyanax
scabripinnis*. 4. *Deuterodon pedri*. 5. Evolução.
6. Biodiversidade. 7. Sistema ZZ/ZW. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de
Pós-graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

NATÁLIA COUTINHO SANCHES

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR DE *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842) E *Deuterodon pedri* EIGENMANN, 1908 (TELEOSTEI, CHARACIDAE) DO ALTO RIO SANTO ANTÔNIO, MINAS GERAIS, BRASIL.

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2014.

Profa. Denilce Meneses Lopes

Prof. Pedro S. R. Romano

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

Dedico esta dissertação à Kelly, a cachorrinha enviada por Deus para minha vida, que sempre foi um exemplo de amor, dedicação, paciência e união. Que cada palavra escrita aqui compense cada segundo que passei longe de você.

Fique com Deus, minha vida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa que me possibilitou fazer o mestrado.

À banca, pelo tempo disponibilizado e pelas contribuições à dissertação.

Aos professores Rubens Pazza e Karine Kavalco, pela abertura do laboratório para que eu tentasse fazer o FISH.

Ao professor Marcelo Cioffi, pelo FISH do Deuterodon.

Aos marujos e agragados do Beagle, pelas opiniões sobre trabalho e pelas conversas pra dar uma discontraída. Agradeço, especialmente, à Ana Paula por ter me ajudado a tirar as primeiras fotos, e à Naty, por tudo: as idas ao campo, ajuda para processar meu material e contínuo apoio.

À dona Nazaré e família, por abrirem as portas de sua casa para que eu pudesse coletar, além de atenção e carinho.

Ao capitão, Jorge, por ter aberto as portas do Beagle, pelo direcionamento, por me ensinar os caminhos complicados dos caracídeos.

Aos peixinhos que foram sacrificados para que este trabalho pudesse ser feito.

Aos meus amigos, por toda felicidade nesses anos de Viçosa. Todas as festas, barzinhos, buraquinhos, gordices, conversas à toa, conversas sérias, risos e choros. Sei que é clichê, mas Viçosa nunca seria a mesma sem vocês! E não vai ter nomes pra não cometer injustiça com ninguém rs

Ao meu namorado, Renan, que esteve sempre ao meu lado e nunca reclamou quando eu não encontrava com ele para fazer coisas da dissertação. Que me deu todo apoio para conseguir superar tudo o que aconteceu nesse final.

Aos meus filhotes, cuja companhia foi fundamental nos momentos de angústia. Kellynha, só te peço perdão, que o colo de Deus te recompense por cada dia que fiquei longe de você.

Ao meu pai e à minha mãe, que mesmo não entendendo nada do que eu trabalhava nem pra que servia, sempre me deram todo apoio e amor. Sem vocês não conseguiria chegar até aqui.

E à Deus, que abriu meus caminhos e me deu forças para nunca desistir e fazer sempre o meu melhor, não importando as adversidades e as dificuldades!

Resumo

SANCHES, Natália Coutinho, M.SC., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Estudo citogenético e molecular de *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842) E *Deuterodon pedri* EIGENMANN, 1908 (TELEOSTEI, CHARACIDAE) do alto rio Santo Antônio, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Os Characiformes compõem uma das maiores ordens de peixes, possuindo mais de 1.600 espécies na América do Sul, subdivididas em cerca de 16 famílias. A maioria das famílias dessa ordem possui evidências de monofilia, mas não há consenso sobre a monofilia de Characidae. Dentre as dezenas de espécies incertae sedis dessa família, estão *Astyanax scabripinnis* e *Deuterodon pedri*. O gênero *Astyanax* é bastante especioso e amplamente distribuído. Apesar de muitas populações já terem estudos citogenéticos, apenas 18 espécies possuem cariótipos descritos, e até agora não verificou-se a existência de cromossomos sexuais. *A. scabripinnis* é uma espécie amplamente estudada, caracterizada por grandes divergências morfológicas e citogenéticas. A maioria dos estudos dessa espécie ocorreu nas bacias do Paraná e do São Francisco. *Deuterodon* possui poucas espécies, e as espécies presentes no Sul do Brasil têm sido propostas como membros de um clado monofilético. Poucos trabalhos foram feitos com *D. pedri*, espécie endêmica do rio Santo Antônio, e sua filogenia -assim como os de muitos Characidae - é bastante controversa. O rio Santo Antônio abriga diversas espécies de peixes, incluindo populações simpátricas de *A. scabripinnis* e *D. pedri*. As técnicas citogenéticas (coloração convencional, Ag-NOR, banda C e FISH) evidenciaram a existência de cromossomos sexuais em *A. scabripinnis* - primeiro caso no gênero, e os dados moleculares corroboraram a definição dessa população como uma unidade evolucionária distinta. Os resultados das técnicas citogenéticas (coloração convencional, Ag-NOR, banda C e FISH) realizadas em *D. pedri* foram similares aos encontrados em *D. stigmaturus*. Os cladogramas gerados a partir dos genes COI e RAG2 sugerem que *D. pedri* está relacionado com *Deuterodon singularis* e com outras espécies do mesmo gênero, assim como com outros gêneros de distribuição costeira. Ambos os resultados moleculares podem ser explicados por processos de variações eustáticas do mar, assim como por capturas de cabeceira entre as drenagens costeiras com drenagens continentais.

Abstract

SANCHES, Natália Coutinho, M.SC., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Estudo citogenético e molecular de *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842) E *Deuterodon pedri* EIGENMANN, 1908 (TELEOSTEI, CHARACIDAE) do alto rio Santo Antônio, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Characiformes comprise one of the largest Orders of fish , with more than 1,600 species in South America, divided into about 16 families. Most families of this Order has evidence of monophyly , but there is no consensus on the monophyly of Characidae. Among the dozens of incertae sedis species of this family are *Astyanax scabripinnis* and *Deuterodon pedri*. The genus *Astyanax* is quite specious and widely distributed. Although many populations have cytogenetic studies, only 18 species have described karyotypes, and so no sex chromosomes have been detected. *A. scabripinnis* is a widely studied species, characterized by large morphological and cytogenetic divergences . Most studies of this kind occurred in Paraná and São Francisco basins. *Deuterodon* has few species , and the species present in southern Brazil have been proposed as members of a monophyletic clade . Few studies were done with *D. pedri*, an endemic species of the river Santo Antônio, and phylogeny, as well as many Characidae - is quite controversial. The Santo Antônio River harbours several species of fish, including sympatric populations of *A. scabripinnis* and *D. pedri*. Cytogenetic techniques (conventional staining, Ag-NOR, C-band and FISH) revealed the existence of sex chromosomes in *A. scabripinnis* - the first case of its kind, and molecular data corroborated the definition of this population as a distinct evolutionary unit. The results of cytogenetic techniques (conventional staining, Ag-NOR, C-band and FISH) performed on *D. pedri* were similar to those found in *D. stigmaturus*. Cladograms generated from the COI and RAG2 genes suggests that *D. pedri* is associated with *Deuterodon singularis* and other species of the same genus, as well as other genus of coastal distribution. Both molecular results can be explained by processes of eustatic variations of the sea as well as by catch bedside between coastal drainages with continental drainages .

Sumário

1. Introdução geral	2
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. Capítulo 1: First record of sex chromosomes in the genus <i>Astyanax</i> Baird and Girard, 1854 (Teleostei, Characidae)	7
4. Capítulo 2: Cytogenetic and molecular characterization of <i>Deuterodon pedri</i> Eigenmann, 1907 (Teleostei: Characidae) suggest the existence of an ancient coastal group	30
5. Conclusão geral	47
Anexos	
Appendix I.....	48
Appendix II.....	51
Anexo III.....	52
Anexo IV.....	52

1. Introdução geral

A diversidade de comunidades, tanto de plantas quanto de animais, é muito maior em baixas latitudes quando comparada a comunidades de altas latitudes, o que se reflete também entre as espécies de peixes. Este conceito parece válido tanto para peixes tropicais de água doce quanto de água marinha (Lowe-Mcconell, 1987).

Quando comparado com os demais grupos de vertebrados, muito pouco ainda se conhece sobre a sistemática, evolução, ecologia, fisiologia e genética dos peixes. Isto pode, em parte, ser explicado pelo seu habitat, que proporciona uma dificuldade a mais para seu estudo.

O rio Santo Antônio é um dos principais afluentes do rio Doce, desaguando nele no município de Naque. A bacia destaca-se pela riqueza de seus recursos naturais representados pela grande diversidade de sua fauna e flora, pelos seus recursos hídricos e também por seu grande potencial de geração de energia elétrica (citação online <http://www.igam.mg.gov.br>). Segundo Vieira (2009), a bacia do rio Santo Antônio abriga assembleias de peixes distintas, as quais se distribuem de forma diferenciada nos ambientes (córregos, rios, reservatórios). Em seus estudos, foram encontrados cinco ordens, 19 famílias e 71 espécies, sendo três endêmicas do rio Doce, como *Deuterodon pedri*. Vieira registra a ocorrência de cinco espécies de *Astyanax*: *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax fasciatus*, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax taeniatus* e *Astyanax* sp..

Deuterodon foi proposto originalmente por Eigenmann (1907), com base em um único exemplar, descrito como *Deuterodon iguape*, sendo que a principal diferença entre este gênero e *Astyanax* é a forma como os dentes do dentário decrescem, gradualmente e abrupto, respectivamente. Em 2002, Lucena & Lucena propuseram monofiletismo para *Deuterodon*, porém consideram três espécies como não relacionadas a *Deuterodon*, dentre elas, *D. pedri*. Pereira (2010), expande *Deuterodon* para incluir novamente *D. pedri* e *D. parahybae*.

O gênero *Astyanax* abrange peixes conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (Géry, 1977). Os lambaris são peixes não-migratórios, com fecundação externa e ausência de cuidado parental (Vazzoller & Menezes, 1992). Esse gênero compreende mais de 107 espécies e é, juntamente a *Hyphesobrycon*, o maior e mais diverso gênero dos caraciformes (Eschmeyer, 2007; Lima et al., 2003).

A. scabripinnis é caracterizada como “complexo de espécies”, exibindo grandes variedades morfológica e cariotípica (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). São peixes pequenos, que habitam a cabeceira de afluentes (Caramaschi, 1986). Dessa forma, os canais de grandes rios atuam como barreiras para populações de afluentes distintos, seja pela competição com outras espécies ou por diferentes predadores, restringindo o fluxo gênico e reforçando a condição alopátrica entre eles (Kavalco & Moreira-Filho, 2003).

Cromossomos B foram detectados em diferentes populações de *A. scabripinnis*, normalmente caracterizados como macro metacêntricos, com tamanho semelhante ao do primeiro par do cariótipo (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992; Néó et al., 2000). Algumas populações apresentam cromossomos B muito pequenos, correspondendo a microcromossomos (Rocon-Stange & Almeida-Toledo, 1993; Mizough & Martins-Santos, 1997). A bacia do rio Santo Antônio, Minas Gerais, Brasil, abriga assembléias de peixes distintas, como o registro de cinco espécies de *Astyanax*, incluindo, *A. scabripinnis* (Vieira, 2009).

Diversos mecanismos podem definir o sexo de um organismo, como determinação sexual haplo-diploide (Hasselmann et. al, 2008), por temperatura (Ospina-Alvarez & Piferrer, 2008) e genética (Idnurm et. al, 2008). A determinação sexual genética é mais estável do que estímulos ambientais, portanto, é mais provável de originar cromossomos sexuais.

Os cromossomos sexuais derivaram-se independentemente muitas vezes, em animais e plantas, de cromossomos autossomais (Bull, 1983; Charlesworth & Charlesworth, 2000), diferindo no conteúdo gênico e, muitas vezes, na morfologia. A seleção sexual antagonista, que provê vantagem reprodutiva a um sexo, foi proposta como a causa principal da evolução dos cromossomos sexuais (Rice, 1987).

Peixes apresentam sistemas sexuais simples e múltiplos, com heterogametia masculina ou feminina (Almeida-Toledo & Foresti, 2001). Apesar disso, a maioria das espécies desses organismos não apresenta cromossomos sexuais diferenciados (Venere et al., 2004). O sistema ZZ/ZW, comum em anfíbios (Busin et al., 2008), répteis (Modi & Crews, 2005) e pássaros (Kawai et. al, 2007), foi descrito em diversas famílias de peixes (Bertollo & Cavallaro, 1992; Matsuda et al., 1998; Ross et al., 2009; Noletto et al., 2009).

Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar citogenética e molecularmente indivíduos de *Deuterodon pedri* e de *Astyanax scabripinnis* da bacia do rio Santo Antônio coletados na região do município de Ferros, visando obter dados que possam auxiliar na determinação objetiva do grau de endemismo de *Astyanax scabripinnis* e *Deuterodon pedri*

desta drenagem, além da descrição do primeiro sistema de cromossomos sexuais encontrado em *Astyanax*.

Referências

- ALMEIDA TOLEDO, L. F., & FORESTI, F. (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111(1-3), 91-100.
- BERTOLLO, L.A.C. & CAVALLARO, Z.I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characid fish *Triportheus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60, 60-63.
- BULL, J. J. (1983). Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc..
- BUSIN, C. S., ANDRADE, G. V., BERTOLDO, J., DEL GRANDE, M. L., UETANABARO, M., & RECCO-PIMENTEL, S. M. (2008). Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*, 133(2), 119-127.
- CARAMASCHI, E.M.P. (1986). Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese (Doutorado), UFSCAR.
- CHARLESWORTH, B. & CHARLESWORTH, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355, 1563-1572.
- ESCHMEYER, W. N. (2013). Catalog of fishes. Available at <http://www.fishbase.org/references/FBRefSummary.php?ID=92887> (last accessed 30 August 2013). Updated internet version of 04 January 2013.
- GÉRY, J. (1977). *Characoids of the World*. 672p. Neptune City: TFH Publications.
- HASSELMANN, M., GEMPE, T., SCHIØTT, M., NUNES-SILVA, C. G., OTTE, M., & BEYE, M. (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454(7203), 519-522.
- IDNURM, A., WALTON, F. J., FLOYD, A., & HEITMAN, J. (2008). Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature*, 451(7175), 193-196.
- KAVALCO, K. F., & MOREIRA-FILHO, O. (2003). Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia*, 56(4), 453-461.
- KAWAI, A., NISHIDA-UMEHARA, C., ISHIJIMA, J., TSUDA, Y., OTA, H., & MATSUDA, Y. (2007). Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenetic and genome research*, 117(1-4), 92-102.
- LIMA, F. C. T., MALABARBA, L. R., BUCKUP, P. A., DA SILVA, J. P., VARI, R. P., HAROLD, A., BENINE, R., OYAKAWA, O. T., PAVANELLI, C. S., MENEZES, N. A., LUCENA, C. A. S., MALABARBA, M. C. S. L., LUCENA, Z. M. S., REIS, R. E., LANGEANI, F., CASATTI, L., BERTACO, V. A., MOREIRA, C., & LUCINDA, P. H. F. (2003). Genera incertae sedis in Characidae. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 106-169.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. (1987). *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press.

- MIZOGUCHI, S. M. H. N., & MARTINS-SANTOS, I. C. (1997). Macro-and Microchromosomes B in Females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas*, 127(3), 249-253.
- MATSUDA, M., MATSUDA, C., HAMAGUCHI, S., & SAKAIZUMI, M. (1998). Identification of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 82(3-4), 257-262.
- MODI, W. S., & CREWS, D. (2005). Sex chromosomes and sex determination in reptiles: commentary. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 660-665.
- MOREIRA-FILHO O. & BERTOLLO L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics*, 14, 331-357.
- NÉO, D. M., BERTOLLO, L. A. C., & MOREIRA FILHO, O. (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108(3), 211-215.
- NOLETO, R. B., AMORIM, A. P., VICARI, M. R., ARTONI, R. F., & CESTARI, M. M. (2009). An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in Characium fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of fish biology*, 75(2), 448-453.
- OSPINA-ALVAREZ, N., & PIFERRER, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One*, 3(7), e2837.
- PEREIRA, T. N. A. (2010) Filogenia das espécies de Deuterodon Eigenmann, 1907 (Characiformes: Characidae), um gênero de lambaris da Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado). UNESP.
- RICE, W. R. (1987). The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution*, 41(4), 911-914.
- ROSS, J. A., URTON, J. R., BOLAND, J., SHAPIRO, M. D., & PEICHEL, C. L. (2009). Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS genetics*, 5(2), e1000391.
- ROCON-STANGE, E. A. & ALMEIDA-TOLEDO L.F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 16, 601-615.
- SALVADOR, L. B., & MOREIRA-FILHO, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, 69, 50-56.
- VAZZOLER, A. E. A. M., & MENEZES, N. A. (1992). Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophys). *Revista Brasileira de Biologia*, 52(4), 627-640.
- VENERE, P. C., FERREIRA, I. A., MARTINS, C., & GALETTI JR, P. M. (2004). A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). *Genetica*, 121(1), 75-80.
- VIEIRA, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MG. BIOTA*, 2, 5-22.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar citogenética e molecularmente indivíduos de *Astyanax scabripinnis* e *Deuterodon pedri* da bacia do rio Santo Antônio, coletados na região do município de Ferros, Minas Gerais, visando obter dados que possam auxiliar estudos citotaxonômicos sobre o gênero, subsidiando melhor compreensão da filogenia de *Astyanax* e suas relações com *Deuterodon*.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o número e a morfologia dos cromossomos de espécimes *Astyanax scabripinnis* e *Deuterodon pedri*;
- Determinar a localização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nos cromossomos das duas espécies;
- Determinar os padrões de distribuição de heterocromatina (Banda C) nos cromossomos das duas espécies;
- Realizar hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) nos cariótipos;
- Obter sequências moleculares dos genes COI e RAG2 dos espécimes coletados.

