

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

MARIANE GAVAZZONI

UMA ABORDAGEM SISTEMÁTICA EM ESPÉCIES DE *Astyanax*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE, *INCERTAE SEDIS*) DA BACIA DO ALTO-  
MÉDIO RIO URUGUAI ATRAVÉS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA BÁSICA E  
MOLECULAR.

CASCADEL - PR  
FEVEREIRO - 2016

MARIANE GAVAZZONI

UMA ABORDAGEM SISTEMÁTICA EM ESPÉCIES DE *Astyanax*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE, *INCERTAE SEDIS*) DA BACIA DO ALTO-  
MÉDIO RIO URUGUAI ATRAVÉS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA BÁSICA E  
MOLECULAR.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientador: Dr. Vladimir Pavan Margarido

Coorientador: Dr. Weferson Junio da Graça

CASCADEL - PR  
FEVEREIRO - 2016

*Dedico este trabalho aos meus  
pais e ao meu incentivador e  
companheiro Gilson, por me  
apoiarem sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, que possibilitou a realização das minhas atividades. Ao Programa de Pós Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, a coordenação e a secretária. Aos professores, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

A Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), FPTI (Fundação Parque Tecnológico Itaipu) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento de projetos e pela bolsa concedida.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por autorizar a captura dos peixes. A Unioeste, ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) e ao Parque Nacional do Iguaçu, Macuco Safari pelo apoio logístico.

Ao Professor Dr. Vladimir Pavan Margarido pela orientação e pela oportunidade de trabalho, por toda a paciência, apoio, pelos ensinamentos, por exigir sempre o melhor, pelas coletas e por dar excelentes condições para que todos os alunos do laboratório pudessem realizar trabalhos cada vez melhores. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça pela coorientação e identificação dos exemplares.

A Profa. Dra. Carla Simone Pavanelli por todas as contribuições e auxílio na coleta dos exemplares.

Ao doutorando Carlos A. M. Oliveira pela identificação dos exemplares e pelas contribuições realizadas.

Aos professores do laboratório de Biologia e Conservação de Anamniotas, Vladimir Pavan Margarido, Jociléia Thums Konerat, Rafaela Maria Moresco e Roberto Laridondo Lui, muito obrigada pelos ensinamentos, contribuições e pelas conversas! A todos os integrantes do laboratório, que de uma forma ou de outra contribuíram com minha formação e com a realização deste trabalho.

A todos os que participaram das coletas, especialmente ao Vladimir Pavan Margarido, Rafaela Maria Moresco, Roberto Laridondo Lui, Lucas Baumgartner, Leonardo Marcel Paiz, Geraldo S. Zientarski, Adélio Ortiz e Fernandes J. Luzzi.

Aos meus colegas e amigos: Gisele, Simone, Dayane, Leonardo, Lucas, Jéssica, Polyanna e Loana. Obrigada por fazerem parte da minha vida, pelas risadas, pelo apoio, ensinamentos e pela parceria em todos os momentos!

A minha família pela compreensão e apoio incondicional! Em especial ao meu companheiro de vida Gilson, obrigada pelo seu carinho, amor, paciência e compreensão, por me amparar em todos os momentos e por sempre acreditar em mim.

Obrigada a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram com a minha formação e com a realização deste trabalho, aos antigos e novos amigos e aos que estiveram e estarão ao meu lado sempre.

Muito obrigada a todos!!!

## RESUMO

*Astyanax* é um taxon polifilético com grande riqueza de espécies e ampla distribuição geográfica. Compreende espécies com formas bastante semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas que dificultam a identificação e o estabelecimento das relações filogenéticas. Com o objetivo de fornecer dados que contribuam com a citogenética, taxonomia e sistemática de *Astyanax*, foram realizadas análises citogenéticas em dez espécies de *Astyanax* de três bacias hidrográficas. Foram coletados exemplares de *Astyanax altiparanae* e *A. aff. fasciatus* na bacia do Alto rio Paraná; *A. abramis* e *A. asuncionensis* na bacia do Médio-Baixo rio Paraná; e *A. cf. aramburui*, *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus*, *A. jacuhiensis*, *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* e *Astyanax* sp. na bacia do Alto-Médio rio Uruguai. Os resultados mostraram variação interespecífica no número diplóide, de  $2n=46$  cromossomos em *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus*,  $2n=48$  cromossomos em *A. eigenmanniorum*, e  $2n=50$  cromossomos nas demais espécies. As AgRONS, confirmadas pela 18S rDNA-FISH, evidenciaram espécies portando sítios simples e espécies portando sítios múltiplos (até 10 cístrons em *Astyanax* sp.), confirmando a alta variabilidade encontrada no gênero. Nas espécies do complexo *A. bimaculatus* (*A. abramis*, *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis* e *A. asuncionensis*), foram evidenciadas RONS simples, característica plesiomórfica para o complexo. FISH com sonda de 5S rDNA evidenciou uma condição mais conservada, com cístrons centroméricos em pelo menos um par de cromossomos metacêntricos e em um par de cromossomos subtlocêntricos/acrocêntricos, porém com variação interespecífica, demonstrando ser um importante marcador na caracterização e diferenciação destas espécies. O padrão de distribuição da heterocromatina mostrou-se distinto para as espécies, com exceção de *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), onde foi verificada semelhança citogenética que podem indicar maior proximidade entre estas espécies quando comparadas com as demais analisadas, sendo que a distribuição dos genes 5S rDNA se mostrou importante na diferenciação destas espécies crípticas. Os resultados relatam os primeiros dados citogenéticos para *A. cf. paris* e reforçam sua semelhança citogenética com outras espécies congêneres, além de relatar a ocorrência de uma espécie de *Astyanax* ainda não descrita taxonomicamente. Em suma, os resultados do presente estudo fornecem dados que auxiliam na taxonomia e sistemática do “clado *Astyanax*” e “clado *Astyanax paris*”, reforçando a necessidade de revisões amplas, principalmente nos complexos *A. bimaculatus* e *A. fasciatus* que incluam marcadores como 5S rDNA e padrão de distribuição da heterocromatina, para melhor compreensão das relações filogenéticas em *Astyanax*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Astyanax paris*; bandamento C; complexos de espécies; FISH-rDNA; RONS.

## ABSTRACT

*Astyanax* is a polyphyletic taxon with richness of species and wide geographic distribution. *Astyanax* comprises species that are morphologically very similar with poorly detailed taxonomic delimitations, which makes it difficult to identify and to establish phylogenetic relationships. In order to provide data to contribute to cytogenetic, taxonomy and systematics of *Astyanax*, cytogenetics analyzes were carried out on ten *Astyanax* species from three river basins. *Astyanax altiparanae* and *A. aff. fasciatus* were collected on the Upper Paraná River basin; *A. abramis* and *A. asuncionensis* were collected on the Middle-low Paraná River basin; and *A. cf. aramburui*, *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus*, *A. jacuhiensis*, *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* and *Astyanax* sp. were collected on the Upper-Middle Uruguai River basin. The results show interespecific variation in diploid number,  $2n=46$  chromosomes for *A. cf. aramburui* and *A. aff. fasciatus*,  $2n=48$  chromosomes for *A. eigenmanniorum*, and  $2n=50$  chromosomes for the remaining species. NORs (Ag-staining and 18S rDNA-FISH) showed species bearing single sites and species bearing multiple sites (up to 10 cistrons in *Astyanax* sp.), confirming the high variability reported for the genus. The species from *A. bimaculatus* complex (*A. abramis*, *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis* e *A. asuncionensis*) showed single NORs, a plesiomorphic condition for the complex. FISH with 5S rDNA probes revealed a more conserved condition, with centromeric sites in at least one metacentric chromosome pair and one subtelocentric/acrocentric chromosome pair, however with interspecific variation, which proves it to be an important marker in the characterization and differentiation of these species. Heterochromatin distribution pattern was distinct for all species, except for *A. cf. aramburui* and *A. aff. fasciatus* (Ijuí River). This demonstrates that cytogenetic similarities may indicate closer relationship between each other than among to the other analyzed species; on the other hand, 5S rDNA genes showed to be important in differentiation of these cryptic species. The results reported the first cytogenetic data for *A. cf. paris* and reinforce their cytogenetic similarity with other congenus species, and we also report the occurrence of a *Astyanax* species that has not been taxonomically described yet. Thus, the results of this study provide data that assist taxonomy and systematic of “*Astyanax* clade” and “*Astyanax paris* clade”, reinforcing the need for extensive revisions, especially in *A. bimaculatus* and *A. fasciatus* complex, including markers such as 5S rRNA and heterochromatin distribution pattern, forthe better understanding of the phylogenetic relationships in *Astyanax*.