Este artigo foi submetido à revista
Genetica (ISSN: 0016-6707) no
dia 03 de fevereiro de 2014.

3. Capítulo 1

First record of sex chromosomes in the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854

(Teleostei, Characidae)

N. Coutinho-Sanches¹, J. C. Zanuncio² and J. A. Dergam¹

¹Laboratório de Sistemática Molecular “Beagle”, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²BIOAGRO, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Abstract

The fish genus *Astyanax* represents one of the most successful taxa in the Neotropical region and is characterized by high levels of karyotypic diversity. The high degree of morphological and cytogenetic variation observed within and among the *Astyanax scabripinnis* populations have been interpreted as evidence of species complex. One population of *A. scabripinnis* from southeastern Brazil revealed a diploid number of $2n=50$, high variability of supernumerary chromosomes and karyotypic formulae characterizing the males and females. This involves a ZZ/ZW sex chromosome system, the first report for this genus. The W chromosome presents a nucleolar organizer region, accumulation of repetitive sequences and a unique pattern of heterochromatin. On reviewing the demographic and ecological characteristics of this species complex, it is proposed that this sex chromosome system was fixed because of the small population dynamics in the Santo Antônio River headwaters. This features this population as distinct evolutionary unit within this fish complex and highlights the biological relevance of the fish fauna of Santo Antônio River.

Keywords: B chromosomes; biodiversity; chromosome evolution; microsatellite; ZZ/ZW system.

Introduction

Order Characiformes includes one of the three major freshwater fish groups in the world, exceeding 1,600 species, found in Africa, south-western North America and Central and South America (Nelson 2006). Most Characiformes families reveal monophyly (Weitzman 1954; Roberts 1973, 1974; Vari 1979, 1995; Buckup 1993; Toledo-Piza 2000; Zanata and Vari 2005), although there is no consensus on this condition for Characidae (Javonillo et al. 2010; Oliveira et al. 2011). The genus *Astyanax* Baird and Girard 1854 included in this family, is composed of over 100 valid species (Eschmeyer 2013), with some of them being categorized under the phylogenetically unresolved “C clade” (Javonillo et al. 2010; Oliveira et al. 2011). This species range in distribution from the southern United States to northern Argentina, occurring from coastal streams to high altitudes (Eigenmann 1927).

Astyanax scabripinnis (Jenyns 1842) was described based on the material that Charles Darwin collected in Rio de Janeiro State, Brazil (Fig. 1). In 1927, Eigenmann considered that specimen samples of this fish from the coastal Paraíba do Sul and Doce rivers also fitted the original description, and extended it to include fish having 33-38 scales on the lateral line; 6 scales above and 5 scales below the lateral line; 17-23 anal fin rays; 2.66-3.26 depth; 3.2-4 times head length on standard body length and 2.75-3.2 times interorbital distance on head length. Using Eigenmann’s criteria, some populations from the basins of continental São Francisco and the Upper Paraná have also been identified as *A. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991).

Jim and Toledo (1975) were the first to perform cytogenetic studies on *Astyanax* species. Since then, 18 species of this genus have been karyotyped (Daniel-Silva and Almeida-Toledo 2001; Almeida-Toledo et al. 2002; Carvalho et al. 2002; Kavalco and Moreira-Filho 2003; Fernandes and Martins-Santos 2004; Gross et al. 2004; Kavalco and Almeida-Toledo 2007; Kavalco et al. 2007; Medrado et al. 2008; Kantek et al. 2008; Torres-Mariano and Morelli 2008; Kantek et al. 2009 ; Kavalco et al. 2009; Rosa et al. 2009; Kavalco et al. 2010; Martinez et al. 2012; da Silva et al. 2012), covering about 190 populations or nominal taxa. Cytogenetic studies revealed a high variation in the diploid number ($2n=36-50$) (Daniel-Silva and Almeida-Toledo 2001; Vicari et al. 2008b), supernumerary chromosomes that show variation in size, morphology and composition (Fernandes and Martins-Santos, 2005) as well as polymorphisms in the heterochromatin and

nucleolar organizer regions (Kantek et al. 2009) for the *Astyanax* species. However, sex chromosomes have not been reported for them.

The high degree of morphological and cytogenetic variation observed within and among the *A. scabripinnis* populations have been interpreted as evidence of species complex (Moreira-Filho and Bertollo 1991; Ferro et al. 2003; Mantovani et al. 2004). Population variations have been attributed to geographic isolation, with this species being associated with isolated headwater environments. Ecological barriers, such as large rivers may restrict the gene flow and due to competition with other species, can enhance allopatry (Kavalco & Moreira-Filho 2003).

Cytogenetic studies on *A. scabripinnis* have mostly been conducted in the basins of the Upper Paraná, São Francisco and others distant from the type-locality. Eigenmann included the Santo Antônio River Basin (SAR), part of the coastal Doce River Basin (Fig.1), within the *A. scabripinnis* distribution range. As the SAR supports five endangered fish species and a sizable portion of the fish diversity of the entire basin (Vieira 2009), it is accepted as one of the highest priority regions for conservation in the Minas Gerais State, Brazil (Drummond et al. 2005)

The objective of this study was to identify the karyotype of an *A. scabripinnis* population from the municipality of Ferros in the Santo Antônio River. To attain a more complete assessment of the taxonomic nature of this population, the cytogenetic data were complemented with a phylogenetic analysis of a 604 base pair fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI). The results were compared with the *A. scabripinnis* gene sequences as well as with those from other *Astyanax* spp. from other basins, available in the GenBank.

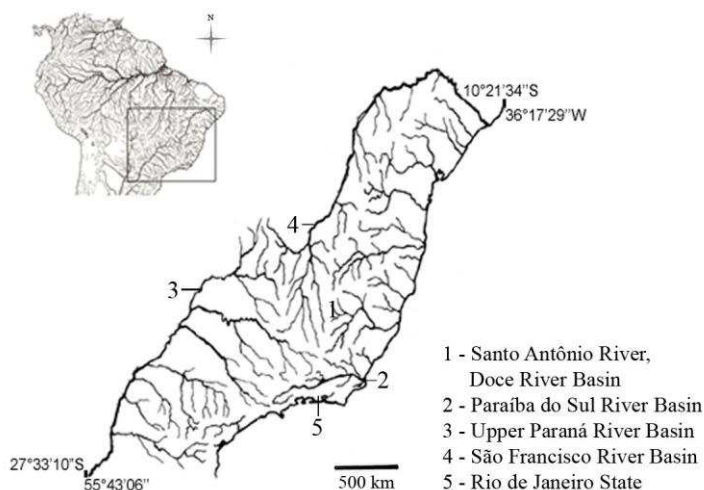


Fig. 1 Localities where *Astyanax scabripinnis* populations have been studied. 5: Local where specimens of *A. scabripinnis* of this study were collected, Santo Antônio River, Ferros City, Minas Gerais, Brazil. 6: probable type-locality

Materials and Methods

Twenty-nine *A. scabripinnis* specimens (25 females and four males) were collected in the Santo Antônio River in Minas Gerais State, Brazil (19°13'58S, 43°01'20W), and transported alive to the Laboratory of Molecular Systematics “Beagle” of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Voucher specimens were added to the scientific collection of the Museu de Zoologia João Moojen of UFV (MZUFV 4146 and MZUFV 4147). Prof. Jorge Abdala Dergam was issued collecting permit SISBIO 14975-1 and the study was conducted strictly adhering to the recommendations proposed by the Federal Council of Biology and approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFV (permit 059/2013). The animals were anesthetized and sacrificed using clove oil (Lucena et al. 2013), taking maximum efforts to minimize suffering.

Morphology and morphometric data were obtained according to Eigenmann (1927). The DNA was extracted from the ethanol-preserved liver, muscle or gill tissues (Boyce et al. 1989). Fragments of cytochrome oxidase subunit I (COI) from four specimens (two males and two females) were amplified using the FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCA-3') and FishR1 (5'-TAGACTTCTGGG TGG CCAAAGAATCA-3') primers (Ward et al. 2005). PCR reactions were performed using 12.5µL with 8.575µL H₂O, 1.25µL buffer 10X (200mM Tris-HCl at pH 8.4, 500mM KCl), 0.3125µL MgCl₂ (100mM), 0.05µL dNTPs (20mM), 0.125µL of each primer (10µM), 0.0625µL (2.5U) Taq polymerase (Phonotria) and 2µL DNA(100ng.µl⁻¹). Amplification was performed at 95°C (5 minutes), with 36 cycles of 95°C (30 seconds), 52°C (1 minute) and 72°C (1 minute and 30 seconds), with a final extension at 72°C (7 minutes). The amplified product was purified with saline precipitation (PEG 8000) (20% polyethyleneglycol, 2.5 M NaCl) and sequenced at Macrogen Corp., South Korea. The sequences were aligned with the CLUSTAL W (Higgins et al. 1994), implemented in software MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). GenBank accession numbers for COI are reported in Appendix II. The model of molecular evolution that best fit the data was selected using Akaike information criterion, according to the MrModelTest software 2.3 (Nylander 2004). The Bayesian inference (MB) (Huelsenbeck and Ronquist 2001) analysis was performed using ten million Markov Chain Monte Carlo (MCMC) and a phylogenetic tree was sampled every thousand generations. Of the initial trees, 25% were rejected and the remaining ones were used for consensus topology. A maximum parsimony analysis was conducted in PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) and heuristic searches included 1000 random

additions of sequences using the algorithm TBR. The phylogenetic signal was estimated using 1000 pseudo replications of bootstrapping (Felsenstein 1985).

Mitotic chromosomes were obtained from fish cephalic kidney cells (Bertollo et al. 1978). Nucleolar organizer regions (NORs) were detected by using silver nitrate staining according to Howell and Black (1980). Heterochromatin was identified by C-banding (Sumner 1972) incorporating the following modifications: slides were left for one week and then treated for 5 minutes in 0.2 N HCl, 1 minute and 30 seconds in Ba(OH)₂·8H₂O 5% and one hour in 2XSSC. FISH experiments with the microsatellite probes were performed as described Kubat et al. (2008), with slight modifications. The labeled oligonucleotides d(CA)₁₅ and d(GA)₁₅ were used as probes. These sequences were directly labeled with Cy3 at 5' terminal during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA). The chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 µg/ml), and mounted in antifade solution (Vector, Burlingame, CA, USA). The chromosomes were identified with an Olympus BX53 epifluorescence microscope using the cellSens Dimension® software and measured using Image Pro Plus® and categorized as metacentrics (m), submetacentrics (sm), subtelocentrics (st) and telocentrics (t) (Levan et al. 1964).

Results

The *A. scabripinnis* specimens showed the following features: 33-38 scales on the lateral line, 6 scales above the lateral line, 4-5 scales below the lateral line, 21-23 anal fin rays, 2.9-3.2 depth, 4-4.3 times head length on standard body length and 2.8-3.2 times the interorbital distance on the head length.

The COI sequences allowed an alignment of 604 bp. The best model of molecular evolution was GTR+I+G. The cladogram revealed the close relationship between the SAR population and the populations of *A. scabripinnis* and *Astyanax intermedius* from the Paraíba do Sul Basin and *Astyanax ribeirae* from the Upper Paraná Basin (Fig. 2).

Characteristic differences in the karyotypes of the male and female specimens were detected by Giemsa staining, silver nitrate impregnation and C-banding. The A chromosomes revealed diploid number $2n=50$ with the female karyotypic formulae composed of $6m+13sm+19st+12t$ (Fig. 3a), and the males showed $6m+14sm+18st+12t$ (Fig. 3b).

Nine specimens (eight females and one male), revealed the presence of B chromosomes varying in number from zero to three chromosomes per metaphase, within the

specimens. Five types of B chromosomes were observed: submetacentrics (B_{SM}), subtelocentrics (B_{ST}), telocentrics (B_T), small subtelocentrics (B_{st}) and microchromosomes (b) (Fig. 3g). The only male to have a B chromosome had a B_{SM} . NORs were multiple (Figs. 3c, d) and varied showing four to 11 markings on the short arms of the sm and st chromosomes.

The C-banding showed low heterochromatin content (Figs. 3e, f). Heterochromatic blocks were pericentromeric in chromosome pair numbers 1, 2, 3, 5, 8, 12, and the Z chromosome as well; centromeric blocks were seen on the short arm of chromosome pair numbers 20, 21, and 23; they were also found along the short arm and interstitial chromosome number 22; they were centromeric and interstitial on chromosome pair number 10; centromeric and pericentromeric on the short arm of chromosome pair 14; pericentromeric, interstitial and telomeric on the large arm of the W chromosome. Finally, the chromosome pair numbers 7, 11, and 15 showed heteromorphic heterochromatin patterns.

The microsatellites $(GA)_{15}$ and $(CA)_{15}$ (Fig. 4a, b) were preferentially accumulated in the telomeric regions of most of the chromosomes, and accumulated in the centromeric and pericentromeric regions of some chromosomes. The W chromosome showed both sequences $(GA)_{15}$ and $(CA)_{15}$, whereas the Z chromosome accumulated only the microsatellite $(CA)_{15}$.

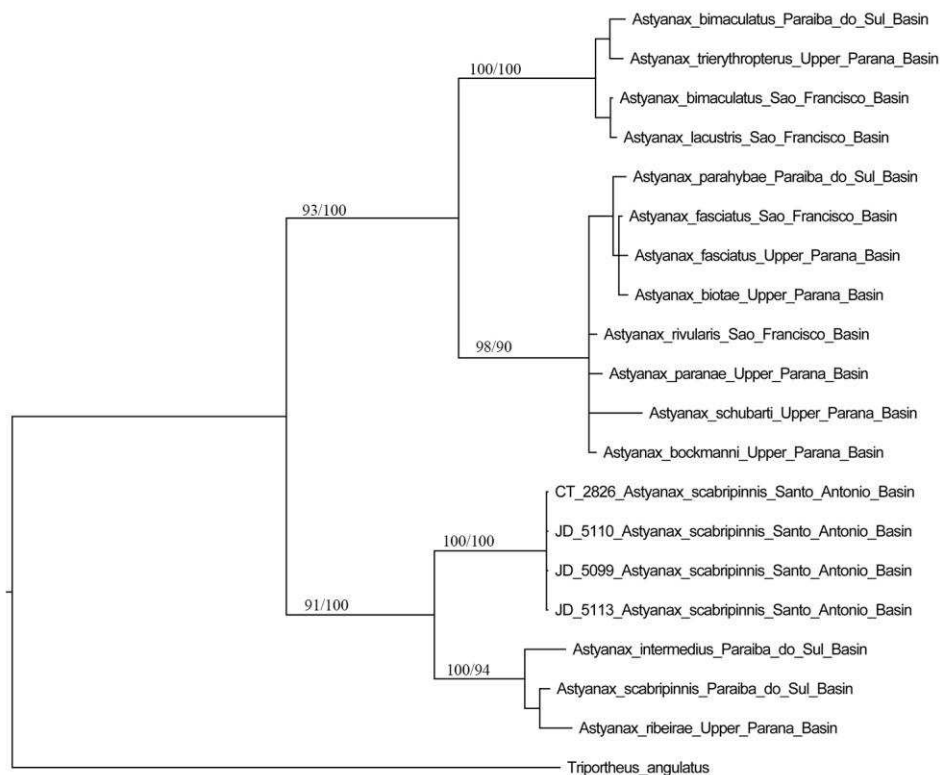


Fig. 2 Bayesian cladogram based on cytochrome oxidase subunit I of *Astyanax scabripinnis* from Santo Antônio River and *Astyanax* spp. sequences retrieved from GenBank. Numbers above branches are Bayesian posterior probability and maximum parsimony bootstrap, respectively

Discussion

The SAR *A. scabripinnis* population fits with most of Eigenmann's (1927) morphological criteria, showing only a slightly higher variation in the scales below the lateral line, a lower variation in the anal fin ray counts and body depth and a larger variation in head length/standard body length. Small morphological differences were also recorded for *A. scabripinnis* from the continental Upper Paraná and São Francisco basins (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Further, the molecular data indicate that the SAR population is more closely related to *A. scabripinnis* and *A. intermedius* from the Paraíba do Sul Basin as well as to *A. ribeirae* from the Upper Paraná Basin than to other *Astyanax* populations. COI data have been successfully applied to aid in species identification (Remigio and Herbert 2003; Hebert et al. 2004), including fish (Ward et al. 2005), although cryptic variation and undetected taxonomic diversity have also been reported (Hebert et al. 2004; Witt et al. 2006; Smith et al. 2007). *A. scabripinnis* from the SAR population revealed a diploid number similar to most populations of this fish studied (Kavalco and Moreira-Filho 2003; Santos et al. 2012a, b) and it was assumed to be plesiomorphic for the species complex (Vicari et al. 2008b). However, the karyotypic formulae found among the Santo Antônio River populations were very different from all the others (Appendix I).

The consistent finding of a heteromorphic chromosome pair in the females and its homomorphic analogue in the males indicates the presence of a ZZ/ZW sex chromosome system in the SAR population. Apparently, sex chromosomes were absent at the base of fish phylogeny and they originated independently within a few genera and families from a pair of undifferentiated proto-sex chromosomes (Vicari et al. 2008a). The presence of the heteromorphic sex chromosome system in some Neotropical fish groups, therefore, represents a synapomorphic condition in isolated cases and may define the natural taxa, such as *Triportheus* spp. (Artoni and Bertollo 2002). In other cases, the sex chromosomes are found limited to some species within the genus such as *Leporinus* (Galetti Jr. and Foresti 1986) and

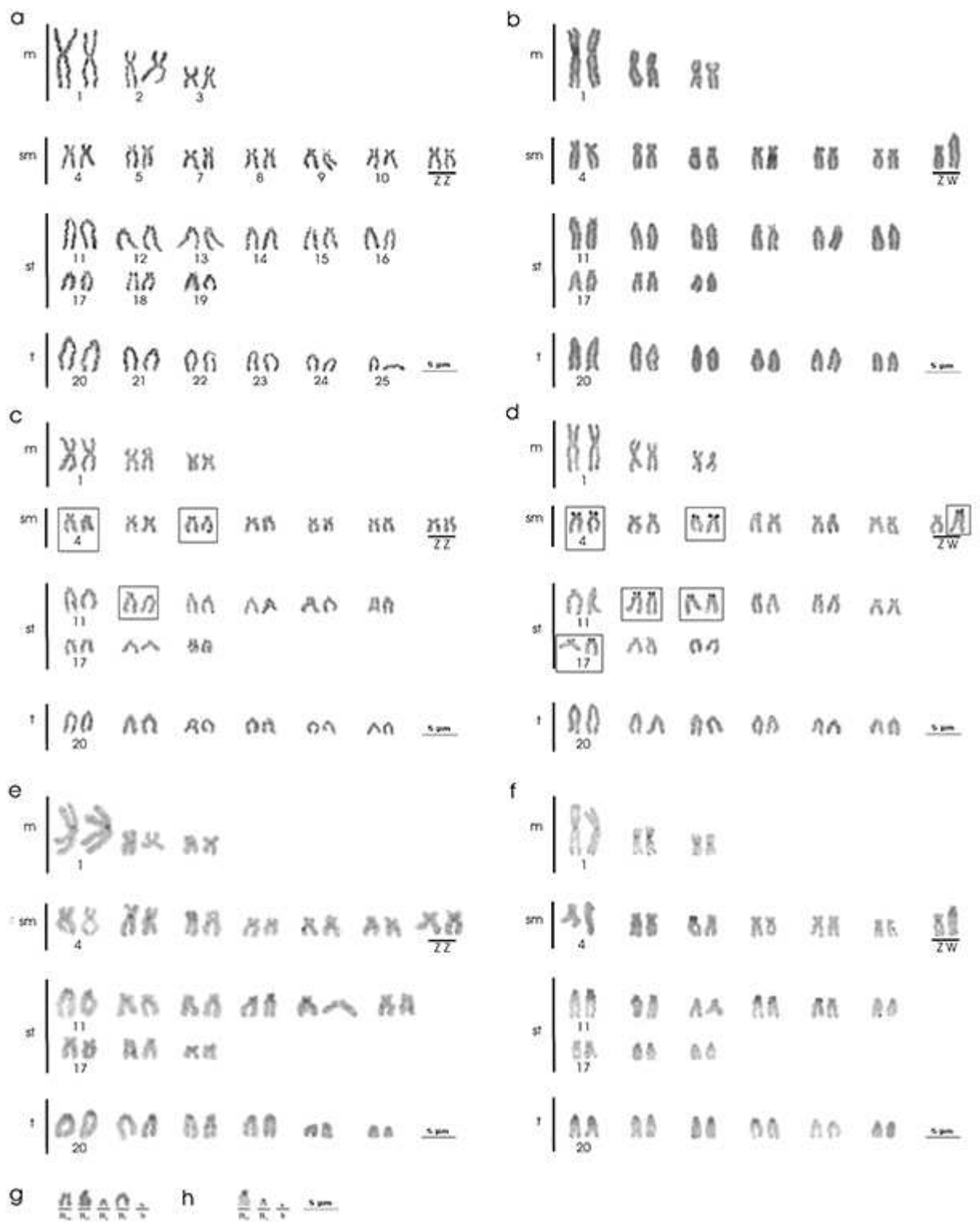


Fig. 3 Karyotypes after Giemsa staining (a, b), Ag-NOR (c, d) and C-banding (e, f) of male (a, c, e) and female (b, d, f) of the *Astyanax scabripinnis* population collected in Ferros, Minas Gerais, Brazil. B chromosomes after Giemsa staining (g) and C-band (h) of the same population. Insets show Ag-NOR bearing chromosomes

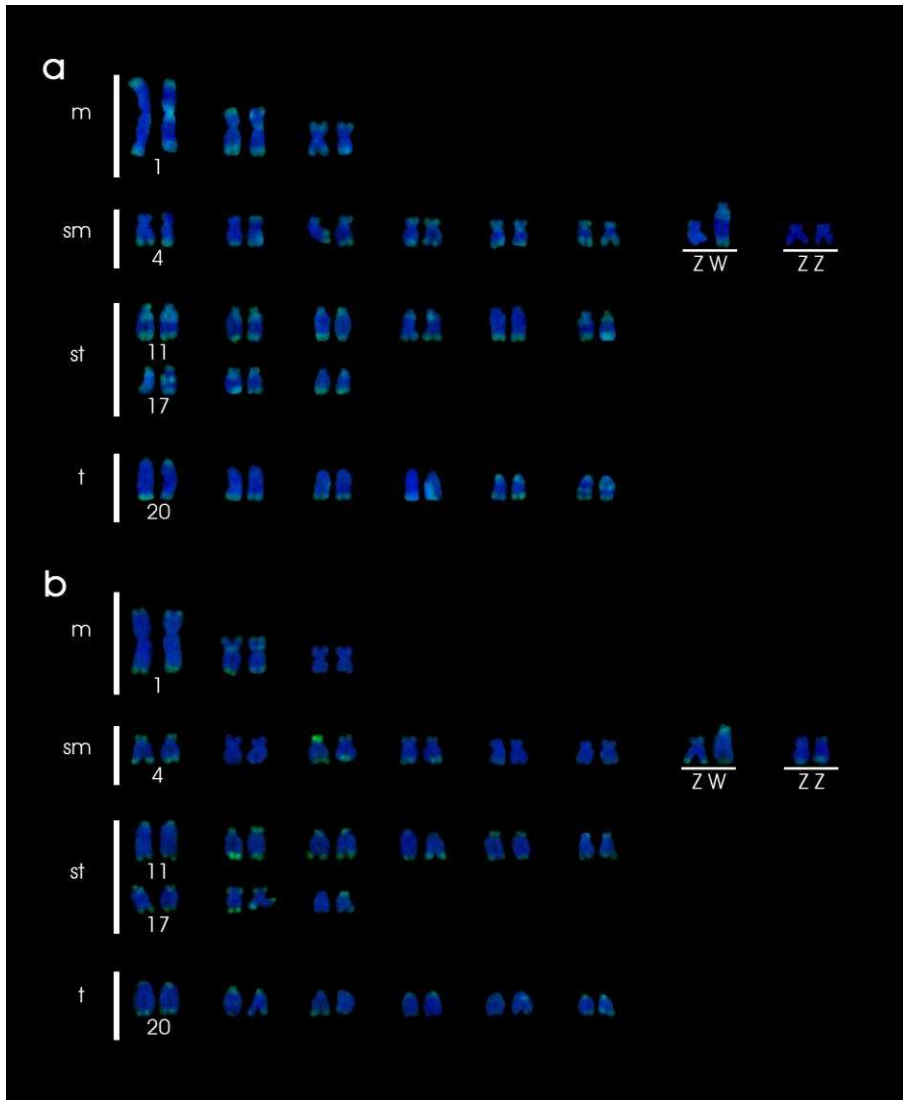


Fig. 4 Karyotypes after fluorescent in situ hybridization using $(GA)_{15}$ (a) and $(CA)_{15}$ (b) microsatellite probes

family Parodontidae (Centofante et al. 2002). Four out of the seven cytotypes of *Hoplias malabaricus* have independently evolved sex chromosome systems (Bertollo et al. 2000).

In *A. scabripinnis*, the presence of an W chromosome larger in size than the Z is a pattern also evident in the other Neotropical fish species such as *Leporinus* spp. (Galetti et al. 1995), *Parodon hilarii* Reinhardt 1866 (Moreira-Filho et al. 1993) and *Semaprochilodus taeniurus* Valenciennes 1817 (Feldberg et al. 1987). Among the Characidae, the ZZ/ZW sex chromosomes are most frequently seen, although they are found restricted to the *Triportheus* spp. (Artoni and Bertollo 2002), *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann 1915) and *Serrapinnus* sp. (Santi-Rampazzo et al. 2007). Approximately 75% of the sex chromosomes which have been reported among the Neotropical ichthyofauna correspond to female heterogamety (Cioffi et al. 2012b).

Chromosomes bearing the sex-determining genes and sexually antagonistic genes (which include alleles that positively affect one gender, but negatively affect the other), as the proto-W chromosomes, tend to accumulate other genes that are beneficial to one sex (Rice 1987). The suppression of the crossing-over of the sex-determining region becomes advantageous under those conditions (Charlesworth et al. 2005), generally achieved via pericentric inversions, is a phenomenon which holds these sex-linked genes together (Kirkpatrick 2010). This seems to be true for the W chromosome of the SAR *A. scabripinnis* population.

The percentage of specimens carrying B chromosomes in this study was similar to that of this fish population from the Yukatan, Águas do Rancho (Mizoguchi and Martins-Santos 1997) and Tatupeba Streams (cytotypes I and II) (Fernandes and Martins-Santos 2005). More than 50% of the *A. scabripinnis* populations in the Fojo River, Carpas Lake, Lavrinha Farm, Capivari (Ferro et al. 2003) and Cascatinha streams (Maistro et al. 2001) revealed the presence of the supernumerary chromosomes. The highest incidence of the B chromosomes was 100% in the populations of the Pedras (Salvador and Moreira-Filho 1992) and Tatupeba streams (cytotype III) (Mizoguchi and Martins-Santos 1997). The proportions of the B-bearing specimens in the Grande Creek varied with altitude along the river sections (Néo et al. 2000b).

As in the *A. scabripinnis* population from the SAR, several studies (Moreira-Filho et al. 2004; Fernandes and Martins-Santos 2005) have identified the presence of variable numbers of B chromosomes within and among the individual fish. However, the presence of three or four supernumerary chromosomes in the same metaphase has been observed only in the Jucu River (Rocon-Stange and Almeida-Toledo 1993) and Tatupeba stream populations (Fernandes and Martins-Santos 2005). This widely ranging variation may be due to the non-Mendelian segregation of these chromosomes (Jones 1995). According to Camacho (2005), high numbers of B chromosomes are harmful to specimens. Thus, the adults of a given species may exhibit the maximum number of supernumerary chromosomes that they can safely tolerate (Camacho 2005).

The supernumerary chromosomes found in both sexes of the *A. scabripinnis* population in the SAR were also observed in the populations from the Grande Creek (Néo et al. 2000a, b), Pedras (Mestriner et al. 2000), Cascatinha (Maistro et al. 2001), Lavrinha Farm streams, Fojo River, Capivari, Carpas Lakes (Ferro et al. 2003) and Tatupeba Stream (cytotypes II and III) (Fernandes and Martins-Santos 2005). However, the *A. scabripinnis*

populations from the Água do Rancho River, Yukatan (Mizoguchi and Martins-Santos 1997), Tatuapeba (cytotype I) (Fernandes and Martins-Santos 2005) and Cascatinha streams (Santos et al. 2012a) showed B chromosomes exclusively in the females, and they were restricted to only males in the populations from the Jucu River (Rocon-Stange and Almeida-Toledo 1993).

This wide diversity in the occurrence of the supernumerary chromosomes in *A. scabripinnis* shows a similarity to that observed for this fish population from the Grande Creek (Néo et al. 2000a), Fojo River, Capivari, Carpas Lake, Lavrinha Farm (Ferro et al. 2003), Tatuapeba (Fernandes and Martins-Santos 2005) and Cascatinha streams (Santos et al. 2012b). The B_{ST} and B_T chromosome types were also identified for the *A. scabripinnis* populations from the Tatuapeba Stream (Fernandes and Martins-Santos 2005), although the B_{ST} observed in the Santo Antônio River population is relatively shorter. Micro chromosomes were also observed in the *A. scabripinnis* population of another coastal river, the Jucu River (Rocon-Stange and Almeida-Toledo 1993), as well as the Água do Rancho (Mizoguchi and Martins-Santos 1997) and the São Domingos streams (Alves and Martins-Santos 2002) the two rivers of the upper Paraná Basin.

Although B macrochromosomes (B_M) are not present in the SAR population, this is the most frequently supernumerary chromosome found in *A. scabripinnis* from different river basins (Salvador and Moreira-Filho 1992; Maistro et al. 1994; Souza and Moreira-Filho 1995; Vicente et al. 1996, Porto-Foresti et al. 1997; Néo et al. 2000a, b; Mestriner et al. 2000; Maistro et al. 2000a; Ferro et al. 2003). Its presence in other *Astyanax* species suggests an ancient origin in this species complex (Néo et al. 2000a). The B_M was then identified as an isochromosome from the heterochromatin interstitial marking pattern, as well as by the repetitive pattern of the DNAAs51 probe in the B_M chromosomes, coincident with the markings on pair 24 (Mestriner et al. 2000). Chromosome microdissection and chromosome painting studies confirmed this hypothesis (Vicari et al. 2011). Although the evolutionary origins of B chromosomes are largely unknown, the same origin for Bs has been proposed with different morphologies (Néo et al. 2000a); however, the supernumerary microchromosomes may have evolved independently from other chromosomes (Mizoguchi and Martins-Santos 1997).

The B chromosomes appear to have been derived from the A chromosomes via several mechanisms, including aneuploidy, chromosome mutations such as Robertsonian translocations and from specific A chromosome regions (Camacho 2005). The Bs and sex chromosomes show similar condensation–decondensation cycle patterns during meiosis and

in size and morphology (Camacho et al. 2000). They are also exposed to similar chromosome degeneration and inactivation processes. Both could have a common origin (homology) or a convergence to a similar “phenotype” (analogy) (Camacho 2005). Supernumerary chromosomes appear to be derived from the sex chromosomes in some species, as in the fly *Glossina* (Amos and Dover 1981), the frog *Leiopelma hochstetteri* Fitzinger 1861 (Sharbel et al. 1998) and the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* Charpentier (López-León et al. 1994). However, contrary to sex chromosomes, the B chromosomes are considered dispensable and do not recombine with any A chromosome (Beukeboom 1994).

The variation in the Ag-NORs markings observed in the SAR population has also been reported for the other *A. scabripinnis* populations from two (Fernandes and Martins-Santos 2003; Vicari et al. 2011) to 15 (Rocon-Stange and Almeida-Toledo 1993) in the different populations showing variations within and among the individuals. The highest number of Ag-NORs in SAR is similar to that reported for one of the Piracuama River populations (Souza and Moreira-Filho 1995). The *A. scabripinnis* of the coastal Jucu River Basin are distinguished by 15 Ag-NORs markings and metaphases carrying up to four B chromosomes (Rocon-Stange and Almeida-Toledo 1993). The W chromosome in this fish also showed an Ag-NOR site in its short arm. This could have influenced the differentiation of this chromosome, as it has been proposed for species of the Neotropical characid *Triportheus* (Artoni and Bertollo 2002). Such associations of the Ag-NORs with sex chromosomes were also reported in the Neotropical species viz., *Hoplias malabaricus* (Bloch 1794) (Born and Bertollo 2000), *Thoracocharax stellatus* (Kner 1878) (Venere et al. 2008) and *Characidium lanei* Travassos 1967 (Noletto et al. 2009).