**Keywords:** *Astyanax paris*; C-banding; species complex; rDNA-FISH; NORs.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS .....	11
2. INTRODUÇÃO.....	13
2.1 Aspectos gerais e diversidade da ictiofauna Neotropical .....	13
2.2 Bacia do rio Paraná .....	14
2.3 Bacia do rio Uruguai .....	16
2.4 Considerações em Characiformes e Characidae .....	17
2.5 Aspectos taxonômicos e citogenéticos em <i>Astyanax</i> .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Locais de coleta.....	23
3.2 Preparação dos cromossomos mitóticos .....	24
3.3 Preparação das lâminas .....	24
3.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos .....	24
3.5 Determinação de heterocromatina .....	25
3.6 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente .....	25
3.7 Estudos cariotípicos .....	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
5. CAPÍTULO 1 Espécies morfologicamente crípticas de <i>Astyanax</i> Baird & Girard 1854 diagnosticadas através de caracteres citogenéticos .....	40
6. CAPÍTULO 2 Caracterização citogenética de seis espécies de <i>Astyanax</i> Baird & Girard 1854 (Characiformes: Characidae) de duas bacias hidrográficas brasileiras: contribuições à taxonomia e sistemática do grupo. ....	59
7. CONCLUSÕES .....	84

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

**Figura 1** Locais de coleta ..... 23

### Capítulo 1

**Figura 1** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax altiparanae*, (c) *A. jacuhiensis*, (e) *A. abramis*, (g) *A. asuncionensis* e C-bandados de (b) *A. altiparanae*, (d) *A. jacuhiensis*, (f) *A. abramis*, (h) *A. asuncionensis*. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10 µm..... 57

**Figura 2** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax altiparanae*, (b) *A. jacuhiensis*, (c) *A. abramis*, (d) *A. asuncionensis*. A barra representa 10 µm. .... 58

### Capítulo 2

**Figura 1** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax* cf. *aramburui*, (c) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri, (e) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí, e C-bandados de (b) *Astyanax* cf. *aramburui*, (d) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri, (f) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10 µm..... 79

**Figura 2** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax* cf. *aramburui*, (b) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí, (c) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri. A barra representa 10 µm. .... 80

**Figura 3** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax eigenmanniorum*, (c) *A. aff. laticeps*, (e) *A. cf. paris*, (g) *Astyanax* sp., e C-bandados de (b) *Astyanax eigenmanniorum*, (d) *A. aff. laticeps*, (f) *A. cf. paris*, (h) *Astyanax* sp. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10 µm. .... 81

**Figura 4** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax eigenmanniorum*, (b) *A. aff. laticeps*, (c) *A. cf. paris*, (d) *Astyanax* sp. A barra representa 10 µm. .... 82

## 1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Os peixes formam um dos grupos mais diversificados dos vertebrados, e por ocuparem uma posição basal na filogenia, servem como modelo para estudos evolutivos e de variabilidade genética. Desde os primeiros estudos citogenéticos, os dados obtidos têm contribuído significativamente na sistemática e taxonomia de peixes, auxiliando na caracterização, identificação e diferenciação das espécies, porém, apesar dos inúmeros esforços citogenéticos, taxonômicos e moleculares, ainda são encontradas diversas lacunas referentes às caracterizações básicas para diversos táxons, dificultando a compreensão das relações filogenéticas entre as espécies.

Dentre estes grupos com taxonomia ainda incerta encontra-se Characidae, caracterizada pela elevada riqueza de espécies, formas e ampla distribuição geográfica, tornando difícil a classificação e o estabelecimento das relações filogenéticas dentro da família. Consequentemente, vários gêneros e espécies em Characidae não apresentam relações de parentesco bem estabelecidas e evidências de monofiletismo, e por isso estão listados em *Incertae sedis*.

Entre estes gêneros encontra-se *Astyanax*, conhecido pelo elevado número de espécies e problemas taxonômicos. É um grupo polifilético com espécies morfológicamente semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas, além de apresentar espécies crípticas e alguns complexos de espécies (espécies que compartilham características morfológicas muito similares), o que dificulta a identificação e a filogenia do gênero. Em uma das últimas revisões taxonômicas do grupo utilizando caracteres morfológicos, foram criados dois novos ramos na filogenia de Characidae: “clado *Astyanax*” e “clado *Astyanax paris*”, que procuram aproximar gêneros e espécies listados em *Incertae sedis*.

Devido ao crescente aumento na descrição de novas espécies para o gênero e a grande similaridade morfológica, principalmente dentro dos complexos de espécies, análises comparativas amplas sobre o gênero se tornam difíceis. Além disso, várias espécies foram descritas baseadas em identificações errôneas ou com poucos exemplares, contribuindo ainda mais com a complexidade taxonômica do grupo.

*Astyanax* possui vários dados citogenéticos, que mostram variação no número diplóide de 36 a 50 cromossomos, polimorfismos de heterocromatina, variação no número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e sítios de 5S rDNA, bem

como presença de cromossomos B e triploidia. Apesar destes inúmeros estudos, muitas populações e espécies ainda não possuem dados citogenéticos, ou quando possuem são dados de caracterização básica.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar, através das técnicas de citogenética básicas e moleculares, as espécies *A. abramis*, *A. altiparanae*, *A. cf. aramburui*, *A. asuncionensis*, *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus*, *A. jacuhiensis*, *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris*, e *Astyanax* sp., mostrando sua importância como ferramenta na contribuição de estudos citotaxonômicos e filogenéticos. Além disso, buscar marcadores que auxiliem na identificação, caracterização e diferenciação das populações/espécies em estudo, auxiliando no estabelecimento das relações filogenéticas e compreensão da evolução do grupo.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 Aspectos gerais e diversidade da ictiofauna Neotropical

Os peixes constituem o grupo mais numeroso e diversificado dos vertebrados com cerca de 28.000 espécies divididas em 62 ordens. Apresentam uma enorme diversidade quanto à morfologia, biologia e habitats ocupados, o que, em parte, dificulta estabelecer uma classificação e compreender as relações filogenéticas (Nelson, 2006).

A maior parte desta diversidade se concentra na região Neotropical onde mais de 4.000 espécies válidas foram descritas (Reis *et al.*, 2003; Graça & Pavanelli, 2007), porém este número é subestimado podendo chegar a 8.000 espécies de peixe para esta região (Nelson, 2006). Tamanha diversidade é decorrente de processos de irradiação, extinção de grupos outrora diversificados, alterações na dinâmica dos rios e bacias hidrográficas, e de processos históricos e ecológicos complexos contínuos ao longo do tempo (Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2010). O conhecimento da ictiofauna destas regiões se torna essencial para o desenvolvimento de ações que possam contribuir para modelos de preservação e manejo nestes sistemas aquáticos (Vari & Malabarba, 1998).

Em uma posição basal na filogenia e por ser um dos grupos mais diversificados, os peixes representam um grupo interessante para estudos da variabilidade genética e processos evolutivos. Assim, o interesse em estudos de sistemática e filogenia tem aumentado significativamente nos últimos anos, fazendo muitos grupos expandirem em número de novas espécies (através das novas descrições), enquanto outros diminuem de acordo com a descoberta de sinonímias e descrições errôneas (Nelson, 2006).

Ferramentas como a citogenética e genética molecular têm contribuído significativamente para um melhor entendimento das relações evolutivas entre populações e espécies de peixes, além de auxiliar na caracterização e diferenciação de espécies similares, principalmente quando associado com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia (Prioli *et al.*, 2002; Matoso *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). Os dados citogenéticos mais utilizados são número e morfologia dos cromossomos, padrão de distribuição da heterocromatina e quantidade e localização das RONS, e buscam analisar e explicar a estrutura e o comportamento cromossômico, que garantem a conservação, transmissão e ordenação da informação genética, além de estudar seus mecanismos de controle, variação e implicações genéticas e evolutivas (Lacadena, 1996).

Levantamentos apontam que mais de 2.600 espécies já possuem estudos citogenéticos, sendo a maioria pertencente à Characiformes e Siluriformes (Arai, 2011). Porém estes estudos são escassos se comparado com a grande riqueza de peixes existente, evidenciando a importância de estudos citogenéticos que envolvam discussões de taxonomia, sistemática e biogeografia para a caracterização das espécies, conhecimento da diversidade, sistemática e evolução destes vertebrados (Artoni *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2008).

## **2.2 Bacia do rio Paraná**

O Brasil possui sistemas hidrográficos de grandes proporções com grande diversidade na fauna de peixes de rios e riachos registrando mais de 2.500 espécies válidas, porém, com o incremento de estudos e levantamentos em locais ainda não explorados, novas espécies devem ser descritas (Buckup *et al.*, 2007; Graça & Pavanelli, 2007).

Combinando as áreas biogeográficas de Vari (1988) e Menezes (1996), o Brasil pode ser dividido em sete grandes áreas: a bacia Amazônica, Guianas (rios Oiapoque e Araguari, no Amapá), Nordeste (entre a foz do rio Amazonas e a foz do rio São Francisco, incluindo o rio Parnaíba), bacia do rio São Francisco, bacias do Leste (entre a foz do rio São Francisco e o Estado de Santa Catarina, incluindo os rios Paraguaçu, Jequitinhonha, Mucuri, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e Cubatão), bacias costeiras do sul do Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (incluindo o rio Jacuí), e a bacia Platina (retirando a bacia do Alto rio Paraná, que apresenta alto endemismo em sua ictiofauna) (Rosa & Lima, 2008).

Por deter áreas tão heterogêneas e com grande diversidade de espécies em território brasileiro, são necessárias ações que visem a preservação dos ambientes aquáticos e a minimização dos impactos antrópicos, como por exemplo, a conservação de determinados trechos de uma bacia hidrográfica, compreensão do ciclo de vida de espécies chaves, e manutenção da integridade hidrológica (Dias *et al.*, 2005). Muitos dos sistemas hidrográficos brasileiros possuem potencial hidrelétrico, sendo altamente explorados para a geração de energia, além de drenarem áreas com grandes centros urbanos e industriais, e sofrerem com a exploração pela pesca e irrigação agrícola, acarretando severos impactos ambientais (Eletrobrás, 1991; Baumgartner, *et al.*, 2012; CIC, 2015). O represamento de um rio transforma seus principais afluentes em lagos artificiais, ocasionando o empobrecimento da fauna, particularmente em relação às espécies de peixes, degradação

de habitats e até mesmo extinção de espécies, sendo necessários estudos que forneçam subsídios à preservação e manejo destes ambientes (Agostinho & Júlio-Jr., 1999; Esteves, 1999).

O rio Paraná, juntamente com o rio Paraguai, Uruguai e seus respectivos afluentes formam a bacia do Prata, um dos maiores sistemas hidrográficos do mundo, abrangendo os países Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, e com uma drenagem de aproximadamente 3,1 milhões de Km<sup>2</sup> (CIC, 2015). Com a segunda maior extensão da América do Sul, o rio Paraná percorre em território brasileiro 3.100 km desde sua nascente na confluência dos rios Grande e Paranaíba até seu desagüe no rio La Plata. Sua bacia hidrográfica se divide em duas sub-bacias: bacia do Alto rio Paraná e bacia do Médio-Baixo rio Paraná, que são compostas por importantes tributários como os rios Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema, Piquiri, Iguaçu, entre outros (Agostinho *et al.*, 2004).

A bacia do Alto rio Paraná compreendia o trecho da nascente do rio até os saltos de Sete Quedas, porém com a construção da barragem da Usina hidrelétrica de Itaipu este limite se estendeu 150 Km abaixo, possibilitando a dispersão de parte da ictiofauna do Médio Paraná para o Alto Paraná e o acréscimo no número de espécies (Graça & Pavanelli, 2007). Atualmente o trecho pertencente ao Alto rio Paraná possui aproximadamente 310 espécies pertencentes a 11 ordens e 38 famílias, sendo os grupos Siluriformes e Characiformes os mais representativos (Langeani *et al.*, 2007).

Um dos afluentes da bacia do Alto rio Paraná é o rio Piquiri, localizado integralmente em território paranaense possui uma área de drenagem de 24.156 km<sup>2</sup> (IAP, 2008). Nasce no Terceiro Planalto, na região centro-sul do Paraná, no município de Campina do Simão e se estende por 485 Km até sua foz no rio Paraná, tendo como principais afluentes os rios Cantu, Goio-Bang, Goioerê e rio do Cobre (Pereira & Scroccaro, 2010). Levantamento ictiofaunístico para a bacia indicam a ocorrência de 62 espécies pertencentes a 21 famílias e 5 ordens (Gubiani *et al.*, 2006).

A bacia do Médio-Baixo rio Paraná compreende desde a Usina Hidroelétrica de Itaipu até a conexão com o rio Paraguai. Nesse trecho também recebe águas do rio Iguaçu, que tem sua ictiofauna dividida devido à ocorrência das Cataratas do Iguaçu. Assim, a porção que ocorre acima das quedas (montante) é denominada bacia do Baixo rio Iguaçu e a porção abaixo das quedas (jusante) bacia do Médio-Baixo rio Paraná. Trabalhos desenvolvidos no trecho jusante às Cataratas do Iguaçu são escassos devido a esta região ser uma área federal de preservação ambiental, o que dificulta o acesso (Paiz, 2013).

O rio Iguaçu nasce na confluência dos rios Iraí e Atuba, no município de Curitiba, e deságua no rio Paraná drenando uma área de aproximadamente 70.800 km<sup>2</sup>. Seus principais afluentes são os rios Iraí, Atuba, Passaúna, Barigui, Verde, Passa Dois, Chopim, Palmital, Gonçalves Dias, Castro Alves, Ampére e Silva Jardim. Devido a suas características geomorfológicas e elevado desnível, o rio Iguaçu é altamente represado, o que altera notavelmente seus atributos físicos, químicos e biológicos; além disso, o relevo acidentado forma vários rios e cachoeiras, influenciando a distribuição geográfica das espécies de peixes. Levantamentos ictiofaunísticos relatam alta diversidade e considerável endemismo para a bacia, registrando somente para a porção do Baixo rio Iguaçu mais de 100 espécies (Baumgartner *et al.*, 2012).

### **2.3 Bacia do rio Uruguai**

A bacia hidrográfica do rio Uruguai possui uma área total de aproximadamente 385.000 Km<sup>2</sup> e destes, 174.412 Km<sup>2</sup> estão situados em território nacional. O rio Uruguai se origina da confluência dos rios Pelotas e Canoas e se estende por 2.200 Km até sua foz no rio da Prata. Divide-se em duas partes: Alto-Médio, e Baixo rio Uruguai, e serve de fronteira entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entre os países Brasil e Argentina, e Argentina e Uruguai (MMA, 2006; ANEEL, 2008; ANA, 2014).

Com 1.600 km de extensão e vazão média de 5.500 m<sup>3</sup>/segundo, o rio Uruguai tem como principais afluentes os rios Canoas, Pelotas, Passo Fundo, Chapecó, Ijuí, Ibicuí e Quaraí (ANEEL, 2008; ANA, 2014). A ictiofauna da bacia do rio Uruguai é muito semelhante ao rio Paraná, com predominância de Characiformes e Siluriformes e um total de aproximadamente 150 espécies (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003), mas esse número pode ser maior, segundo levantamentos bibliográficos realizados por Hahn & Câmara (2000) são estimadas 251 espécies para a bacia.

O rio Ijuí é um dos principais rios da bacia hidrográfica do rio Uruguai. Possui uma área de drenagem de 10.849 km, com elevado potencial hidrelétrico, porém pouco explorado (MMA, 2006). Levantamentos da ictiofauna identificaram 77 espécies de peixes em três Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) na porção do Alto rio Ijuí, com predominância das famílias Loricariidae, Characidae e Cichlidae (Ferreira *et al.*, 2011).

Analisando a relação entre a ictiofauna de água doce da região Neotropical, é possível verificar que a composição de espécies do Alto-Médio e Baixo rio Uruguai é consideravelmente distinta. A bacia do Alto-Médio rio Uruguai possui maior relação com a

ictiofauna das bacias do rio Amazonas e Tocantins-Araguaia; já o Baixo rio Uruguai possui maior semelhança com as bacias do Baixo rio Paraná e rio Paraguai (Albert & Carvalho, 2011). De acordo com Albert & Carvalho (2011), a semelhança entre a fauna do Alto-Médio rio Uruguai e a bacia Amazônica possivelmente se deve a extinções que ocorreram em outras porções da bacia do Prata, sendo um dos poucos casos de semelhança significativa na fauna de bacias não contíguas. Os principais fatores que influenciaram a composição e as semelhanças entre as bacias hidrográficas brasileiras foram isolamento geográfico, evolução progressiva, diferenciação local e trocas de fauna (Menezes, 1972).

#### **2.4 Considerações em Characiformes e Characidae**

Characiformes teve sua origem a mais de 100 milhões de anos atrás, quando África e América do Sul estavam unidas em um único continente (Ortí & Meyer, 1997). É um dos grupos mais diversos dentro de Ostariophysi, composto por 23 famílias (incluindo as famílias Bryconidae, Chalceidae, Iguanodectidae e Thiportheidae), 270 gêneros e aproximadamente 2.100 espécies que se distribuem pela América do Sul e Central, sul da América do Norte e continente africano (Albert *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Eschmeyer & Fong, 2016). Contudo, a maior diversidade de Characiformes é encontrada na região Neotropical (Nelson, 2006), sendo que nos sistemas hidrográficos brasileiros são relatadas mais de 1.000 espécies (Buckup *et al.*, 2007). Os characídeos possuem grande diversidade de formas, habitats e hábitos alimentares, possuem corpo coberto por escamas com exceção da cabeça, presença de nadadeira adiposa, dentes bem desenvolvidos, mandíbula superior não protraída e hábito diurno (Moreira, 2007).

Em Characiformes, Characidae é uma das maiores e mais complexa família, com peixes de vários hábitos alimentares e habitats (Britski *et al.*, 1988). Com aproximadamente 1.100 espécies (Eschmeyer & Fong, 2016), esta família é um componente-chave nos ecossistemas de água doce da região Neotropical, formando um dos táxons mais ativos em termos de descrições de novas espécies (Oliveira *et al.*, 2011). São animais de pequeno porte e por isso possuem capacidade de deslocamento restrita dentro de grandes bacias hidrográficas (Castro, 1999), conhecidos no Brasil como lambari, piquira, piaba e matupiri (Buckup, 1999).