Certain chromosomes of the SAR *A. scabripinnis* population show evidence of a homomorphic pattern of heterochromatin similar to that seen in this fish population from the Curral das Éguas Stream (Moreira-Filho and Bertollo 1991), and Jaguariaíva River Basin (karyotypes B and C) (Vicari et al. 2008a) populations. Few *A. scabripinnis* populations (Moreira-Filho and Bertollo 1991; Souza and Moreira-Filho 1995; Mantovani et al. 2000; Vicari et al. 2008b) showed interstitial heterochromatic blocks. Interstitial heterochromatic regions, including those observed in the present study, may be explained by paracentric inversions because the heterochromatic blocks are distributed preferentially in the proximal or terminal chromosomes (Guerra 1988; Martins 2007), as reported for *Astyanax* sp.D (Kantek et al. 2007). The constitutive heterochromatic regions of *A. scabripinnis* in this study coincided with the NORs markings on the short arm of W chromosome and chromosome pair number 7.

There were heterochromatic regions also visible on the W chromosome in its pericentromeric, interstitial and distal longer arm regions.

In the SAR *A. scabripinnis* population, the Z chromosome showed positive C-banding in its centromeric region, assumed to be the beginning of the heterochromatinization process of further development in the W chromosome, as observed in the Neotropical darter *Characidium* (Vicari et al. 2008a). The differentiation between the sex chromosomes involves the heterochromatin segments of either W or Y chromosome in some fishes, including the *Leporinus* spp. (Galetti Jr. and Foresti 1986), *Semaprochilodus taeniurus* (Feldberg et al. 1987), and *Poecilia latipinna* (Sola et al. 1990). In most cases, an initial heterochromatinization stage is followed by heterochromatin accretion, in which the W or Y chromosomes increase in size (Centofante 2001; Martins 2007). The W chromosome in the SAR population showed large portions of euchromatic regions, which although very small in some species, may retain homology with the Z chromosome, as well as the sex-determining genes, as reported for species of *Triportheus* (Artoni and Bertollo, 2002).

Chromosome pairs containing the heteromorphic heterochromatin seen in the SAR *A. scabripinnis* population were also observed in other populations of this species from the Claro and Monjolinho rivers, and Viveiro das Mudas (Moreira-Filho and Bertollo 1991), Yukatan (Mizoguchi and Martins-Santos 1997), Marrecas and Centenary streams (Mantovani et al. 2000). This heteromorphic pattern could be a result of the chromosomal orientation during interphase. The telomeric regions may encourage genetic material transfer, due to the equidistant position of non-homologous chromosomes, allowing the transfer of heterochromatin (Schweizer and Loidl 1987).

The supernumerary B_{ST} and B_{st} of *A. scabripinnis* population from SAR revealed the presence of heterochromatin in the short arms and pericentromeric region, whereas the microchromosome was completely heterochromatic. This fish from the Tatuapeba Stream showed heterochromatic regions in the short arm and in the pericentromeric and telomeric regions of the larger arm of the supernumerary B_{ST} (Fernandes and Martins-Santos 2005) which could explain the larger B_{ST} size compared with those of the present study. According to Rejon et al. (1987), loss of the transcriptional activity triggered by the complete or partial supernumerary chromosomal heterochromatinization can reduce any possible damage caused by the presence of an extra chromosome in the karyotype. Furthermore, the presence of heterochromatin prevents the pairing of A and B chromosomes, thus permitting further differentiation of the Bs (Rejon et al. 1987).

The microsatellite (GA)₁₅ and (CA)₁₅ distribution patterns of SAR *A. scabripinnis* population were preferentially telomeric in the autosomes. The dissimilar accumulation of the repetitive sequence (CA)₁₅ among sexual chromosomes, the absence of (GA)₁₅ in the Z chromosome, and its presence in the W one indicate a differentiation among homologues. These results are similar to those of *H. malabaricus* (Cioffi et al. 2010), *Triportheus auritus* (Cioffi et al. 2012a), *Leporinus conirostris* and *Leporinus obtusidens* (Poltronieri et al. 2013), although in *H. malabaricus* the X chromosome accumulated few (GA)₁₅ (Cioffi et al. 2010). Microsatellites are commonly accumulated in typically heterochromatic regions such as telomeres, centromeres and sex chromosomes (Martins 2007; Cioffi et al. 2012a). Nevertheless, repetitive sequences may accumulate differently even in closely related fish species with the same sexual system (Poltronieri et al. 2013).

The presence of sex chromosomes in the SAR *A. scabripinnis* population and its rarity of occurrence within the genus warrant further considerations. Although genetic, temperature or behavioural mechanisms may influence sex determination in fishes the presence of sex-specific chromosomes can be advantageous in unpredictable environments (Wilson and Makova 2009). The processes of sex chromosome differentiation may be explained by antagonist sexual selection, where reproductive advantage is given to one sex over the other (Rice, 1987). A reduction in the recombination of the sex-determining genes and genes beneficial for sex-specific fitness with other genomic regions is the first step in the evolution of dimorphic sex chromosomes (Rice 1996; Charlesworth and Charlesworth 2000). This differentiation process occurs via genic, structural and/or conformational changes (Clark and Wall 1996). Inversions, deletions and mobile sequence elements are inclined to become fixed in regions of non-recombining Y and W chromosomes when recombination is suppressed (Rice 1987; Steinemann and Steinemann 2005). Recently, molecular and morphological research has classified *Astyanax* and other small-sized fishes in a phylogenetically unresolved clade (Mirande 2009; Oliveira et al. 2011). This categorization is apparently derived from sporadic hybridization occurring among the populations (Aguar, personal communication), a process that counters chromosomal differentiation within lineages. However, this does not appear to be the case in the SAR *A. scabripinnis* population, restricted to the Santo Antônio headwaters, which is a demographic and ecological condition that may facilitate the fixation of chromosomal rearrangements (Sites and Moritz 1987) that could be rapidly eliminated in large populations (McAllister 2000). In the SAR population, chromosome fixation enabled the differentiation of a sex chromosome system and an overall divergence of the chromosome

constitution and formulation from the more common conditions of other populations relating to the same species complex. The cytologically unique features of the SAR *A. scabripinnis* show that this population is a distinct evolutionary unit within this fish complex and highlights the biological relevance of the fish fauna of Santo Antônio.

References

- ABEL LDS, MANTOVANI M, MOREIRA-FILHO O (2006) Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 29:448–452. doi: 10.1590/S1415-47572007000400005
- ALMEIDA-TOLEDO LF, OZOUF-COSTAZ C, FORESTI F, BONILLO C, PORTO-FORESTI F, DANIEL-SILVA MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet. Genome Res.* 97:229-233. doi:10.1159/000066609
- ALVES AL, MARTINS-SANTOS I (2002) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n = 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* 67,117–122.
- Amos A, Dover G (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81:673–690.
- ARTONI RF, BERTOLLO LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89:15-19. doi:10.1038/sj.hdy.6800081
- BERTOLLO LAC, TAKAHASHI C, MOREIRA-FILHO O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1:103–120.
- BERTOLLO LA, BORN GG, DERGAM JA, FENOCCHIO AS, MOREIRA-FILHO O (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res.* 8:603-613.
- BEUKEBOOM LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B–Chromosome Conference. *Heredity* 73:328–336.
- BIAVATI SH, MAISTRO EL (2007) Cytogenetical analyses in three *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Cytologia* 72:357-361.
- BORN GG, BERTOLLO LAC (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res.* 8:111-118.
- BOYCE TM, ZWICK ME, AQUADRO CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123, 825-836.
- BUCKUP PA (1993) The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *J. Linn. Soc.* 108:225-245.
- CAMACHO JPM, SHARBEL TF, BEUKEBOOM LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* 355:163-178.

- CAMACHO JPM (2005) B chromosomes, pp. 223-286. In: Gregory, TR (ed) The evolution of the genome. Elsevier, Academic Press, London, pp 224-289
- CARVALHO ML, OLIVEIRA C, FORESTI F (2002) Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia* 55:181-188. doi:10.1080/00087114.2002.10589275
- CENTOFANTE L, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO, O. (2001) Comparative cytogenetics among sympatric species of Characidium (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia-Firenze* 54:253-260.
- CENTOFANTE L, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2002) A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus Parodon (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139-150.
- CHARLESWORTH B, CHARLESWORTH D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* 355:1563-1572.
- CHARLESWORTH D, CHARLESWORTH B, MARAIS G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118-128. doi:10.1038/sj.hdy.6800697.
- CIOFFI, MB, KEJNOVSKY E, BERTOLLO LAC (2010) The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 132:289-296. doi: 10.1159/000322058
- CIOFFI MB, KEJNOVSKÝ E, MARQUIONI V, POLTRONIERI J, MOLINA WF, DINIZ D, BERTOLLO, LAC (2012a) The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol. Cytogenet.* 5:1-7.
- CIOFFI MB, MOREIRA-FILHO O, ALMEIDA-TOLEDO LF, BERTOLLO LAC (2012b) The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *J. Fish Biol.* 80:2125-2139. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03272.x
- CLARK MS, WALL WJ (1996) Chromosome form and function. In Chapman, Hall (eds) *Chromosomes: the Complex Code*. London, pp 61-65.
- CRISTINA A, MALACRIDA CP, DIAS AL, GIULIANO-CAETANO L (2003) Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. *Cytologia* 68:267-270.
- DANIEL-SILVA MFZ, ALMEIDA-TOLEDO LF (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia-Firenze* 54:209-215.
- da SILVA LLL, GIULIANO-CAETANO L, DIAS AL (2012) Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, using in situ hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA₃ staining. *Folia Biol. (Krakow)* 60:3-4. doi:10.3409/fb60_3-4.135-140
- DRUMMOND GM, MARTINS CS, MACHADO ABM, SEBAIO FA, ANTONINI Y (2005) Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação, 2ª. Ed. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- EIGENMANN, C.H. (1927). The American Characidae, Vol. 43. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*. Harvard College, Cambridge, pp. 311–428.
- ESCHMEYER WN (2013) Catalog of fishes. Available at <http://www.fishbase.org/references/FBRefSummary.php?ID=92887> (last accessed 30 August 2013). Updated internet version of 04 January 2013.

- FAUAZ G, VICENTE VE, MOREIRA O (1994) Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev. Bras. Genet.* 17:157-163.
- FELDBERG E, BERTOLLO LAC, ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F, MOREIRA-FILHO O, SANTOS AF (1987) Biological aspects of Amazonian fishes. IX Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Characidae). *Genome* 29:1-4.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2003) Cytogenetic characterization of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basin PR Brazil. *Cytologia* 68:289-293.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141:328-332.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124:301-306. doi:10.1007/s10709-005-4751-7
- FERRO DAM, NÉO DM, MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110:55-62. doi:10.1023/A:1017963217795
- FERRO DAM, NÉO DM, MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica* 119:147-153. doi:10.1023/A:1026086501252
- GALETTI JR PM, FORESTI F (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet. Genome Res.* 43:43-46.
- GALETTI JR PM, MESTRINER CA, MONACO PJ, RASCH EM (1995) Postzygotic modifications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome Res.* 3:285-290.
- GUERRA MS (1988) *Introdução à Citogenética Geral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- GROSS MC, SCHNEIDER CH, MATIELLO MCDA, LEITE MDL, BERTOLLO LAC, ARTONI RF (2004) Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 27:529-535.
- HEBERT PD, PENTON EH, BURNS JM, JANZEN DH, HALLWACHS W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:14812-14817. doi:10.1073/pnas.0406166101
- HIGGINS D, THOMPSON J, GIBSON T, THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- HOWELL WM, BLACK DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- HUELSENBECK JP, RONQUIST F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.

- JAVONILLO R, MALABARBA LR, WEITZMAN SH, BURNS JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54:498-511.
- JIM SM, TOLEDO V (1975) Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetraodonopterae). *Cienc. Cult.* 27:1122-1124.
- JONES RN (1995) Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. *New Phytol.* 131:411–434.
- KANTEK DLZ, NOLETO RB, FENOCCHIO AS, CESTARI MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguazu River Basin. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50:67-74. doi:10.1590/S1516-89132007000100008
- KANTEK DLZ, NOLETO RB, MAURUTTO FAM, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O, CESTARI MM (2008) Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguazu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. *J. Fish Biol.* 73:2012-2020. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02030.x
- KANTEK DLZ, CESTARI MM, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2009) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. D (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguazu River (PR). *Folia Biol. (Krakow)* 57:1-2. doi:10.3409/fb571-2.37-41
- KAVALCO KF, MOREIRA-FILHO O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia* 56:453-461. doi:10.1080/00087114.2003.10589358
- KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF (2007) Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4:103-111. doi:10.1089=zeb.2007.0504
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2007) Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 30:529-535. doi:10.1590/S1415-47572007000400005
- KAVALCO KF, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF (2009) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* 136:135-139. doi:7/s10709-008-9325-z
- KAVALCO KF, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF (2010) Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. *Nucleus* 53:51-54. doi:1007/s13237-010-0006-9
- KIRKPATRICK M (2010) How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biol.* doi:10.1371/journal.pbio.1000501
- KUBAT Z, HOBZA R, VYSKOT B, KEJNOVSKY E (2008) Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 51:350–356. doi: 10.1139/G08-024
- LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- LÓPEZ-LEÓN MD, NEVES N, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JP, HEWITT GM, CAMACHO JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 2:87-92.

- LUCENA CAS, CALEGARI BB, PEREIRA EHL, DALLEGRAVE E (2013) O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Bol. Soc. Bras. Ictiol.* 105:20-24.
- MAISTRO EL, DIAS AL, FORESTI F, OLIVEIRA C, MOREIRA-FILHO O (1994) Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia* 47:233-239.
- MAISTRO EL, OLIVEIRA C, FORESTI F (2000a) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica* 110:177-183.
- MAISTRO EL, OLIVEIRA C, FORESTI F (2000b) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 23:365-369.
- MAISTRO EL, OLIVEIRA C, FORESTI F (2001) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica* 110:177-183. doi:10.1023/A:1017961411614
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MESTRINER CA, MOREIRA-FILHO O. (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109:161-168.
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MESTRINER CA, MOREIRA-FILHO O (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 27:536-542.
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MOREIRA-FILHO O (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123:211-216.
- MARTINS C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Hauppauge, pp. 421-453.
- MARTINEZ ER, ALVES AL, SILVEIRA SM, FORESTI F, OLIVEIRA C (2012) Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comp. Cytogen.* 6:41-51. doi:10.3897/CompCytogen.v6i1.1873
- MCALLISTER BF (2000) Fixation of chromosomal rearrangements. In: Sankoff D, Nadeau JH (eds), *Comp. Genom.* Springer Netherlands, pp. 19-27.
- MEDRADO AS, FIGUEIREDO AVA, WALDSCHMIDT AM, AFFONSO PRAM, CARNEIRO PLS (2008) Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genet. Mol. Biol.* 31:208-214.
- MESTRINER CA, GALETTI PM, VALENTINI SR, RUIZ IR, ABEL LD, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JP (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85:1-9.
- MIRANDE JM (2009) Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25:574-613.

- MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1997) Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127:249–253.
- MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1998a). Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). *Cytologia* 63:259-265.
- MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1998b). Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 21: 55–61.
- MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Braz. J. Genet.* 14:331-357.
- MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC, GALETTI JR PM (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46:115-125.
- MOREIRA-FILHO, O., GALETTI JR, P. M. & BERTOLLO, LAC (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.* 106:230-234.
- MORELLI S, BERTOLLO LAC, FORESTI F, MOREIRA-FILHO O, ALMEIDA-TOLEDO FILHO, S (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia* 36:235-244.
- NELSON SJ (2006) *Fishes of the World*, 3rd edn. United States of America: John Wiley & Sons.
- NÉO DM, BERTOLLO LAC, MOREIRA FILHO O (2000a) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108:211-215.
- NÉO DM, MOREIRA FILHO O, CAMACHO JPM (2000b) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85:136-141.
- NYLANDER JAA (2004) MrModeltest v2: Evolutionary Biology Centre. Uppsala University.
- NOLETO RB, AMORIM AP, VICARI MR, ARTONI RF, CESTARI MM (2009) An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *J. Fish Biol.* 75:448-453. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02342.x
- OLIVEIRA C, AVELINO G, ABE K, MARIGUELA T, BENINE R, ORTÍ G, VARI RP, CASTRO RC (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol. Biol.* 11:1-25. doi:10.1186/1471-2148-11-275
- POLTRONIERI J, MARQUIONI V, BERTOLLO LAC, KEJNOVSKY E, MOLINA WF, LIEHR T, CIOFFI MB (2013) Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 142:40-45. doi: 10.1159/000355908
- PORTO-FORESTI F, OLIVEIRA C, MAISTRO EL, FORESTI F (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Braz. J. Genet.* 20:377–380.
- REJON MR, REJON CR, OLIVER JL (1987) Evolución de los cromosomas B. *Invest. Ciencia* 133:92–101.

- REMIGIO EA, HEBERT PD (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29:641-647.
- RICE WR (1987) The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution* 41:911-914.
- RICE WR (1996) Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Biosciences* 46:331-343.
- ROBERTS TR (1973) Osteology and Relationships of the Prochilodontidae, a South American Family of Characoid Fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 145:213-235.
- ROBERTS TR (1974). Osteology and classification of the Neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (including Anodontinae) and Parodontidae. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 146:411-472.
- ROCON-STANGE EA, ALMEIDA-TOLEDO LF (1993) Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Braz. J. Genet.* 16:601-615.
- ROSA RD, RUBERT M, MALABARBA LR, MARTINS-SANTOS IC, GIULIANO-CAETANO L (2009). Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotrop. Ichthyol.* 7:601-605.
- SALVADOR LB, MOREIRA-FILHO O (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69:50-56.
- SANTI-RAMPAZZO AP, NISHIYAMA PB, FERREIRA PEB, MARTINS-SANTOS IC (2007) Cytogenetic analysis and description of the sexual chromosome determination system ZZ/ZW of species of the fish genus *Serrapinnus* (Characidae, Cheirodontinae). *Genet. Mol. Res.* 6:504-509.
- SANTOS NM, FERREIRA-NETO M, ARTONI RF, VICARI MR, BAKKALI M, OLIVEIRA CD, FORESTI F (2012a) A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). *Zoologia (Curitiba)* 29:159-166. doi:10.1590/S1984-46702012000200008
- SANTOS NM, FERREIRA-NETO M, BAKKALI M, VICARI MR, ARTONI RF, OLIVEIRA CD, FORESTI F (2012b) Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia* 65:40-46. doi:10.1080/00087114.2012.678086
- SCHWEIZER D, LOIDL J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: Stahl A, Luciani JM, Vagner-Capodano AM (eds) *Chromosomes Today*. Springer Netherlands, Wien, pp 61-74.
- SHARBEL TF, GREEN DM, HOUBEN A (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41:14-22.
- SITES JW, MORITZ C (1987) Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst. Biol.* 36:153-174.
- SMITH MA, WOOD DM, JANZEN DH, HALLWACHS W, HEBERT PD (2007) DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:4967-4972. doi:10.1073/pnas.0700050104
- SOLA L, MONACO PJ, RASCH EM (1990) Cytogenetics Genome Research of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. *Cytogenet. Genome Res.* 53:148-154.
- SOUZA IL, MOREIRA-FILHO O (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* 60:1-14.
- SOUZA IL, MOREIRA-FILHO O, GALETTI JR PM (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Braz. J. Genet.* 19:405-410.

- STEINEMANN S, STEINEMANN M (2005) Y chromosomes: born to be destroyed. *Bioessays* 27:1076-1083.
- SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.
- SWOFFORD DL (2002) PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates. Sunderland: MA.
- TAMURA KPD, PETERSON NSG, NEI M, KUMAR S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony *Methods. Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- TOLEDO-PIZA M (2000) The Neotropical fish subfamily Cynodontinae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of Cynodon and Rhabdion. *Am. Mus. Novit.* 3286:1-88.
- TORRES-MARIANO AR, MORELLI S (2008) B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genet. Mol. Biol.* 31:246-249.
- VARI RP (1979) Anatomy, relationships, and classification of the families Citharinidae and Distichodontidae (Pisces, Characoidea). *British Museum (Natural History)*.
- VARI RP (1995) The neotropical fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. *Smithsonian Contributions to Zoology* 564:1-97.
- VENERE PC, SOUZA IL, MARTINS C, OLIVEIRA C (2008) Occurrence of ZZ/ZW sex chromosomes in *Thoracocharax stellatus* fish (Characiformes, Gasteropelecidae) from the Araguaia River, South America. *Genetica* 133:109-112. doi:7/s10709-007-9194-x
- VICARI MR, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (2008a) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134:311-317. doi 10.1007/s10709-007-9238-2
- VICARI MR, NOLETO RB, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (2008b) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical inferences. Genet. Mol. Biol.* 31:173-179.
- VICARI MR, PISTUNE, HFM, CASTRO JP, ALMEIDA MC, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JP, ARTONI RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica* 139:1073-1081. doi: 10.1007/s10709-011-9611-z
- VICENTE VE, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Genome Res.* 74:70-75.
- VIEIRA F (2009) Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota* 2:5-22.
- WARD RD, ZEMLAK TS, INNES BH, LAST PR, HEBERT PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc., Ser. B: Biol. Sci* 360:1847-1857.
- WEITZMAN SH (1954) The osteology and relationships of the South American characid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. *Stanford Ichthyological Bulletin* 4:213-263.

WILSON MA, MAKOVA KD (2009) Genomic analyses of sex chromosome evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10:333-354.

WITT JD, THRELOFF D L, HEBERT PD (2006) DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.* 15:3073-3082. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02999.x

ZANATA AM, VARI RP (2005) The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. *Zoo. J. Linn. Soc.* 145:1-144.

4. Capítulo 2

Cytogenetic and molecular characterization of *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1907 (Teleostei: Characidae) suggest the existence of an ancient coastal group

Resumo

O gênero *Deuterodon* é considerado *incertae sedis*, e as relações filogenéticas entre suas espécies ainda não são definidas. *D. pedri* é uma espécie endêmica do rio Santo Antônio, Minas Gerais, cujos estudos limitaram-se a comparações morfológicas dentro do próprio gênero. Os espécimes de *D. pedri* apresentaram número diplóide $2n=50$, com fórmula cariotípica $12m+12sm+20st+6t$, pouca heterocromatina, regiões organizadoras do nucléolo em dois pares cromossômicos, 10 regiões de hibridização *in situ* por fluorescência com sonda 18S e duas regiões com sonda 5S. A árvore gerada com o gene citocromo oxidase subunidade I mostrou que *D. pedri* e *D. singularis* possuem estreitas relações filogenéticas, formando o clado 1, que se agrupa com o clado 2, composto por *D. parahybae*, *D. iguape*, *Astyanax giton*, *Astyanax intermedius*, *Astyanax ribeirae*, *A. scabripinnis* e *P. heterostomus*. Esses dois cladogramas, juntamente com *S. typhlops*, formam o clado 3. O cladograma do gene ativador de recombinação-2 confirmou as relações filogenéticas entre *D. pedri*, *D. iguape*, *P. heterostomus* e *S. typhlops*. Os dados mostram similaridade citogenética entre *D. pedri* e *D. stigmaturus*, e sugerem que *Deuterodon* forma um grupo polifilético, formado nas bacias costeiras do Brasil, que teria se diversificado por dispersão de peixes durante os períodos glaciais e por captura de cabeceira.

Palavras-chave: bacias costeiras; biodiversidade; polifilia.

Introdução

Os Characiformes compõem uma das maiores ordens de peixes, possuindo mais de 1.600 espécies, subdivididas em cerca de 16 famílias (Nelson, 2006). Dentro da Família Characidae, um conjunto de gêneros, incluindo *Deuterodon* Eigenmann, 1907, foi considerado *incertae sedis* (Lima et al., 2003). Estudos moleculares (Oliveira et al., 2011) e

morfológicos (Mirande, 2009) posteriores consideram *Deuterodon* e outros gêneros como um clado (“clado C”) caracterizado pela ausência de grupos monofiléticos.

O gênero *Deuterodon* foi proposto por Eigenmann (1907) com base na presença de duas fileiras de dentes no pré-maxilar, dentes multicuspidados expandidos na porção distal e dentes do dentário decrescendo gradualmente em tamanho posteriormente, a partir da sínfise (Eigenmann, 1927). Porém, estas características não são exclusivas, já que *Astyanax obscurus*, *Astyanax taeniatus*, *Astyanax giton* e *Astyanax intermedius* apresentam dentição semelhante (Melo & Buckup, 2006).

Deuterodon pedri Eigenmann 1908 é popularmente conhecido como lambari e sua localidade tipo é o rio Santo Antônio, no estado de Minas Gerais, sendo espécie endêmica desse rio (Lima et al., 2003). Esta espécie foi coletada pela primeira vez durante a expedição Thayer (Eigenmann, 1917). Lucena e Lucena (2013) examinaram dois dos cinco sintótipos da série de Eigenmann na descrição de *D. pedri* e determinaram o lectótipo dessa espécie. Lucena e Lucena (2002) colocaram *D. pedri* em condição de *incertae sedis*, fora do grupo monofilético proposto por eles e que inclui *D. iguape* (espécie-tipo), *Deuterodon longirostris*, *Deuterodon rosae*, *Deuterodon stigmaturus*, *D. langei*, *Deuterodon supparis* e *Deuterodon singularis*.

Estudos realizados com a família Characidae não incluíram *D. pedri*. Mirande (2009), através de análises morfológicas, propôs o “grupo *Hemigrammus*” composto por *Deuterodon iguape*, *Deuterodon langei*, *Bario steindachneri*, *Pristella maxillaris*, *Hasemania nana*, *Paracheirodon axelrodi*, *Probolodus heterostomus* e algumas espécies de *Moenkhausia*, *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus* e *Thayeria*, sendo o clado *Astyanax* seu grupo irmão. As análises moleculares de Oliveira et al. (2011) mostraram estreita relação entre *D. iguape* com *P. heterostomus* e *Myxiops aphos*, sendo *Stygichthys typhlops* e *Coptobrycon bilineatus* seu grupo irmão, e todos eles inclusos no clado C de Javonillo et al. (2010).

O rio Santo Antônio é um dos principais afluentes do rio Doce e possui indivíduos de *D. pedri* em simpatria com cinco espécies de *Astyanax*: *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax fasciatus*, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax taeniatus* e *Astyanax* sp. (Vieira, 2009). O presente estudo objetiva caracterizar citogenética e molecularmente a população de *D. pedri* coletados do rio Santo Antonio, município de Ferros, Minas Gerais, Brasil, comparando molecularmente com as espécies *D. parahybae*, *D. singularis* e *D. iguape*.

Material e métodos

Vinte e um espécimes de *D. pedri* (16 fêmeas e cinco machos) foram coletados no rio Santo Antônio, no município de Ferros, estado de Minas Gerais, Brasil (19°13'58 S, 43°01'20 W), e transportados vivos para o Laboratório de Sistemática Molecular “Beagle” da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os espécimes foram tombados na coleção científica do Museu de Zoologia João Moojen da UFV (MZUFV 4171). A permissão de coleta foi emitida para o prof. Jorge Abdala Dergam (SISBIO 14975-1) e o estudo conduzido aderindo estritamente às recomendações propostas pelo Conselho Federal de Biologia e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFV (permissão 059/2013). Os animais foram anestesiados e sacrificados com o uso de óleo de cravo (Lucena et al., 2013).

Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim cefálico dos peixes (Bertollo et al. 1978). As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) foram detectadas utilizando coloração com nitrato de prata (Howell & Black, 1980). A heterocromatina foi identificada por banda C (Sumner, 1972), com as seguintes modificações: as lâminas foram envelhecidas durante uma semana a 37 °C e então tratadas por 5 minutos em HCl 0.2 N, 1 minuto e 30 segundos em Ba(OH)₂.8H₂O a 5% e uma hora em 2XSSC. A hibridização in situ por fluorescência (FISH) foi executada segundo Pinkel et al. (1986), utilizando as sondas de rDNA 18S (Cioffi et al., 2009) e rDNA 5S (Martins et al., 2006). As sondas foram marcadas por “Nick translation” com biotina-14-dATP. A detecção de sinal e amplificação das sondas foram realizadas utilizando avidina-fluoresceína isothiocyanato (FITC) e anti-avidina-biotina conjugadas. Os cromossomos foram identificados com microscópio epifluorescente Olympus BX53 utilizando o software cellSens Dimension® e as medidas foram feitas no Image Pro Plus®, classificando os cromossomos como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t) (Levan et al., 1964).

O DNA foi extraído a partir de fígado, músculo e brânquias preservados em álcool (Boyce et al. 1989). As análises incluíram tecidos doados (Anexo III). Fragmentos de citocromo oxidase subunidade I (COI) dos espécimes foram amplificados utilizando os primers FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGG CA- 3') e FishR1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA- 3') (Ward et al., 2005). As reações de PCR foram realizadas utilizando 12.5 µL, sendo 8.6 µL de H₂O, 1.25 µL de tampão 10X (200 mM de Tris-HCl com pH 8.4, 500 mM KCl), 0.31 µL de MgCl₂ (100 mM), 0.05µL de dNTPs (20

mM), 0.12 μ L de cada primer (10 μ M), 0.063 μ L (2.5 U) de Taq polymerase (Phonectria) e 2 μ L de DNA(100 ng. μ l-1). A amplificação foi realizada a 94 °C (2 minutos), com 35 ciclos de 94 °C (30 segundos), 50 °C (1 minuto) e 72 °C (1 minuto), com extensão final a 72 °C (10 minutos). Fragmentos de gene ativador de recombinação-2 (RAG2) foram amplificados usando os primers RAG2bF (5'-GTRGARTAGTAGCGCTCCCA-3') e 176R (5'-AGAACAAAAGATCATTGCTGGTTCGGG-3') (Lovejoy, 1999). As reações de PCR foram realizadas usando 12.5 μ L, sendo 9.6 μ L de H₂O, 1.25 μ L de tampão 10X (200 mM de Tris-HCl com pH 8.4, 500 mM KCl), 0.31 μ L de MgCl₂ (100 mM), 0.1 μ L de dNTPs (20 mM), 0.12 μ L de cada primer (10 μ M), 0.063 μ L (2.5 U) de Taq polymerase (Phonectria) e 1 μ L de DNA(100ng. μ l-1). A amplificação foi realizada a 95 °C (5 minutos), com 36 ciclos de 95 °C (30 segundos), 52 °C (1 minuto) e 72 °C (1 minuto e 30 segundos), com extensão final a 72 °C (7 minutos). O produto amplificado foi purificado usando precipitação salina (PEG 8000) (20% polyethyleneglycol, 2.5 M NaCl) e sequenciado na Macrogen Corp., South Korea. As sequências foram alinhadas com CLUSTAL W (Higgins et al., 1994), implementado no software MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). O número de acesso ao GenBank para COI e RAG2 estão no Anexo IV. O modelo de evolução molecular que melhor se encaixa aos dados sera selecionado usando critérios de informação Akaike, de acordo com o software MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004). A análise de inferência Bayesiana (MB) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) foi realizada com dez milhões de cadeia Markov Monte Carlo (MCMC) e uma árvore filogenética foi amostrada a cada mil gerações. Das árvores iniciais, 25 % foram rejeitadas e as restantes foram utilizadas para topologia consenso. Uma análise de máxima parcimônia foi conduzida no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) e buscas heurísticas incluíram 1000 adições aleatórias de sequências usando o algoritmo TBR. O sinal filogenético foi estimado usando 1000 pseudo replicações de bootstrapping (Felsenstein, 1985).

Resultados

Os espécimes de *D. pedri* apresentaram número diplóide $2n=50$, com fórmula cariotípica $12m+12sm+20st+6t$ (figura 1a). A banda C evidenciou pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, distribuída na região centromérica dos pares 1, 4, 5, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24 e 25, e na região intersticial do braço maior dos pares 8, 16 e 20 (figura 1b). A impregnação por nitrato de prata nas regiões organizadoras do nucléolo (Ag-NORs) evidenciou marcações no braço menor de dois cromossomos submetacêntricos (figura

2a) e de dois cromossomos subtelocêntricos. O FISH com sonda 5S marcou os braços menores de um par de cromossomos subtelocêntricos; enquanto que a sonda 18S mostrou 10 marcações terminais: no braço maior do par metacêntrico maior, no braço menor de um par de cromossomos subtelocêntricos e um par de telocêntricos e no braço maior e menor de um par de cromossomos subtelocêntricos (figura 2b).

Foi realizado o alinhamento de 565 pb para COI e 997 pb para RAG2. O melhor modelo estimado com MrModeltest foi GTR+I+G e SYM+I+G para COI e RAG2, respectivamente. A árvore da COI mostrou estreita relação filogenética entre *D. pedri* e *D. singularis*, conformando o clado 1, enquanto que *D. parahybae* e *D. iguape* apareceram como membros do grupo irmão, o clado 2, e mais aparentados com *Astyanax giton*, *Astyanax intermedius*, *Astyanax ribeirae*, *A. scabripinnis* e *P. heterostomus*. Esses dois cladogramas, juntamente com *S. typhlops*, o caracádeo de lençol freático da bacia do rio São Francisco, compõem o clado 3 (Figura 3). A árvore da RAG2 confirmou as relações filogenéticas entre *D. pedri*, *D. iguape*, *P. heterostomus* e *S. typhlops* (Figura 4).

Discussão

Os resultados cariotípicos indicam uma grande diferença com o cariótipo de *D. pedri* indicado por Portela et al. (1988) os quais o descreveram como $2n = 14m/sm+36st/t$. Porém, é possível que a espécie em questão seja *D. iguape*, já que o local de coleta, rio Ipiranga, faz parte da bacia rio Ribeira de Iguape, na qual esta espécie foi descrita. Esta espécie teve sua distribuição ampliada para a região que abrange desde a ilha do Cardoso até o rio Quilombo, estado de São Paulo (Lucena et al., 2002). Por esses motivos, os dados de Portela et al. (1988) serão referidos como *D. iguape*.