A grande variedade de espécies, de formas e distribuição geográfica encontradas nessa família tem dificultado a classificação e o estabelecimento de relações filogenéticas (Lucena, 1993). Os characídeos são conhecidos por englobarem grupos complexos, e apesar

do monofiletismo apresentado por várias subfamílias, grande parte dos gêneros e espécies ainda não possuem evidências e hipóteses desta relação, mesmo com os significativos esforços embasados em análises morfológicas e moleculares (Malabarba & Weitzman, 2003; Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011). Conseqüentemente, por não apresentarem relações filogenéticas bem definidas, alguns gêneros e espécies são listados em um grupo chamado *Incertae sedis* (Lima *et al.*, 2003; Mirande, 2009, 2010).

Estudos citogenéticos para Characiformes indicam variação no número cromossômico de  $2n=28$  em *Hemigrammus* (Scheel, 1973) a  $2n=102$  em *Potamorhina altamazonica* (Feldberg *et al.*, 1993). Segundo Rubert & Margarido (2007), o cariótipo ancestral para a ordem é composto por 50 cromossomos metacêntricos/submetacêntricos e RONS simples, sendo que Characidae comporta gêneros e espécies que compartilham estas características e são considerados basais em Characiformes.

Em Characidae, o número diplóide e/ou fórmula cariotípica são bastante variáveis entre espécies de um mesmo gênero (Morelli *et al.*, 1983; Falcão *et al.*, 1984; Margarido & Galetti-Jr., 1996; Tenório *et al.*, 2013) e populações da mesma espécie (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Pazza *et al.*, 2008). Mesmo com tal diversidade cariotípica, esta família apresenta uma característica cromossômica marcante que tem se mantido constante na maioria das espécies estudadas: o primeiro par de cromossomos é um metacêntrico grande que se destaca dos outros metacêntricos, podendo representar um caráter plesiomórfico no grupo (Morelli *et al.*, 1983; Tenório *et al.*, 2013). Exceções a esta condição são encontradas em espécies com número diplóide diferente de  $2n=50$  cromossomos, como por exemplo, *Astyanax schubarti* Britski 1964 (Morelli *et al.*, 1983), *A. fasciatus* (Cuvier 1819) (Pazza *et al.*, 2006), *A. correntinus* (Holmberg 1891) (Paiz *et al.*, 2015), espécies de *Bryconamericus* (Piscor *et al.*, 2013), *Phenacogaster* cf. *pectinatus* (Carvalho *et al.*, 2002), entre outras.

Análises moleculares em Characiformes reforçam a posição basal das famílias africanas dentro do grupo e evidenciam que as linhagens africanas e neotropicais não formam um grupo monofilético (Ortí, 1997; Ortí & Meyer, 1997). Em Characidae, estudos evidenciaram a existência de três clados principais dentro de Characidae (clados A, B e C) além de confirmar o polifiletismo de grupos especiosos como *Astyanax* Baird & Girard 1854, *Bryconamericus*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (Javonillo *et al.*, 2010). Recentemente, Oliveira *et al.* (2011) utilizaram análises moleculares para analisar as relações das 18 famílias e 166 gêneros de Characiformes, o que resultou na reorganização

das relações filogenéticas dentro da ordem e a inclusão de *Astyanax* no clado C proposto por Javonillo *et al.* (2010), juntamente com outros gêneros especiosos como *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia*, *Knodus* e *Jupiaba* e as subfamílias Stethaprioninae e Rhoadsiinae.

### 2.5 Aspectos taxonômicos e citogenéticos em *Astyanax*

Considerado um dos grupos mais ricos em espécies em Characidae, *Astyanax* possui cerca de 150 espécies válidas distribuídas do Sul dos Estados Unidos à região Central da Argentina (Lima *et al.*, 2003; Eschmeyer & Fong 2016), com alta representatividade nos sistemas hidrográficos brasileiros. Levantamentos ictiofaunísticos são bem conhecidos na bacia do Alto rio Paraná (Graça & Pavanelli, 2007), bacia do rio Iguaçu (Bifi *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2012), bacia do Paraná-Paraguai (Neris *et al.*, 2010), e bacia do rio Uruguai (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003; Zaniboni-Filho *et al.*, 2004).

*Astyanax* foi primeiramente incluso em Tetragonopterinae, mas com uma nova organização sistemática foi agrupado em *Incertae sedis* (Lima *et al.*, 2003). Atualmente é considerado um taxon polifilético que compreende espécies com formas bastante semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas, o que dificulta a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas no gênero (Melo, 2001; Mirande, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Ainda apresenta espécies morfologicamente crípticas e alguns complexos de espécies (grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares), cujas filogenias nunca foram testadas. Entre estes complexos de espécies estão: complexo *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000, *A. bimaculatus* (Linnaeus 1758), *A. fasciatus*, *A. paranae* Eigenmann 1914 e *A. scabripinnis* (Jenyns 1842) (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006).

Análises citogenéticas e morfológicas sugerem que *Astyanax scabripinnis* corresponde a um complexo de espécies composto por pelo menos 15 espécies (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Bertaco & Lucena, 2006). O complexo *A. fasciatus* é composto por diversas espécies, das quais somente as provenientes do rio São Francisco seriam *A. fasciatus*, enquanto que as outras espécies do leste do Brasil, América Central e rio Paraná seriam espécies muito parecidas nomeadas *Astyanax* aff. *fasciatus* (Melo & Buckup, 2006; Pazza *et al.*, 2008). O complexo *A. bimaculatus* compreende aproximadamente 18 espécies

e subespécies caracterizadas pela presença de uma mancha umeral negra e horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons e uma mancha negra no pedúnculo caudal (Garutti, 1995; Garutti & Langeani, 2009).

Recentemente, Mirande (2009; 2010), utilizando diversos caracteres morfológicos, propôs uma nova organização na filogenia de Characidae, criando dois novos ramos denominados “clado *Astyanax*” e “clado *Astyanax paris*” que procura aproximar gêneros listados em *Incertae sedis*. Segundo o autor, *A. paris* Azpelicueta, Almirón & Casciotta 2002 difere das outras espécies do gênero em características como falta de ganchos ósseos na nadadeira de machos adultos e presença de vários dentes superiores, sendo que possivelmente deva ser transferido para um novo gênero.

*Astyanax* é considerado um dos grupos mais ativos em termos de descrição de novas espécies (Eschmeyer & Fong, 2016) e graças aos significativos esforços da taxonomia, sistemática e da genética alguns problemas taxonômicos estão sendo resolvidos (Oliveira *et al.*, 2011; Mirande & Koerber, 2015). Contudo, apesar dos inúmeros estudos, ainda existem dúvidas em relação à sistemática de certos grupos dentro do gênero. De acordo com Mirande & Koerber (2015) várias espécies descritas para as bacias da Argentina e Uruguai devem ser revisadas, pois foram identificadas erroneamente ou com base em poucos exemplares, como o caso de *Astyanax* aff. *fasciatus*, que segundo os autores deve ser identificado como *A. aramburui* Protogino, Miquelarena & López 2006 ou *A. rutilos* (Jenyns 1842) para as bacias dessa região.

Os dados citogenéticos indicam ampla variabilidade cromossômica e elevado grau de polimorfismo entre as espécies de *Astyanax* (Tenório *et al.*, 2013). O número diplóide varia de 36 cromossomos em *A. correntinus* (Paiz *et al.*, 2015) e *A. schubarti* (Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001, 2005) à 50 cromossomos em *A. altiparanae* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009), *A. jacuhiensis* (Cope 1894) (Silva *et al.*, 2012), *A. laticeps* (Cope 1894) (Rosa *et al.*, 2009), *A. scabripinnis* (Castro *et al.*, 2015), *A. xavante* Garutti & Venere 2009 (Tenório *et al.*, 2013), entre outras. Segundo Mirande (2010) e Oliveira *et al.* (2011), o grande número de populações e espécies de *Astyanax* que apresentam  $2n=50$  cromossomos pode ser considerado um fator importante para a realização de uma análise de parentesco, uma vez que este gênero representa um grupo polifilético.

Além de variação no número diplóide, fórmula cariotípica e número e localização das RONS, a ocorrência de cromossomos B, de triploidia e de polimorfismos de heterocromatina são frequentemente observados nas espécies do gênero (Morelli *et al.*,

1983; Kavalco *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012). Análises referentes ao número, quantidade e variabilidade posicional da heterocromatina e RONS têm fornecido evidências de alguns processos de diferenciação cariotípica envolvidos na evolução dos peixes (Margarido & Galetti-Jr., 2000; Mantovani *et al.*, 2004).

Estudos referentes à localização dos genes ribossomais 5S e 18S também têm mostrado ampla variabilidade interespecífica. Cístrons simples de 5S rDNA foram observados em populações de *A. altiparanae* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009), *A. asuncionensis* Géry 1972 (Paiz *et al.*, 2015), *A. elachylepis* Bertaco & Lucinda 2005, *A. xavante* (Tenório *et al.*, 2013) e *A. lacustris* (Lütken 1875) (Peres *et al.*, 2008); e múltiplos em *A. abramis* (Jenyns 1842), *A. correntinus* (Paiz *et al.*, 2015), *A. scabripinnis* (Vicari *et al.*, 2008a) *A. fasciatus* (Ferreira-Neto *et al.*, 2012), entre outras. Em *Astyanax*, os cístrons de 5S rDNA tendem a ser conservados na região centromérica/pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos metacêntricos (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2005; Vicari *et al.*, 2008a.); no entanto, há evidências de mais pares de cromossomos que carregam estes genes (Ferro *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2015), tornando-se importantes marcadores para diagnose das espécies e hipóteses de relações de parentesco (Almeida-Toledo *et al.*, 2002).