O número diplóide $2n=50$ é considerado plesiomórfico para *Astyanax* (Vicari et al., 2008). Os diferentes números diplóides encontrados em algumas populações são atribuídos a fissões e fusões dos cromossomos. *D. pedri* também apresentou $2n=50$, assim como *D. stigmaturus* (Mendes et al., 2011), *D. iguape* (Portela et al., 1988), *H. nana* (Moreira et al., 2007), *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Oliveira et al., 1988), *P. heterostomus* (Oliveira et al., 1988), *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Oliveira et al., 1988), *Hemigrammus rhodostomus* (Oliveira et al., 1988), *Moenkhausia intermedia* (Portela et al., 1988) e *Thayeria boehlkei* (Oliveira et al., 1988).

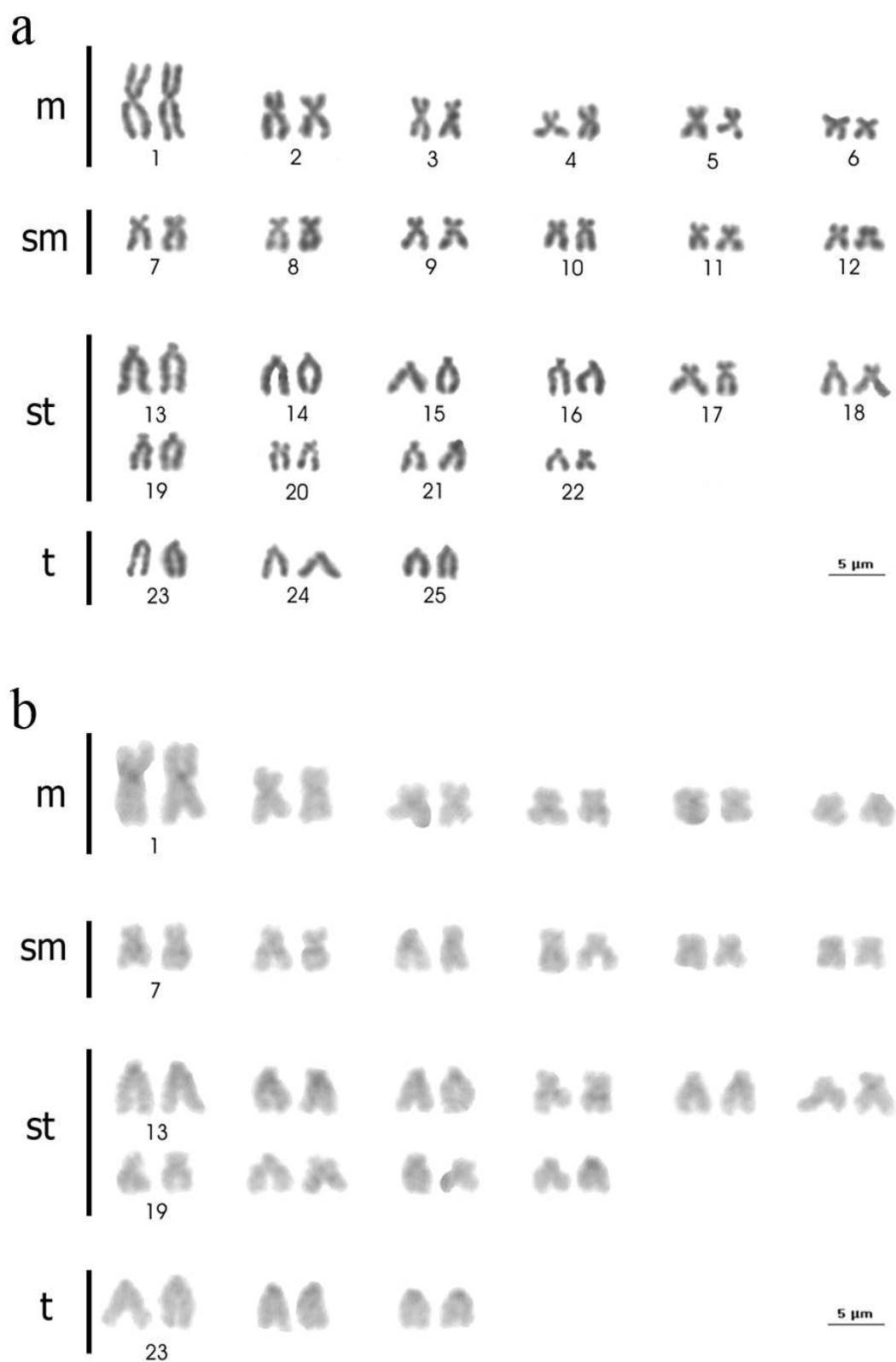


Fig. 1 Cariótipos de *Deuterodon pedri* após coloração convencional por Giemsa (a) e banda C (b).

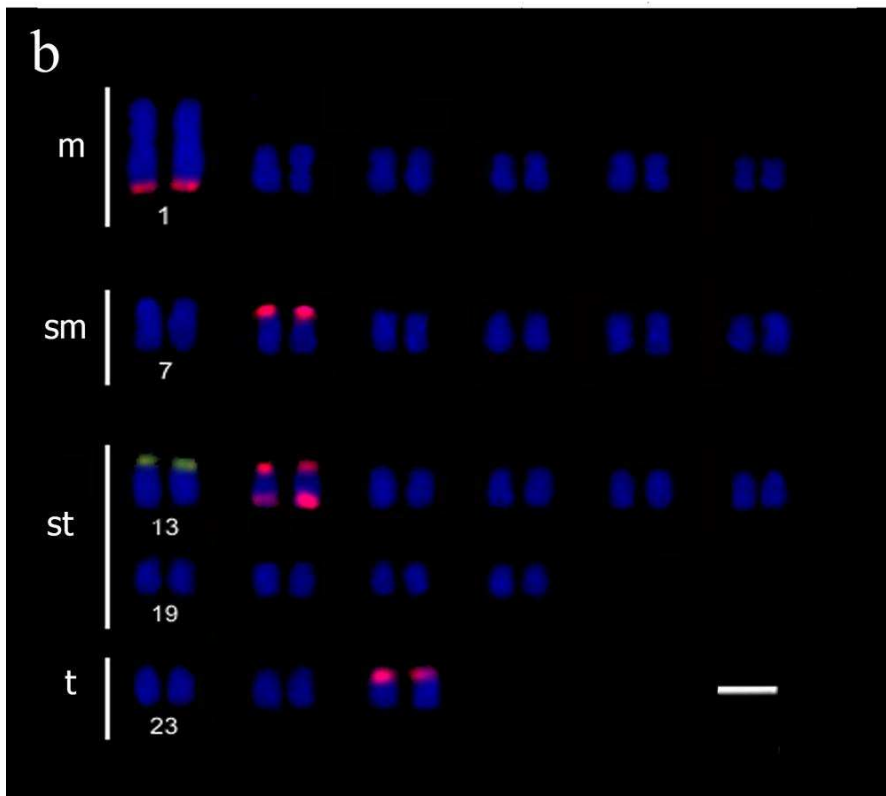
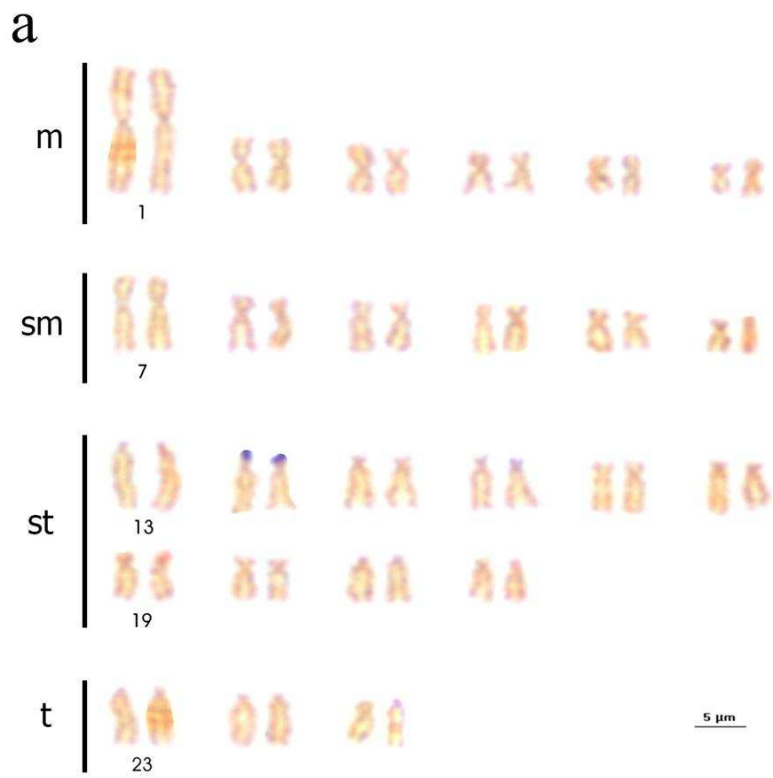


Fig. 2 Cariótipos de *Deuterodon pedri* após Ag-NOR (a) e FISH (b) com sondas 18S (vermelho) e 5S (verde).

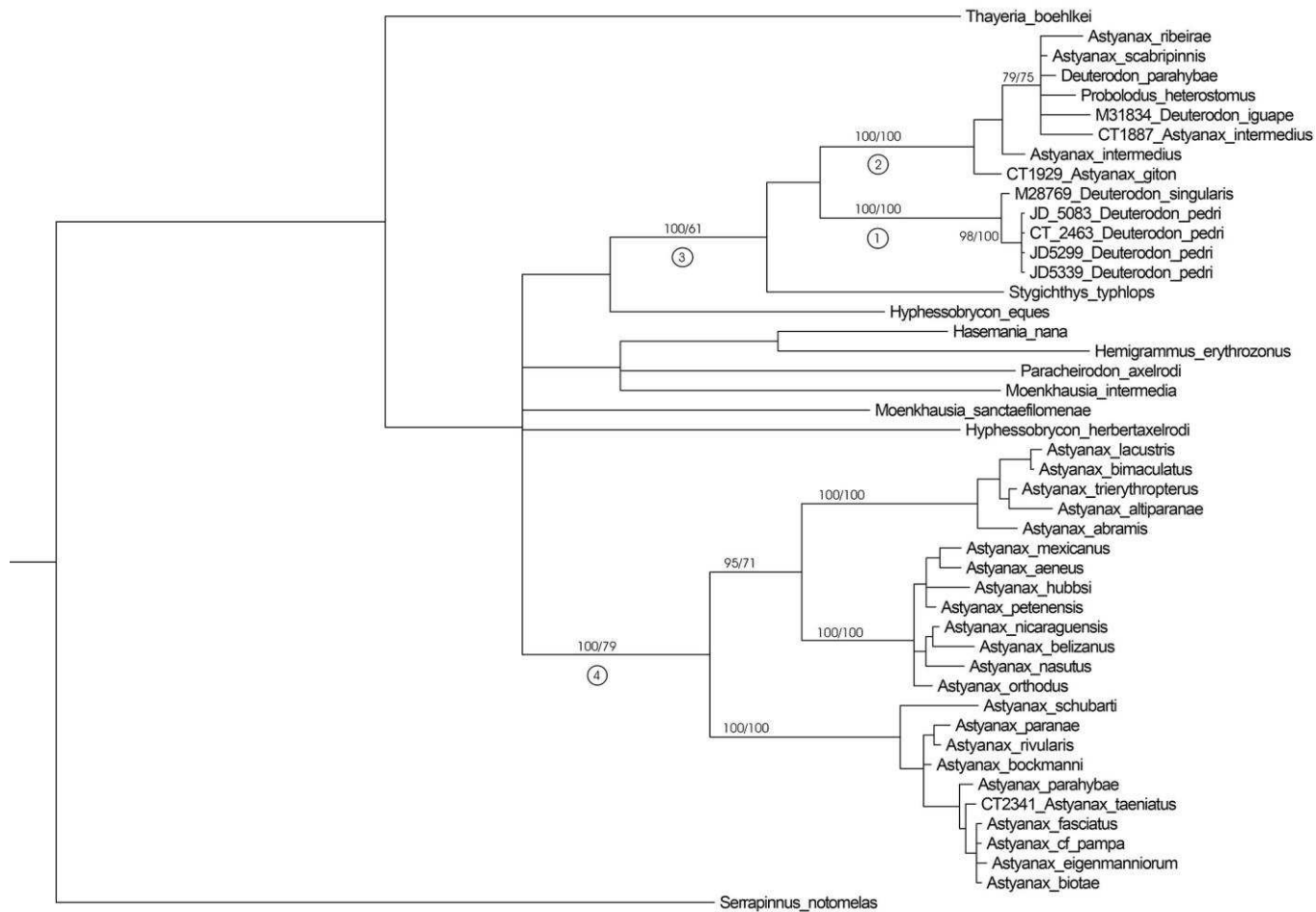


Fig. 3 Cladograma de Bayesiana baseado no gene citocromo oxidase subunidade I de *Deuterodon pedri* e seqüências de outras espécies retiradas do GenBank. Números acima dos ramos são probabilidade posterior de Bayesiana e bootstrap de máxima parcimônia, respectivamente. Números circulos abaixo dos ramos são referentes aos clados.

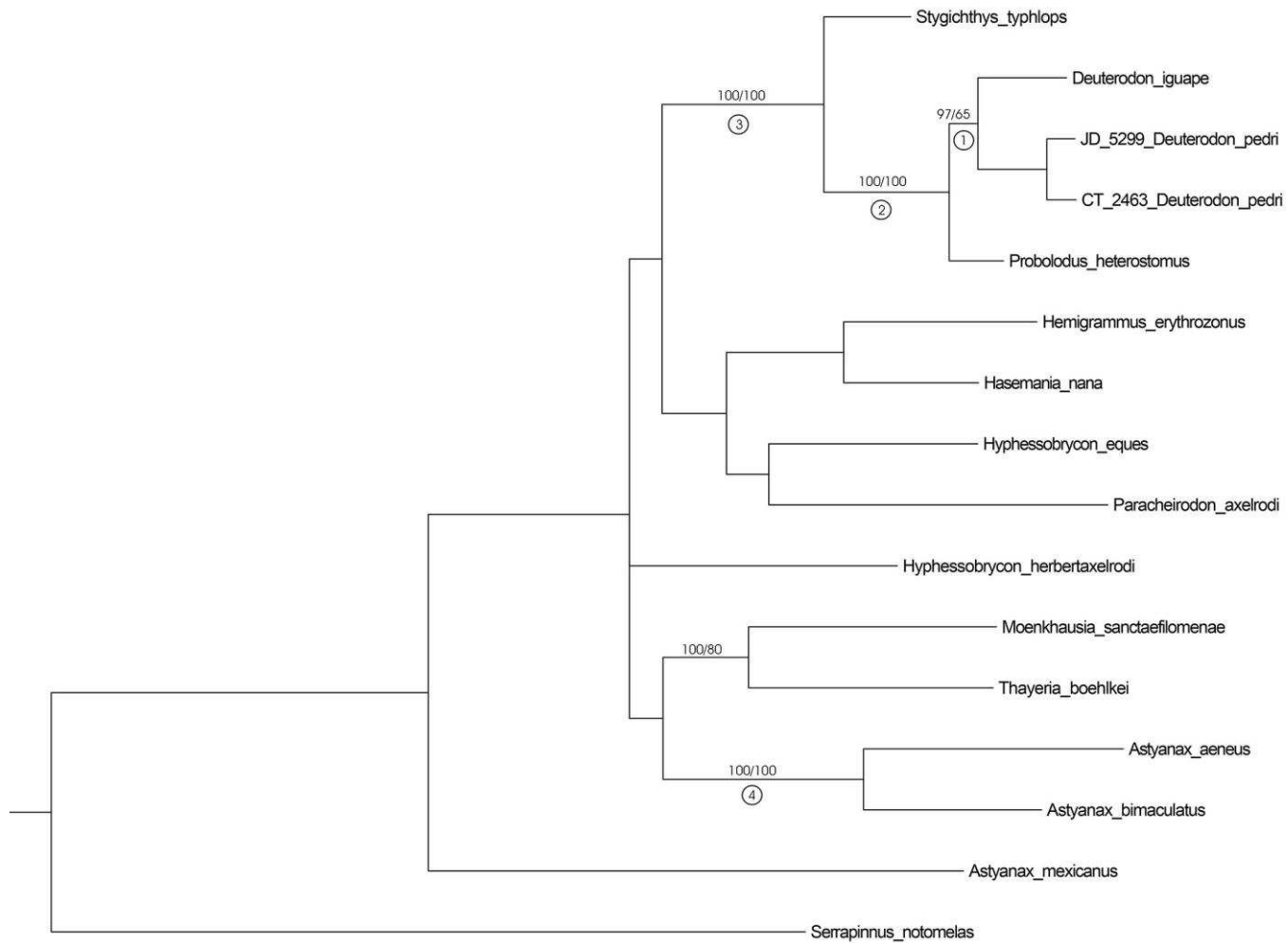


Fig. 4 Cladograma de Bayesiana baseado no gene ativador de recombinação-2 de *Deuterodon pedri* e sequências de outras espécies retiradas do GenBank. Números acima dos ramos são probabilidade posterior de Bayesiana e bootstrap de máxima parcimônia, respectivamente. Números circulosados abaixo dos ramos são referentes aos cladros.