Em relação à localização das RONS (impregnação por nitrato de prata e 18S rDNA-FISH), sítios simples foram observados em *A. abramis* e *A. asuncionensis* (Paiz *et al.*, 2015), *A. argyrimarginatus* Garutti 1999, *A. aff. bimaculatus*, *A. elachylepis* (Tenório *et al.*, 2013) e *A. lacustris* (Peres *et al.*, 2008). Sítios múltiplos são comuns em *A. bockmanni* Vari & Castro 2007 (citado como *A. eigenmanniorum* (Cope 1894)) (Torres-Mariano & Morelli, 2008), *A. fasciatus* (Ferreira-Neto *et al.*, 2012), *A. jacuhiensis* (Pacheco *et al.*, 2010), *A. laticeps* (Rosa *et al.*, 2009), *A. scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2015) e *A. xavante* (Tenório, *et al.*, 2013).

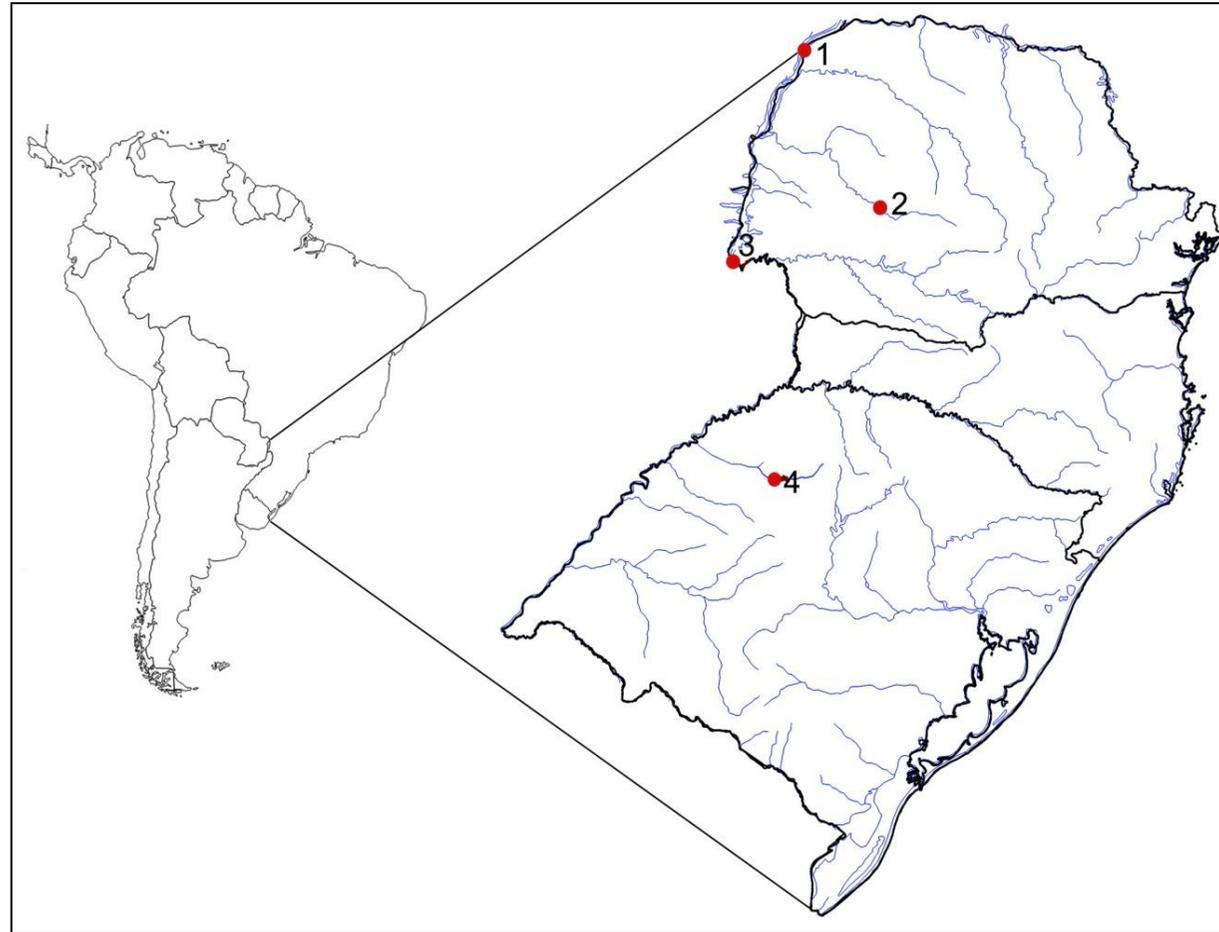
Considerando a problemática taxonômica e sistemática em *Astyanax*, a dificuldade na identificação das espécies, o número ainda incerto de espécies e o possível polifiletismo do grupo, foram realizadas análises citogenéticas básicas e moleculares em dez espécies de *Astyanax*, com o objetivo de expandir os dados nestas espécies, auxiliando na identificação, caracterização e diferenciação destas populações/espécies, bem como buscar contribuir com a taxonomia e sistemática do grupo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes analisados foram coletados nos rios Paraná (Porto Rico – PR) e Piquiri (Nova Laranjeiras – PR), bacia do Alto rio Paraná; rio Iguaçu à jusante das Cataratas do Iguaçu (Foz do Iguaçu), bacia do Médio-Baixo rio Paraná; rio Ijuí (Ijuí - RS), bacia do Alto-Médio rio Uruguai (Fig. 1), com auxílio de redes e/ou tarrafas (Licença permanente SISBIO 31060-1). Foram levados vivos para os laboratórios de Genética e Citogenética da UNIOESTE – Cascavel, e mantidos em aquários aerados. Após, foram sacrificados por *overdose* de óleo de cravo (Griffiths, 2000) (conforme Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas da Unioeste: Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste) para retirada de tecidos para preparações citogenéticas.

Os espécimes analisados foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – (NUP), da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil: nove exemplares de *A. altiparanae* (4 fêmeas e 5 machos, NUP 17156, rio Paraná, bacia do Alto rio Paraná, 22°45'53.50"S; 53°15'27.31"O); cinco exemplares de *A. aff. fasciatus* (três machos e duas fêmeas, NUP 17783, rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná, 24°56'54"S; 52°35'49"O); seis exemplares de *A. abramis* (três machos e três fêmeas, NUP 14581) e 25 exemplares de *A. asuncionensis* (treze machos e doze fêmeas, NUP 14584), rio Iguaçu, jusante às Cataratas do Iguaçu, bacia do Médio-Baixo rio Paraná (25°38'18.72"S; 54°28'4.74"O); dois exemplares de *A. cf. aramburui* (dois machos, NUP 15740), um exemplar de *A. eigenmanniorum* (fêmea, NUP 17785), 15 exemplares de *A. aff. fasciatus* (10 machos e cinco fêmeas, NUP 17784), seis exemplares de *A. jacuhiensis* (quatro fêmeas e dois machos, NUP 14927), dois exemplares de *A. aff. laticeps* (dois machos, NUP 17786), três exemplares de *A. cf. paris* (um macho e duas fêmeas, NUP 14909), e um exemplar de *Astyanax* sp. (macho), rio Ijuí, bacia do Alto-Médio rio Uruguai (28°18'06.30"S; 53°53'33.60"O).

### 3.1 Locais de coleta



**Figura 1.** Mapa dos locais de coleta das espécies de *Astyanax* (1) rio Paraná, Bacia do Alto rio Paraná; (2) rio Piquiri, Bacia do Alto rio Paraná; (3) rio Iguazu - jusante às Cataratas do Iguazu, Bacia do Médio-Baixo rio Paraná; (4) rio Ijuí, Bacia do Alto-Médio rio Uruguai.

### **3.2 Preparação dos cromossomos mitóticos (Bertollo *et al.*, 1978).**

Todos os exemplares foram anestesiados e sacrificados através de *overdose* por óleo de cravo (Griffthis, 2000).

1. Foi injetada colchicina 0,025% na cavidade abdominal do peixe, na proporção 1 mL/100 g de peso animal durante 30 – 40 minutos, em seguida o animal foi sacrificado para que fosse retirada a porção anterior do rim.

2. O material foi lavado em solução hipotônica, e em seguida foi colocado em uma cuba de vidro contendo 7 – 10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.

3. O material foi dissociado com pinças de dissecação para separar as células, processo completado com o auxílio de uma seringa hipodérmica.

4. O material foi incubado em uma estufa a 37°C durante 25 – 30 minutos.

5. Foram pingadas de 5 a 10 gotas de fixador metanol – ácido acético (3:1) no material, que foi posteriormente ressuspensionado e centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm.

6. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi retirado o sobrenadante e acrescentado 7 – 10 mL de fixador. O material foi ressuspensionado e centrifugado durante 10 minutos.