Embora o primeiro par de cromossomos metacêntricos seja constante e defina o cariótipo dos caracídeos (Kavalco et al., 2009), a forma dos demais cromossomos é altamente variável. Diferentemente de *D. pedri*, *D. stigmaturus* apresenta fórmula cariotípica $8m+6sm+2st+34t$ (Mendes et al., 2011) enquanto que *D. iguape* apresenta $14m/sm+36st/t$ (Portella et al., 1988). Assim, os cariótipos de *D. stigmaturus* e de *D. iguape* assemelham-se mais entre si do que com *D. pedri*.

A região de heterocromatina constitutiva geralmente está associada às regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos (Martins, 2007). Esse padrão é compartilhado por *D. pedri*, *D. stigmaturus* (Mendes et al., 2011), *Astyanax eigenmanniorum* (Mendes et al., 2011), *Astyanax* sp. (Medrado et al., 2012), *A. scabripinnis* (Vicari et al., 2008), *H. nana* (Moreira et al., 2007) e *Hyphessobrycon eques* (Martinez et al., 2012). Além disso, blocos heterocromáticos intersticiais

foram encontrados em *D. pedri*, *M. sanctaefilomenae* (Portela-Castro et al., 2001; Hashimoto et al., 2012), *A. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza & Moreira-Filho, 1995; Vicari et al., 2008), *Astyanax altiparanae* (Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001), *A. giton* e *A. intermedius* (Kavalco et al., 2007). Kantek et al. (2007) atribuíram as marcações intersticiais observadas em *Astyanax* sp. D a inversões paracêntricas.

A impregnação por nitrato de prata evidenciou múltiplas NORs em *D. pedri*, com variações intra e interindividuais. Essa variação é comumente reportada para *D. stigmaturus* (Mendes et al., 2011), *M. sanctaefilomenae* (Hashimoto et al., 2012), *A. scabripinnis* (Vicari et al., 2008) e *A. fasciatus* (Pazza et al., 2006). Diferentemente de *D. pedri*, *D. stigmaturus* (Mendes et al., 2011) e *H. nana* (Peres et al., 2008) apresentaram, respectivamente, oito e seis marcações com a sonda 18S em regiões terminais dos cromossomos. As espécies de *Astyanax* possuem grande variedade de números de rDNA 18S (Almeida-Toledo et al., 2002; Pazza et al., 2006; Vicari et al., 2008; Mendes et al., 2011). A marcação do sítio 18S está ligada à região organizadora de nucléolos. Geralmente, o FISH com sonda 18S apresenta muito mais regiões organizadoras do nucléolo do que a impregnação por prata, porque na hibridização a sonda interliga-se ao gene, enquanto a prata precipita apenas em NORs transcricionalmente ativas (Sumner, 2003).

Em *D. pedri*, o rDNA 5S está presente em um par de cromossomos subtelocêntricos homólogos. O mesmo ocorre em algumas espécies de *Astyanax*, como *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2006). Entretanto, a região do gene 5S geralmente ocorre em dois pares de cromossomos homólogos: na região proximal de um par de cromossomos

metacêntricos, na maioria das espécies de *Astyanax* (Pazza et al., 2008), e na região telomérica de um par de cromossomos telocêntricos (Ferro et al., 2001; Almeida-Toledo et al., 2002; Kavalco et al., 2004; Pazza et al., 2008; Ferreira-Neto et al., 2012). Apenas em *A. giton* e *A. intermedius* foram encontrados mais de 10 sítios de 5S (Kavalco et al., 2004). Assim, este caráter não parece ser informativo para determinar grupos monofiléticos dentro dos Characidae.

Os dados da COI não são consistentes com análises morfológicas que separam *D. pedri* de algumas espécies de *Deuterodon*. *D. pedri* e *D. parahybae*, espécies antes consideradas como não verdadeiramente relacionadas com *Deuterodon* por não apresentarem todos os caracteres osteológicos que Lucena & Lucena (2002) consideraram sinapomórficos para o gênero, mostraram grande similaridade com *D. iguape* e *D. singularis*, espécies consideradas como parte da monofilia do gênero (Lucena & Lucena, 2002). Além disso, o cladograma da COI mostra *D. pedri* filogeneticamente mais aparentado a *D. singularis*, enquanto que *D. iguape* é mais aparentado com *D. parahybae*, o que contraria a afirmação de Pereira (2010) de que *D. pedri* e *D. parahybae* seriam mais aparentados entre si do que entre as outras espécies do gênero. Além disso, a árvore da COI mostrou dois grupos de *Astyanax*, clado 2 e clado 4, sendo que *A. intermedius*, *A. giton*, *A. scabripinnis*, *A. ribeirae*, *D. iguape*, *D. pedri* e *D. singularis* agruparam com os mesmos indivíduos do clado 57 de Oliveira et al. (2011). A árvore da RAG2 reforça a proximidade de *D. pedri* e *D. iguape*.

Em termos de morfologia, o clado 3 é formado por indivíduos com dentições muito distintas. As quatro espécies de *Deuterodon*, *A. giton*, *A. intermedius* e *A. ribeirae* possuem duas fileiras de dentes no pré-maxilar e dentes do dentário decrescendo gradualmente (Eigenman, 1921). *A. scabripinnis* e *S. typhlops* possuem duas fileiras de dentes no pré-maxilar, porém os dentes do dentário decrescem abruptamente (Eigenman, 1921; Moreira et al., 2010). *P. heterostomus* possui dentes bem separados, sendo três no prémaxilar, formando apenas uma fileira, e cinco dentes de tamanho similar no dentário (Roberts, 1970), uma especialização divergente derivada de sua dieta lepidófaga. A presença de espécies com diferentes dentições nesse grupo e de *A. taeniatus* no grupo irmão sugere que dentes do dentário decrescendo gradualmente em tamanho posteriormente, a partir da sínfise (Eigenmann, 1927) não podem ser considerados uma sinapomorfia, conforme observado por Lucena & Lucena (2002). A árvore de RAG2 reforça o estreito parentesco filogenético entre *D. pedri*, *D. iguape*, *P. heterostomus* e *S. typhlops*.

A existência de linhagens diferentes de *Astyanax* e a estreita relação de algumas de suas espécies com outros gêneros são sustentados por estudos morfológicos (Mirande, 2009) e moleculares (Calcagnotto et al., 2005; Ornelas-Garcia et al., 2008; Javonillo et al., 2010), sendo o gênero *Astyanax* considerado parafilético. Várias espécies de *Bramocharax* teriam surgido a partir de *Astyanax* no México e na América Central (Ornelas-Garcia et al., 2008). Da mesma forma, Eigenmann (1927) e Géry (1977) consideram *Deuterodon* estreitamente relacionado com algumas espécies de *Astyanax*, o que é confirmado neste estudo, onde *D. parahybae* e *D. iguape* estão aparentados com *Astyanax* e *Probolodus*.

Todas as espécies que compõem o clado 3, exceto *S. typhlops*, tem distribuição costeira. As bacias costeiras do Brasil começaram a ser formadas durante a divisão da Gondwana (e.g. Ribeiro, 2006). Durante os períodos glaciais, a ictiofauna pode se difundir entre as bacias costeiras devido ao baixo nível do mar, que favorece a confluência dos rios adjacentes; durante os períodos interglaciais, níveis elevados de mar envolvem a parte inferior de sistemas de drenagem, resultando em especiação dentro de bacias hidrográficas isoladas (Weitzman et al., 1988). Além disso, a similaridade da ictiofauna entre bacias costeiras e continentais podem ser explicadas por captura de cabeceira (stream capture), chamado de padrão C por Ribeiro (2006), em que eventos tectônicos causam a ligação entre bacias hidrográficas antes isoladas, o que pode ocasionar compartilhamento de espécies (Ribeiro, 2006). A diversidade citogenética e molecular encontrada em *Hoplias malabaricus* pode ser explicada por ambas as hipóteses (Pereira et al., 2013). As alterações eustáticas marinhas foram consideradas relevantes para explicar os padrões de espécies de *Mimagoniates* (Weitzman et al., 1988) e de algumas espécies de *Oligosarcus* (Menezes, 1988). Este processo também poderia explicar o estreito parentesco entre *D. pedri* e *D. singularis*. As principais bacias costeiras do Atlântico possuem grande sistema de ramificação de cabeceiras que encostam as cabeceiras do leste do São Francisco (Buckup, 2011), o que pode ser a causa da similaridade genética entre *S. typhlops* e as demais espécies do clado 3, e sugere uma antiga ligação entre as bacias.

Estudos citogenéticos com as espécies de *Deuterodon* ainda são incipientes, mas já é possível notar certas similaridades entre os resultados de banda C, NOR e FISH com a sonda 18S de *D. pedri* e *D. stigmaturus*. As relações filogenéticas entre as espécies do clado 3 mostram que *Deuterodon* forma um grupo polifilético, com relações estreitas com os gêneros *Astyanax*, *Probolodus* e *Stygichthys*, provavelmente um clado antigo, formado nas bacias

costeiras do Brasil, que diversificou tanto através da dispersão de peixes durante os períodos glaciais, quanto por captura de cabeceira.

Referências

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., OZOUF-COSTAZ, C., FORESTI, F., BONILLO, C., PORTO-FORESTI, F., & DANIEL-SILVA, M. F. Z. (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetic and genome research*, 97(3-4), 229-233.
- BOYCE, T. M., ZWICK, M. E., & AQUADRO, C. F. (1989). Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123, 825-836.
- BUCKUP, P. A. (2011). The eastern Brazilian shield. In: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Eds Albert & Reis). The Regents of the University of California, Berkeley, California, USA, 203-210.
- CALCAGNOTTO, D., SCHAEFER, S. A., & DESALLE, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 36(1), 135-153.
- CIOFFI, M. B., MARTINS, C., BERTOLLO, L. A. C. (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet* 10(34). doi: 10.1186/1471-2156-10-34
- DANIEL-SILVA, M. F. Z., & DE ALMEIDA TOLEDO, L. F. (2001). Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonoptera). *Caryologia-Firenze*, 54(3), 209-215.
- EIGENMANN, C. H. (1921). The American Characidae. Part 3. *Memoirs of Museum of Comparative Zoology*, 43, 209-310. Harvard College, Cambridge.
- EIGENMANN, C. H. (1927). The American Characidae. Part 4. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, 43, 311-428. Harvard College, Cambridge.
- EIGENMANN, C. H., McAtee, W. L., & Ward, P. D. (1907). On further collections of fishes from Paraguay. *American Carnegie Museum*, 4(7): 110-157.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- FERNANDES, C. A., & MARTINS-SANTOS, I. C. (2006). Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. *Caryologia*, 59(3), 253-259.
- FERREIRA-NETO, M., ARTONI, R. F., VICARI, M. R., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M., BAKKALI, M., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2012). Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative cytogenetics*, 6(1), 29.

- FERRO, D. A. M., NÉO, D. M., MOREIRA-FILHO, O., & BERTOLLO, L. A. C. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* **110**, 55-62. doi:10.1023/A:1017963217795
- GÉRY, J. (1977). *Characoids of the world*. Neptune: Tropical Fish Hobbyist. 672 p.
- HASHIMOTO, D. T., VOLTOLIN, T. A., PAES, A. D. N. V. A., FORESTI, F., BORTOLOZZI, J., & PORTO-FORESTI, F. (2012). Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). *Comparative cytogenetics*, 6(2), 141.
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- HOWELL, W. M., & BLACK, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1915.
- HUELSENBECK, J. P., & RONQUIST, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- JAVONILLO, R., MALABARBA, L. R., WEITZMAN, S. H., & BURNS, J. R. (2010). Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 498-511.
- KANTEK, D. L. Z., NOLETO, R. B., FENOCCHIO, A. S., & CESTARI, M. M. (2007). Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçú River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 67-74.
- KANTEK, D. L. Z., CESTARI, M. M., BERTOLLO, L. A. C., & MOREIRA-FILHO, O. (2009). Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. D (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguacu River (PR). *Folia Biologica Krakow*, 57, 1-2. doi:10.3409/fb571-2.37-41
- KAVALCO, K. F., BRANDÃO, K. D. O., PAZZA, R., & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. D. (2009). *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? *Genetics and molecular biology*, 32(3), 477-483.
- KAVALCO, K. F., PAZZA, R., & DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2009). *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica*, 136(1), 135-139.
- KAVALCO, K. F., PAZZA, R., BERTOLLO, L. A. C., & MOREIRA-FILHO, O. (2004). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 106(1), 107-110.
- KAVALCO, K. F., PAZZA, R., BERTOLLO, L. A. C., & MOREIRA-FILHO, O. (2007). Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 30(3), 529-535.
- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. *Genera incertae sedis in Characidae*. (2003). p. 134-141. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 729p.

- LOVEJOY, N. (1999). Systematics, biogeography and evolution of needlefishes (Teleostei: Belontiidae). Cornell University, Ithaca, NY.
- LUCENA, Z. M. S., KRUGER, A. R., & LUCENA, C. A. (2002) Novos registros de *Deuterodon iguape* Eigenmann nos rios litorâneos do sudeste do Brasil (Characiformes, Characidae). *Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 69, 10-11.
- LUCENA, C. A. S., CALEGARI, B. B., PEREIRA, E. H. L. & DALLEGRAVE E. (2013). O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 105, 20-24.
- LUCENA, C. A. S., & LUCENA Z. M. S. (2002). Redefinição do gênero *Deuterodon* Eigenmann (Ostariophysi: Characiformes:Characidae). *Museu da Ciência e Tecnologia PUCRS, série Zoologia* 15 (1), 113-135.
- LUCENA, C. A. S., & LUCENA Z. M. S. (2013). Designation of a lectotype for *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1908 (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, 3635 (5): 598–598.
- MARTINS, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 421–453, Science Publisher, Hauppauge.
- MARTINEZ, E. R., ALVES, A. L., SILVEIRA, S. M., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. (2012). Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comparative cytogenetics*, 6(1), 41.
- MARTINS, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics* (Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B. G., eds), pp. 421–453. Science Publisher, Hauppauge.
- MARTINS, C., FERREIRA, I. A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F.; & GALETTI JR, P. M. (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127, 133–141. doi: 10.1007/s10709-005-2674-y
- MEDRADO, A. S., RIBEIRO, M. S., AFFONSO, P. R. A. D. M., CARNEIRO, P. L. S., & COSTA, M. A. (2012). Cytogenetic divergence in two sympatric fish species of the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 797-801.
- MELO, F. A. D., & BUCKUP, P. A. (2006). *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 4(1), 45-52.
- MENDES, M. M., DA ROSA, R., GIULIANO-CAETANO, L., & DIAS, A. L. (2011). Karyotype diversity of four species of the incertae sedis group (Characidae) from different hydrographic basins: Analysis of AgNORs, CMA 3 and 18S rDNA. *Genetics and Molecular Research*, 10, 3596-3608.
- MENEZES, N. A. (1988). Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (PE Vanzolini & WR Heyer, eds.). *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, pp. 295-304.
- MIRANDE, M. J. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25(6), 574-613.

- MOREIRA, C. R., BICHUETTE, M. E., OYAKAWA, O. T., DE PINNA, M. C. C., & TRAJANO, E. (2010). Rediscovery and redescription of the unusual subterranean characiform *Stygichthys typhlops*, with notes on its life history. *Journal of fish biology*, 76(7), 1815-1824.
- MOREIRA-FILHO, O. & BERTOLLO, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics* 14, 331-357.
- MOREIRA, P. W. A., BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA-FILHO, O. (2007). Comparative cytogenetics between three Characidae fish species from the São Francisco River basin. *Caryologia*, 60(1-2), 64-68.
- NELSON, S.J. (2006). *Fishes of the World*, 600p. 3 Ed. United States of America: John Wiley & Sons.
- NYLANDER, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. In: *Evolutionary Biology Centre*. Uppsala Sweden. Uppsala University.
- OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FORESTI, F., BRITSKI, H. A., & TOLEDO-FILHO, S. D. A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics*, 11(57), 624.
- OLIVEIRA, C., AVELINO, G. S., ABE, K. T., MARIGUELA, T. C., BENINE, R. C., ORTÍ, G., VARI, R. P., & E CASTRO, R. M. C. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 275.
- ORNELAS-GARCÍA, C. P., DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O., & DOADRIO, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 340.
- PAZZA, R., KAVALCO, K. F., & BERTOLLO, L. A. C. (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112(3-4), 313-319.
- PAZZA, R., KAVALCO, S. A. F., PENTEADO, P. R., KAVALCO, K. F., & DEALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes)—a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, 72(8), 2002-2010.
- PEREIRA, T. N. A. (2010) Filogenia das espécies de *Deuterodon* Eigenmann, 1907 (Characiformes: Characidae), um gênero de lambaris da Mata Atlântica. *Dissertação (Mestrado)*. UNESP.
- PEREIRA, T. L., SANTOS, U., SCHAEFER, C. E., SOUZA, G. O., PAIVA, S. R., MALABARBA, L. R., SCHMIDT, E. E., & DERGAM, J. A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, 40(5), 905-914.
- PERES, W. A. M., BERTOLLO, L. A. C., & MOREIRA-FILHO, O. (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 222-226.
- PINKEL D, STRAUME T, GRAY J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 2934–2938. doi: 10.1073/pnas.83.9.2934

- PORTELA, A. L. B. S., GALETTI-JR., P. M., BERTOLLO, L. A. C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journals of Genetics* 11(1), 307-316.
- PORTELA-CASTRO, A. L. B., JÚNIOR, H. F. J., & NISHIYAMA, P. B. (2001). New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*, 110(3), 277-283.
- 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.
- ROBERTS, T. R. (1970). Scale-eating american characoid fishes: with special reference to *Probolodus heterostomus*. *California Academy of Sciences*, 38(20), 383-390.
- SOUZA, I. L., & MOREIRA-FILHO, O. (1995). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60, 1-14.
- SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromérica heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304-306.
- SUMNER, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*. John Wiley & Sons.
- SWOFFORD, D. L. (2002). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates. Sunderland: MA.
- VICARI, M. R., NOLETO, R. B., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO, O., & BERTOLLO, L. A. C. (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical inferences*. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 173-179.
- VIEIRA, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota*, 2(5), 5-22p.
- PORTELA, A. L. B. S., GALETTI JR, P. M., & BERTOLLO, L. A. C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 11(2), 307-316.
- OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FORESTI, F., BRITSKI, H. A., & TOLEDO-FILHO, S. D. A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics*, 11(57), 624.
- Tamura, K. P. D., Peterson, N. S. G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. & HEBERT, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1847-1857.
- WEITZMAN, S. H., MENEZES, N. A., & WEITZMAN, M. J. (1988). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 379-427.