7. Foi repetido o passo número 6 mais duas vezes.

8. Após a última centrifugação e eliminado o sobrenadante, foi adicionado de 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material obtido.

9. O material foi novamente ressuspensionado e acondicionado em tubos de plástico tipo *Eppendorf*, sendo guardado no refrigerador.

### **3.3. Preparo de lâminas.**

1. Foram pingadas 1 – 3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa que foi seca ao ar.

2. A lâmina foi corada com Giemsa 5%, solução diluída em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), pH=6,8, por 7 minutos, ou tratada segundo as técnicas de bandas-C ou impregnação por prata.

### **3.4. Detecção de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) por meio da impregnação por prata (Howell & Black, 1980).**

1. Foram colocadas sobre uma lâmina previamente preparada de 2 a 3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H<sub>2</sub>O + 0,5 mL de ácido fórmico).
2. Sobre cada gota de gelatina foram adicionadas 1 gota de H<sub>2</sub>O e 2 gotas de AgNO<sub>3</sub>.
3. A lâmina foi coberta com uma lamínula e colocada em estufa a 60°C durante 3 - 6 minutos.
4. A lamínula foi deixada escorrer debaixo da água corrente.
5. A lâmina foi seca ao ar e observada ao microscópio.

### **3.5. Determinação de heterocromatina (Sumner, 1972), com modificações propostas por Lui *et al.* (2012).**

1. Por 12 minutos, a lâmina foi tratada com HCl 0,2N a 42°C.
2. A lâmina foi lavada em água corrente e seca ao ar.
3. Durante 5 minutos e 30 segundos a lâmina foi colocada em solução aquosa de Ba(OH)<sub>2</sub> x 8H<sub>2</sub>O 5% a 42°C.
4. A lâmina foi mergulhada três vezes em HCl 0,2N, lavada em água corrente e seca ao ar.
5. A lâmina foi colocada em solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos.
6. A lâmina foi lavada em água corrente, seca ao ar e corada com iodeto de propídeo na proporção de 20 ml de antifading e 0,7 mL de iodeto de propídeo (50mg/mL).

### **3.6. Hibridização *in situ* fluorescente (Pinkel *et al.*, 1986) com modificações sugeridas por Margarido e Moreira-Filho (2008).**

Para as análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram utilizadas sondas de 5S rDNA e de 18S rDNA obtidas a partir das espécies *Leporinus elongatus* (= *Leporinus obtusidens* segundo Britski *et al.*, 2012) para 5S rDNA (Martins & Galetti, 1999), e *Prochilodus argenteus* para 18S rDNA (Hatanaka & Galetti, 2004). A técnica foi realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com adaptações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho (2008).

#### **Preparação da sonda:**

1. Adicionar em um tubo *Eppendorf* 1  $\mu\text{g}$  de DNA sonda,  $\text{H}_2\text{O}$  *mili-Q* autoclavada para completar os 16  $\mu\text{L}$  de solução e 4  $\mu\text{L}$  de *mix* de reação (Kit).
2. A solução foi homogeneizada com uma micropipeta e levada ao banho-maria (isopor) por 1 e  $\frac{1}{2}$  horas a  $15^\circ\text{C}$ .
3. Adicionar 1  $\mu\text{L}$  EDTA 0,5 M,  $\text{pH} = 8,0$ , e aquecer a  $65^\circ\text{C}$  por 10 minutos para finalizar a reação.
4. O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% gelado (2 vezes o volume) overnight.
5. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos; e em seguida foi descartado o sobrenadante.
6. O material foi lavado com 50  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado; e centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos.
7. Foi descartado o sobrenadante, e o material foi seco em estufa a  $37^\circ\text{C}$ .

#### **Preparação das Lâminas:**

1. As lâminas foram incubadas com 88  $\mu\text{L}$  de RNase (0,4% RNase/2xSSC) sob lamínula, a  $37^\circ\text{C}$  por uma hora em câmara úmida com água.
2. Lavadas 2 vezes por 5 minutos em 2xSSC com agitação.
3. Incubadas em 2xSSC a  $60^\circ\text{C}$  por 45 minutos.
4. Desidratadas em série de 70% etanol e 100% por 5 minutos a temperatura ambiente; e posteriormente secas ao ar.
5. Em seguida, foram denaturadas em 0,05N NaOH/2xSSC por 3 minutos.
6. Desidratadas em série de etanol 70% e 100% por 5 minutos cada, a temperatura ambiente; secas ao ar.

#### **Hibridização:**

1. Foram adicionados ao tubo 6  $\mu\text{L}$  da sonda 18S rDNA e 6  $\mu\text{L}$  sonda 5S rDNA; 6  $\mu\text{L}$  de 20xSSC; 30  $\mu\text{L}$  de formamida e 12  $\mu\text{L}$  de sulfato dextrano 50%, por lâmina.
2. A solução de hibridização foi colocada em banho-maria a  $100^\circ\text{C}$  por 10 minutos; e posteriormente retirada e colocada imediatamente no gelo.
3. Foi colocado 58  $\mu\text{L}$  de solução de hibridização em lamínula para cada lâmina, e em seguida as lâminas foram arrumadas em câmara úmida e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 12 horas (overnight). A câmara úmida deve ser preparada com  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **Detecção e amplificação do sinal:**

1. As lâminas foram lavadas em 1xSSC por 5 minutos a 37°C com agitação; em 1xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação; e por último 2 vezes em Tween 0,05%/4xSSC por 5 minutos cada com agitação.

2. As lâminas foram incubadas em tampão 5% NFDM/4xSSC em temperatura ambiente por 15 minutos.

3. Lavadas 2 vezes por 5 minutos com Tween 0,05%/4xSSC em temperatura ambiente (sob agitação).

4. Incubadas com 88 µL de Antidigoxigenina-Rhodamine+avidin-FITC (0,5 µL de Rhodamine + 0,4 µL de FITC + 90 µL 5% NFDM/4xSSC por lâmina; durante 60 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente.

5. Lavadas em tampão 5% NFDM/4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação); 2 vezes em Tween 0,05%/4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação); e 1 vez em 4xSSC, em temperatura ambiente por 5 minutos (sob agitação).

6. Posteriormente as laminas foram deixadas em 1xSSC por 5 minutos, e secas ao ar.

### **Montagem das lâminas:**

1. Foram misturados 200 µL de antifading mais 1 µL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 0,2 mg/mL), e em seguida colocados 25 µL da mistura. A lâmina foi coberta com lamínula e guardada em local protegido da luz.

### **3.7. Estudos cariotípicos (Levan *et al.*, 1964).**

As preparações foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão. As melhores metáfases foram capturadas com a câmera digital DP 71 acoplada ao microscópio de epifluorescência BX 61, com a utilização do software *DP Controller*, versão 3.2.1.276. Os homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica adotada foi à proposta por Levan *et al.* (1964) onde o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido segue:

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (*m*);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (*sm*);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (*st*);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (*a*).

O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos *m*, *sm*, e *st* como tendo dois braços, e cromossomos *a* como tendo apenas um braço.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência nacional de energia elétrica (ANEEL). (2008). Atlas de energia elétrica do Brasil, 3 Ed. Brasília: ANEEL.
- Agência nacional de águas (ANA). (2014). Região hidrográfica do Uruguai. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/uruguai.aspx>. Último acesso em 11/01/2015.
- Agostinho, A.A.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Júlio-Jr, H.F.; Pavanelli, C.S. & Agostinho, C.S. (2004). Fish assemblages. Pp. 223-246. In: Thomaz, S.M.; Agostinho, A.A. & Hahn, N.S (Eds.). The Upper Paraná River and its Floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden: Backhuys Publishers, 393p.
- Agostinho, A.A.; Miranda, L.E.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Thomaz, S.M. & Suzuki, H.I. (1999). Patterns of colonization in Neotropical reservoirs, and prognoses on aging. Pp. 227-265. In: Tundisi, J.G. & Straskraba, M (Eds.). Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: IIE, 255p.
- Albert, J.S.; Bart-Jr., H.L. & Reis, R.E. (2011). Species richness and cladal diversity. Pp. 89-104. In: Albert, J.S. & Reis, R.E (Eds.). Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes. Berkeley: University of California Press, 389p.
- Albert, J.S. & Carvalho, T.P. (2011). Neogene Assembly of Modern Faunas. Pp. 119-136. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (Eds.). Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes. Berkeley: University of California Press, 389p.
- 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* 97:229-233.
- Arai, R. (2011). Fish Karyotype. Check List, 340p. Tokyo: Springer, 340p.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R. & Bertollo, L.A.C. (2000). Citogenética de peixes Neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biological and Health Science* 6:43-60.
- Artoni, R.F.; Shibatta, A.O.; Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Almeida, M.C.; Vicari, M.R. & Bertollo, L.A.C. (2006). *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei);

- Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology* 4:197-202.
- Baumgartner, G.; Pavanelli, C.S.; Baumgartner, D.; Bifi, A.G.; Debona, T. & Frana, V.A. (2012). Peixes do Baixo rio Iguaçu. Maringá: Eduem, 203p.
- Bertaco, V.A. & Lucena, C.A.S. (2006). Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology* 4:53-60.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103-120.
- Bifi, A.G.; Baumgartner, D.; Baumgartner, G.; Frana, V.A. & Debona, T. (2006). Composição específica e abundância da ictiofauna do rio dos Padres, bacia do rio Iguaçu, Brasil. *Acta Scientiarum* 28:203-211.
- Britski, H.A.; Sato, Y. & Rosa, A.B.S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: Codevasf, 143p.
- Britski, H.A.; Birindelli, J.L.O.; Garavello, J.C. (2012). A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)* 52:441-475.
- Buckup, P.A. (1999). Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. Pp. 91-138. In: Caramaschi, E.P.; Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R (Eds.). Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 260p.
- Buckup, P.A.; Menezes, N.A. & Guazzi, M.S. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 195p.
- Calcagnotto, D.; Schaefer, S.A. & Desalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:135-153.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2002). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia* 55:181-188.

- Castro, J.P.; Moura, M.O.; Moreira-Filho, O.; Shibatta, O.A.; Santos, M.H.; Nogaroto, V.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C. & Artoni, R.F. (2015). Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 25:231-244.
- Castro, R.M.C. (1999). Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. Pp. 139-155. In: Caramaschi, E.P.; Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R. Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 260p.
- Comitê Intergovernamental Coordenador dos Países da Bacia do Prata (CIC). (2015). A Bacia do Prata. Disponível em: <http://projetoscic.org/a-bacia-do-prata>. Acesso em: 11/01/2016.
- Daniel-Silva, M.F.Z. & Almeida-Toledo, L.F. (2001). Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* 54:209-215.
- Daniel-Silva, M.F.Z. & Almeida-Toledo, L.F. (2005). Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenetic Genome Research* 109:497-501.
- Dias, R.M.; Bailly, D.; Antonio, R.R.; Suzuki, H.I. & Agostinho, A.A. (2005). Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the “lambari” *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterinae, Characidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48:467-476.
- Eschmeyer, W.N. & Fong, J.D. (2016). Species by family/subfamily. Disponível em: <http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 29/02/2016.
- Esteves, F.A. (1999). Ecologia trófica de peixes em riachos. Pp. 157-182. In: Caramaschi, E.P., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R. (Eds.). Ecologia de peixes de riacho. Série Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 260p.
- Falcão, J.N.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1984). An additional chromosome in two fish species. *Brazilian Journal of Genetics* 7:109-118.

- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Nakayama, C.M. & Bertollo, L.A.C. (1993). Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome* 36:372-376.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2004). Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141:328-332.
- Ferreira, F.W.; Hartmann, C. & Beuter, S.B. (2011). A ictiofauna e o efeito sinérgico de três PCHS no rio Ijuí, RS. In: X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, Minas Gerais.
- Ferreira-Neto, M.; Vicari, M.R.; Camargo, E.F.; Artoni, R.F. & Moreira-Filho, O. (2009). Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae Sedis*). *Genetics and Molecular Biology* 32:792-796.
- Ferreira-Neto, M.; 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* 6:29-40.
- Ferro, D.A.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.
- Garutti, V. (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das Bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. Tese (livre docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
- Garutti, V. & Langeani, F. (2009). Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 7:371-376.
- Graça, W.J. & Pavanelli, C.S. (2007). Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná e Áreas Adjacentes. Maringá: Eduem, 241p.
- Griffiths, S.P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57:1453-1464.

- Gubiani, E.A.; Holzbach, A.J.; Baumgartner, G.; Rezende-Neto; L.B. & Bergmann, F. (2006). Fish, Piquiri River, Upper Paraná River Basin, Paraná State, Brazil. *Check List: Journal of Species Lists and Distribution* 2:9-14.
- Hahn, L. & Câmara, L.F. (2000). Ictiofauna do rio Uruguai: pesquisas e impactos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia* 58:9-11.
- Hatanaka, T. & Galetti-Jr., P.M. (2004). Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- IAP. (2008). Avaliação Ambiental Integrada – Bacia do rio Piquiri. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1074>. Acesso em 15/01/2015.
- 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* 54:498-511.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (2007). Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 30:320-335.
- Lacadena, J.R. (1996). Citogenética. Editorial Complutense, S. A. Madri, Espanha. 928 p.
- Langeani, F.; Castro, R.M.C.; Oyakawa, O.T.; Shibatta, O.A.; Pavanelli, C.S & Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7:181-197.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.; 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. Pp. 106-169. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris-Jr., C.J. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742p.
- Lucena, C.A.S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese PhD, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O. & Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87:433-438.
- Machado, N.S.; Ferreira-Neto, M.; Bakkali, M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2012). Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia* 65:40-46.
- Malabarba, L.R. & Weitzman, S.H. (2003). Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comunicação do Museu de Ciência e Tecnologia. PUCRS, Série Zoologia* 16:67-151.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A. & Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 27:536-542.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S. & Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123:211-216.
- Margarido, V.P. & Galetti-Jr., P.M. (1996). Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85:219-228.
- Margarido, V.P. & Galetti-Jr., P.M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology* 23:569-573.

- Margarido, V.P. & Moreira-Filho, O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology* 31:235-238.
- Martins, C. & Galetti-Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363-367.
- Matoso, D.A.; Artoni, R.F. & Galetti-Jr., P.M.G. (2004). Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527:223-225.
- Melo, F.A.G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivo Museu Nacional do Rio de Janeiro* 59:1-46.
- Melo, F.A.G. & Buckup, P.A. (2006). *Astyanax heseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology* 4:45-52.
- Menezes, N.A. (1972). Distribuição e origem da fauna de peixes de água-doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: Comissão internacional da Bacia Paraná-Uruguai. Poluição e piscicultura. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP/Instituto de Pesca.
- Ministério do meio ambiente: Secretaria de Recursos Hídricos (MMA). (2006). Caderno da Região Hidrográfica do Uruguai. Brasília: MMA, 128 p.
- Mirande, J.M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25:574-613.
- Mirande, J.M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8:385-568.
- Mirande, J.M. & Koerber, S. (2015). On some species of *Astyanax* reported erroneously from Argentina. *Ichthyological Contributions of Peces Criollos* 35:1-8.
- Moreira, C.L.R. (2007). Relações Filogenéticas em Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a “species complex”. *Brazilian Journal of Genetics* 14:331-357.
- Morelli, S.; Bertollo, L.A.C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O. & Toledo-Filho, S.A. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotype variability. *Caryologia* 36:235-244.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. New York: John Wiley & Sons, 601p.
- Neris, N.; Villalba, F.; Kamada, D. & Viré, S. (2010). *Guide to the Fish of Paraguay*. Asunción: Itaipu Binacional, 299p.
- Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C.; Benine, R.C.; Ortí, G.; Vari, R.P. & Corrêa-e-Castro, R.M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11:275.
- Oliveira, C.; Foresti, F. & Hilsdorf, A.W.S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:81-100.
- Ortí, G. (1997). The radiation of characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Pp. 215-239. In: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds.). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press, 314p.
- Ortí, G. & Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 46:75-100.
- Pacheco, R.B.; Caetano, L.G.; Julio-Jr., H.F. & Dias, A.L. (2010). Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 8:667-671.
- Paiz, L.M. (2013). *Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “Lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do rio Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- Paiz, L.M.; Baumgartner, L.; Graça, W.J. & Margarido, V.P. (2015). Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park:

- considerations on taxonomy and systematics of the genus. *Comparative Cytogenetics* 9:54-65.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F. & Bertollo, L.A.C. (2006). Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research* 112:313-319.
- Pazza, R.; Kavalco, S.A.F.; Penteado, P.R.; Kavalco, K.F. & Almeida-Toledo, L.F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) - a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* 72:2002-2010.
- Pereira, M.C.B. & Scroccaro, J.L. (2010). Bacias Hidrográficas do Paraná. Série Histórica. SEMA, 138 p.
- Peres, W.A.M.; Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31:222-226.
- Pinkel, D.; Straume, T. & Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences* 83:2934-2938.
- Piscor, D.; Ribacinko-Piscor, D.B.; Fernandes, C.A. & Parise-Maltempi, P.P. (2013). Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Molecular Cytogenetics* 6:13.
- Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Júlio-Jr., H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V.; Carrer, H.; Carraro, D.M. & Prioli, L.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25:421-430.
- Reis, R.E. (2003). Family Characidae. Pp. 291-309. In: Reis, R.E.; Kullanders, S.O. & Ferraris, C.J. (Eds.). Check list of the fresh water fishes of south and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742p.
- Ribeiro, A.C.; Lima, F.C.T.; Riccomini, C. & Menezes, N.A. (2006). Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation

within a Neoproterozoic tectonic province in southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17:157-164.

Ribeiro, A.C.; Lima, F.C.T. & Menezes, N.A. (2010). Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. Pp. 261-276. In: Carvalho, C.J.B. & Almeida, E.A.B. (Eds.). Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. São Paulo: Roca, 729p.

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

Rosa, R.S. & Lima, F.C.T. (2008). Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. Pp. 8-285. In: Machado, A.B.M.; Drummound, G.M. & Paglia, A.P. (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília: Biodiversidade, 1420p.

Rubert, M. & Margarido, V.P. (2007). Cytogenetic Studies in Three Species of the Genus *Oligosarcus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:127-135.