5. Conclusão geral

A presença de um par heteromórfico nas fêmeas e homomórfico nos machos de *A. scabripinnis*, confirmado pelas técnicas de banda C, Ag-NOR e FISH com microssatélites, indica a existência de sistema de cromossomos sexuais tipo ZZ/ZW, um fato inédito dentro do gênero. Os dados moleculares indicam que esta população está estreitamente aparentada com outras populações com distribuição costeira.

O lambari endêmico do Santo Antônio, *D. pedri*, mostrou-se citogeneticamente similar a *D. stigmaturis* nas técnicas de banda C, NOR e FISH com a sonda 18S. A árvore do gene COI indicou que *D. pedri* é estreitamente aparentado com outra espécie do mesmo gênero, *Deuterodon singularis*, constituindo um clado polifilético com espécies de distribuição predominantemente costeira.

Este trabalho avaliou, com ferramentas citogenéticas e moleculares, a biodiversidade de peixes caracídeos de pequeno porte da bacia do rio Santo Antônio, enfatizando características únicas desta bacia e sua relevância para a conservação.

Anexos

Appendix I Cytotypes of *Astyanax scabripinnis* populations studied in the Neotropical. Population: collection site; 2n: diploid number; Bs: presence of B chromosome; NORs: number of chromosome carrying nucleolar organizer regions

Population	2n	Karyotypic formulae	Bs	NORs	Reference
Açungui River - Ribeira do Iguape Basin, coastal Basin	50	8m+18sm+10st+14t	0	2-10	31
Água do Rancho River (Maringá – PR) – Upper Paraná Basin	50	6m+28sm+16t	0-2	1-5	18, 19, 20
Amores Stream (PR) - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	48	8m+24sm+4st+12t	0	8	6
Apertados Stream (PR) - Upper Paraná Basin	48	6m+22sm+4st+16t	0	–	4
Apertados Stream (PR) - Upper Paraná Basin	72	9m+33sm+6st+24t	0	4	4
Barbosa Waterfall- Paranapanema Basin, Upper Paraná Basin	50	6m+16sm+14st+14a	0	2	27
Barreiro Grande Stream (Três Marias – MG) – São Francisco Basin	50	6m+30sm+8st+6t	0	1-4	21
Bicudos Creek (Brotas – SP) – Upper Paraná Basin	50	8m+20sm+14st+8t	0	–	22
Cambeba Stream (MG) - Upper Paraná Basin	50	8m+20sm+6st+16t	0	–	3
Canta Galo Stream (Itirapina – SP) – Upper Paraná Basin	48	6m+22sm+8st+12t	0	1-3	30
Canta Galo Stream (Itirapina – SP) – Upper Paraná Basin	50	4m+26sm+4st+16st	0	1-6	30
Capão Bonito River - Paranapanema Basin, Upper Paraná Basin	50	6m+16sm+14st+14a	0	2	27
Capivari Stream (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-1	1-4	7, 8
Carpas Lake (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-1	2-7	7, 8
Cascatinha Stream (Botucatu – SP) – Tietê Basin, Upper Paraná Basin	50	8m+22sm+10st+10t	0-1	1-4	11, 13
Cascatinha Stream (Botucatu – SP) – Tietê Basin, Upper Paraná Basin	50	6m+16sm+14st+14t	0-2	3	27, 28
Cascatinha Stream (Botucatu – SP) –	75	9m+39sm+12st+15t	2	3	28

Tietê Basin, Upper Paraná Basin					
Casquilho Creek (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-1	2	33
Centenário Stream (Maringá – PR) – Upper Paraná Basin	50	6m+20sm+8st+16t	0	1-4	1, 14, 15, 16, 21
Cintra Stream - Tietê Basin, Upper Paraná Basin	50	6m+20sm+14st+10a	0	2	27
Claro River (Salesópolis – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+24sm+8st+12t	0	1-3	21
Curral das Éguas Stream (São Gonçalo do Abaeté – MG) – São Francisco Basin	46	6m+22sm+8st+10t	0	1-5	1, 16, 21
Fojo River (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-2	1-6	7, 8
Funari Stream - Tietê Basin, Upper Paraná Basin	50	4m+18sm+16st+12a	0	2	27
Grande Creek (Campos do Jordão – SP) – Paraíba do Sul Basin (1800m altitude)	50	6m+22sm+10st+12t	0-2	1-2	7, 23, 24
Grande Creek (Campos do Jordão – SP) – Paraíba do Sul Basin (1920m altitude)	50	6m+22sm+10st+12t	0-2	1-2	7, 23, 24
Grande Creek (Campos do Jordão – SP) – Paraíba do Sul Basin (700m altitude)	50	6m+22sm+10st+12t	0	2-9	7, 23, 24
Índios River (PR) - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	48	8m+20sm+6st+14t	0	6	6
Jaguariaíva River (Cerrado State Park) - Jaguariaíva Basin, Upper Paraná Basin	48	10m+16sm+10st+12t	0	2-4	31
Jucu River (Vitor Hugo – ES) – Jucu River Basin, Coastal Basin	50	6m+8sm+36t	0-4	1-15	25
Lavrinha Farm Stream (Campos do Jordão – SP) – Paraíba do Sul Basin, Coastal Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-1	2-3	7
Ligeiro River (Maringá – PR) – Upper Paraná Basin	48	10m+22sm+2st+14t	0	1-4	19, 20
Macacos River - Paraíba do Sul Basin	50	8m+20sm+8st+14t	0	2-4	9, 10
Machado Stream (MG) - São Francisco Basin	50	6m+28sm+6st+10t	0	–	3
Marrecas Creek (Londrina – PR) – Upper Paraná Basin	48	6m+20sm+12st+10t	0	1-5	1, 14, 15, 16, 21
Monjolinho River (São Carlos – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+24sm+8st+12t	0	2-8	21

Pedra Branca Stream (MG) – Paraíba do Sul Basin	50	6m+24sm+8st+12t	0	–	3
Pedras Stream (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-2	2	17, 26, 32, 33
Pedras Stream (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	75	9m+33sm+15st+18t	2	2-3	5
Perdizes Creek (Campos do Jordão – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+10st+12t	0-2	2	33
Piracuama River (Tremembé – SP) – Paraíba do Sul Basin (1800m altitude)	50	6m+24sm+6st+14t	0	1-3	29
Piracuama River (Tremembé – SP) – Paraíba do Sul Basin (780m altitude)	50	4m+10sm+6st+30t	0	5-11	29
Santo Antônio River (Cerrado State Park) - Jaguariaiva Basin, Upper Paraná Basin	48	10m+16sm+10st+12t	0	2-5	31
Santo Antônio River (Cerrado State Park) - Jaguariaiva Basin, Upper Paraná Basin	50	8m+18sm+10st+14t	0	1-4	31
São Domingos Stream - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	48	10m+20sm+8st+10t	1	3	2
Sarandi Creek (Maringá – PR) – Upper Paraná Basin	50	6m+26sm+4st+14t	0	1-5	19, 20
Tamanduá Creek (Itatinga – SP) – Upper Paraná Basin	48	6m+28sm+4st+10t	0	1-2	12
Tamanduá Creek (Itatinga – SP) – Upper Paraná Basin	50	6m+26sm+4st+14t	0	1-4	12
Tamboara Stream - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	48	10m+24sm+6st+8t	0	7	2
Tatupeba Stream (PR) - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	46	8m+22sm+6st+10t	2	–	6
Tatupeba Stream (PR) - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	48	8m+26sm+6st+8t	1	–	6
Tatupeba Stream (PR) - Ivaí Basin, Upper Paraná Basin	50	6m+22sm+6st+16t	1	–	6
Verde River (Castro - PR) - Tibagi Basin, Upper Paraná Basin	50	8m+18sm+10st+14t	0	2-7	31
Viveiro de Mudanças Stream (Três Marias – MG) – São Francisco Basin	50	6m+30sm+8st+6t	0	1-7	1, 16, 21
Yukatan River (Maringá – PR) – Upper Paraná Basin	50	6m+30sm+4st+10t	0-1	1-3	18, 19, 20

1 - Abel et al. (2006), 2 - Alves et al. (2002), 3 - Biavati & Maistro (2007), 4 - Cristina et al. (2003), 5 - Fauaz et al. (1994), 6 - Fernandes & Martins-Santos (2005), 7 - Ferro et al. (2001), 8 - Ferro et al. (2003), 9 - Kavalco & Moreira-Filho (2003), 10 - Kavalco et al. (2007), 11 - Maistro et al. (1994), 12 - Maistro et al. (2000), 13 - Maistro et al. (2001), 14 - Mantovani et al. (2000), 15 - Mantovani et al. (2004), 16 - Mantovani et al. (2005), 17 - Mestriner et al. (2000), 18 - Mizoguchi & Martins-Santos (1997), 19 - Mizoguchi & Martins-Santos (1998a), 20 - Mizoguchi & Martins-Santos (1998b), 21 - Moreira-Filho & Bertollo (1991), 22 - Morelli et al. (1983), 23 - Néo et al. (2000a), 24 - Néo et al. (2000b), 25 - Rocon-Stange & Almeida-Toledo (1993), 26 - Salvador & Moreira-Filho (1992), 27 - Santos et al. (2012a), 28 - Santos et al. (2012b), 29 - Souza & Moreira-Filho (1995), 30 - Souza et al. (1996), 31 - Vicari et al. (2008b), 32 - Vicari et al. (2011), 33 - Vicente et al. (1996).

Appendix II Cytochrome oxidase subunit I gene sequences of *Astyanax* species obtained from GenBank

Species	River Basin	Genbank access number
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Paraíba do Sul	GU702186.1
<i>Astyanax bimaculatus</i>	São Francisco	HM405065.1
<i>Astyanax biotae</i>	Upper Paraná	JN988716.1
<i>Astyanax bockmani</i>	Upper Paraná	JN988728.1
<i>Astyanax intermedius</i>	Paraíba do Sul	GU702129.1
<i>Astyanax fasciatus</i>	São Francisco	JQ353547.1
<i>Astyanax fasciatus</i>	Upper Paraná	JQ353558.1
<i>Astyanax lacustris</i>	São Francisco	HM404906.1
<i>Astyanax parahybae</i>	Paraíba do Sul	GU702088.1
<i>Astyanax paranae</i>	Upper Paraná	JQ353605.1
<i>Astyanax ribeirae</i>	Upper Paraná	JQ353623.1
<i>Astyanax rivularis</i>	São Francisco	JQ353631.1
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Paraíba do Sul	GU702120.1
<i>Astyanax schubarti</i>	Upper Paraná	JN988744.1
<i>Astyanax thrierythropterus</i>	Upper Paraná	JN988749.1
<i>Triportheus angulatus</i>	Brazil	GU060427.1

Anexo III Espécimes com tecidos doados utilizados para extração de DNA

Espécies	Voucher	Doador	Instituição	Localidade
<i>Astyanax giton</i>	CT 1929	J. A. Dergam	UFV	Bacia do rio Doce
<i>Astyanax intermedius</i>	CT 1887	J. A. Dergam	UFV	Bacia do rio Doce
<i>Astyanax taeniatus</i>	CT 2341	J. A. Dergam	UFV	Bacia do rio Doce
<i>Deuterodon iguape</i>	MCP 28769	C. A. S. Lucena	PUCRS	Bacia hidrográfica da Baixada Santista
<i>Deuterodon singularis</i>	MCP 31834	C. A. S. Lucena	PUCRS	Bacia do rio das Madres

Anexo IV Sequências do gene citocromo oxidase subunidade I e do gene ativador de recombinação-2 de diversos espécimes retiradas do GenBank

Espécie	Número do GenBank	Gene	Localidade
<i>Astyanax abramis</i>	JQ353527.1	COI	Bacia do rio Paraguai
<i>Astyanax aeneus</i>	FJ439396.1	COI	América Central
<i>Astyanax altiparanae</i>	JN988714.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Astyanax belizanus</i>	FJ439401.1	COI	América Central
<i>Astyanax bimaculatus</i>	HM405065.1	COI	Bacia do rio São Francisco
<i>Astyanax biotae</i>	JN988722.1	COI	-
<i>Astyanax bockmanni</i>	JN988727.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Astyanax fasciatus</i>	JQ353577.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	JX111680.1	COI	Argentina
<i>Astyanax hubbsi</i>	FJ439389.1	COI	América Central
<i>Astyanax lacustris</i>	HM404906.1	COI	Bacia do rio São Francisco
<i>Astyanax intermedius</i>	GU702130.1	COI	Bacia do Paraíba do Sul
<i>Astyanax mexicanus</i>	GU702225.1	COI	EUA
<i>Astyanax nasutus</i>	FJ439390.1	COI	América Central

<i>Astyanax nicaraguensis</i>	FJ439380.1	COI	América Central
<i>Astyanax orthodus</i>	FJ439407.1	COI	América Central
<i>Astyanax cf. pampa</i>	JX111675.1	COI	Argentina
<i>Astyanax paranae</i>	JQ353620.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Astyanax parahybae</i>	GU702088.1	COI	Bacia do Paraíba do Sul
<i>Astyanax petenensis</i>	FJ439408.1	COI	América Central
<i>Astyanax ribeirae</i>	JQ353627.1	COI	Bacia do rio Ribeira do Iguape
<i>Astyanax rivularis</i>	JQ353631.1	COI	Bacia do rio São Francisco
<i>Astyanax scabripinnis</i>	HQ557153.1	COI	Bacia do Paraíba do Sul
<i>Astyanax schubarti</i>	JN988745.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Astyanax trierythropterus</i>	JN988749.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Deuterodon parahybae</i>	GU702111.1	COI	Bacia do Paraíba do Sul
<i>Hasemania nana</i>	FJ749062.1	COI	-
<i>Hemigrammus erythrozonus</i>	JF800988.1	COI	-
<i>Hyphessobrycon eques</i>	FJ749057.1	COI	-
<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	FJ749053.1	COI	-
<i>Moenkhausia intermedia</i>	GU701944.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	FJ749056.1	COI	-
<i>Paracheiroidon axelrodi</i>	JQ667559.1	COI	Bacia do rio Amazonas
<i>Probolodus heterostomus</i>	GU702125.1	COI	Bacia do Paraíba do Sul
<i>Serrapinnus notomelas</i>	HM126642.1	COI	Bacia do rio Paraná Superior
<i>Stygichthys typhlops</i>	HM405019.1	COI	Bacia do rio São Francisco
<i>Thayeria boehlkei</i>	FJ749063.1	COI	-
<i>Astyanax aeneus</i>	HQ289511.1	RAG2	-
<i>Astyanax bimaculatus</i>	AY804025.1	RAG2	-

<i>Astyanax mexicanus</i>	HQ289510.1	RAG2	-
<i>Deuterodon iguape</i>	HQ289460.1	RAG2	-
<i>Hasemania nana</i>	FJ749104.1	RAG2	-
<i>Hemigrammus erythrozonus</i>	AY804081.1	RAG2	-
<i>Hyphessobrycon eques</i>	AY804080.1	RAG2	-
<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	FJ749097.1	RAG2	-
<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	AY804104.1	RAG2	-
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	FJ749102.1	RAG2	-
<i>Probolodus heterostomus</i>	HQ289451.1	RAG2	-
<i>Serrapinnus notomelas</i>	KC196409.1	RAG2	-
<i>Stygichthys typhlops</i>	HQ289500.1	RAG2	-
<i>Thayeria boehlkei</i>	FJ749105.1	RAG2	-