Silva, L.L.L.; Giuliano-Caetano, L. & Dias, A.L. (2012). Chromosome Studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandaí River Basin, Brazil, Using *in situ* Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA<sub>3</sub> Staining. *Folia Biologica-Krakow* 60:135-140.

Scheel, J.J. (1973). Fish chromosome and their evolution. Internal report of danmarks akvarium. Charlottenlund: Denmark, 22p.

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

Tenório, R.C.C.O.; Vitorino, C.A.; Souza, I.L.; Oliveira, C. & Venere, P.C. (2013). Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11:553-564.

Torres-Mariano, A.R. & Morelli, S. (2008). B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology* 31:246-249.

- Vari, R.P. & Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology. Pp. 1-11. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P. & Lucena, C.A.S. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs, 603p.
- Vicari, M.R.; Noleto, R.B.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (2008). Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31:173-179.
- Zaniboni-Filho, E. & Schulz, U.H. (2003). Migratory fishes of the Uruguay river. Pp. 157-194. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Baer, A. & Ross, C. (Eds.). Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status. Victoria: World Fisheries Trust, 372p.
- Zaniboni-Filho, E.; Meurer, S.; Shibatta, O.A. & Nuñez, A.P.O. (2004). Catálogo ilustrado de peixes do Alto rio Uruguai. Florianópolis: Tractebel Energia, 128p.

## 5. CAPÍTULO 1

### **Espécies morfológicamente crípticas de *Astyanax* Baird & Girard 1854 diagnosticadas através de caracteres citogenéticos**

Mariane Gavazzoni<sup>1</sup>, Leonardo M. Paiz<sup>2</sup>, Carlos A. M. Oliveira<sup>3</sup>, Carla S. Pavanelli<sup>2,3</sup>, Weferson J. da Graça<sup>2,3,4</sup>, e Vladimir P. Margarido<sup>1,2</sup>

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Organisms Diversity & Evolution*.

Título curto: Citotaxonomia do grupo *Astyanax bimaculatus* do Sul do Brasil

**Espécies morfologicamente crípticas de *Astyanax* Baird & Girard 1854  
diagnosticadas através de caracteres citogenéticos**

Mariane Gavazzoni<sup>1</sup>, Leonardo M. Paiz<sup>2</sup>, Carlos A. M. Oliveira<sup>3</sup>, Carla S. Pavanelli<sup>2,3</sup>, Weferson J. da Graça<sup>2,3,4</sup>, e Vladimir P. Margarido<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 85819-110 Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá, Pós Graduação em Biologia Comparada, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

\*Autor para correspondência: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 2069, Cascavel, PR 85819-110, Brasil, Tel.: +55 45 3220-3235; Fax: +55 45 3224-4566. e-mail: [vladimir.margarido@unioeste.br](mailto:vladimir.margarido@unioeste.br)

Título curto: Citotaxonomia do grupo *Astyanax bimaculatus* do Sul do Brasil

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio) pela autorização da captura dos peixes (número de licença: SISBIO 10522-1). Os autores são gratos à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Parque Nacional do Iguaçu, Macuco Safari e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) pelo apoio logístico. Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FPTI (Fundação Parque Tecnológico Itaipu).

## Resumo

*Astyanax* é um gênero não monofilético rico em espécies que se distribuem desde o Sul dos Estados Unidos até a região Central da Argentina. Devido à alta diversidade de espécies, possui alguns grupos de espécies crípticas que dificultam a identificação e alocação dentro do gênero, e por vezes resultando em sinonímias. Análises citogenéticas básicas e moleculares foram realizadas em quatro espécies de *Astyanax* pertencentes ao complexo *A. bimaculatus*: *Astyanax altiparanae* (bacia do Alto rio Paraná), *Astyanax jacuhiensis* (bacia do Alto-Médio rio Uruguai), *Astyanax abramis* e *Astyanax asuncionensis* (bacia do Médio-Baixo rio Paraná). Todas as espécies apresentaram  $2n = 50$  cromossomos e regiões organizadoras de nucléolos (RONs) simples: *A. altiparanae*  $6m+28sm+4st+12a$  e RONs no par 20, *A. jacuhiensis*  $8m+28sm+6st+8a$  e RONs no par 22, *A. abramis*  $4m+30sm+8st+8a$  e RONs no par 22, e *A. asuncionensis*  $8m+24sm+6st+12a$  e RONs no par 20. FISH com sondas de 5S rDNA evidenciou cístrons simples para *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, e múltiplos para *A. abramis* e *A. jacuhiensis* (4 cístrons). O padrão de distribuição da heterocromatina se mostrou distinto para cada espécie, sendo predominantemente centromérica e intersticial-proximal. *Astyanax abramis* e *A. asuncionensis* também apresentaram o primeiro par de cromossomos acrocêntricos com heterocromatina centromérica, intersticial-proximal e telomérica no braço longo, o que pode representar cromossomos correspondentes entre estas espécies. Embora haja algumas semelhanças citogenéticas, diferenças na macro e micro estrutura cariotípica permitem a detecção de cariótipos espécie-específicos que podem servir para diferenciar as espécies analisadas e auxiliar na identificação de grupos filogeneticamente próximos no “clado *Astyanax*”.

**Palavras chave:** 5S rDNA, 18S rDNA, FISH, Heterocromatina.

## Introdução

*Astyanax* Baird & Girard, 1854 compreende cerca de 150 espécies válidas distribuídas do Sul dos Estados Unidos à região Central da Argentina, formando um dos grupos mais ricos em espécies em Characidae (Lima et al. 2003; Eschmeyer e Fong 2016). *Astyanax* é considerado polifilético (Mirande 2009, 2010; Oliveira et al. 2011) com espécies morfologicamente semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas, o que torna difícil a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas dentro do gênero (Melo 2001). Também apresenta espécies morfologicamente crípticas e alguns complexos de espécies (grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares) que possuem grande variabilidade cromossômica (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2008) e cujas relações filogenéticas nunca foram avaliadas.

Entre os complexos de espécies de *Astyanax*, *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758) inclui cerca de 30 espécies (Soares e Lucena 2013), caracterizadas por apresentar uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada (característica mais conspícua do complexo), duas barras verticais marrons e difusas na região umeral (a primeira cruzando a mancha umeral e a segunda 2 a 3 escamas atrás) e uma mancha negra no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos. Dentre elas, *A. abramis* (Jenyns, 1842), *A. altiparanae* Garutti e Britski, 2000, *A. jacuhiensis* Cope, 1894, e *A. asuncionensis* Géry, 1972 ocorrem na bacia do Prata.

*Astyanax altiparanae* foi descrita na bacia do Alto rio Paraná (Garutti e Britski 2000) e, posteriormente teve sua distribuição expandida para o rio Iguaçu (Prioli et al. 2002; Graça e Pavanelli 2002). *Astyanax jacuhiensis* foi descrita para o rio Jacuí, e distribuiu-se pela bacia do rio Uruguai e drenagens costeiras do sul do Brasil (Lima et al. 2003). Por outro lado, *A. asuncionensis* está distribuída ao longo dos rios Paraguai e Baixo Paraná, e *A. abramis* através do Alto rio Amazonas, Alto rio Meta e bacia do Prata (Lima et al. 2003).

Com relação a estas quatro espécies, *A. abramis* difere de *A. asuncionensis* e *A. altiparanae* por apresentar 42 a 49 escamas na linha lateral (*vs.* máximo 40, segundo Garutti e Britski 2000 e Britski et al. 2007). Segundo Garutti (1995), Garutti e Britski (2000) e Garutti e Langeani (2009), *A. altiparanae* difere de *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* pelo padrão de cromatóforos epidérmicos dispostos sobre as escamas do flanco ventral, que é disperso em *A. altiparanae* (*vs.* listrado em *A. asuncionensis* e *A.*

*jacuhiensis*). Dados morfológicos de *A. jacuhiensis* são praticamente ausentes na literatura e a validade de *A. altiparanae* relacionado com *A. jacuhiensis* foi questionada por Soares e Lucena (2013). Em recente revisão taxonômica no complexo *A. bimaculatus* das bacias hidrográficas dos rios do Prata e São Francisco bem como dos sistemas costeiros do sudeste do Brasil e Uruguai, Lucena e Soares (2016) reconhecem *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* como novos sinônimos juniores de *A. lacustris*, considerando espécies válidas somente *Astyanax lacustris* (distribuída ao longo das bacias do Prata e rio São Francisco, sistema da Laguna dos Patos, rio Tramandaí e rio Araguaia) e *A. abramis* (distribuída ao longo das bacias do rio Paraguai, Médio-Baixo rio Paraná e Baixo rio Uruguai).

Os dados citogenéticos para *Astyanax* mostram ampla variabilidade cariotípica entre as espécies, com número diplóide variando de 36 cromossomos em *A. schubarti* Britski, 1964 (Morelli et al. 1983; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001) e *A. correntinus* (Holmberg, 1891) (Paiz et al. 2015) a 50 cromossomos em *A. altiparanae* (Ferreira-Neto et al. 2009), *A. jacuhiensis* (Silva et al. 2012), *A. laticeps* (Cope, 1894) (Rosa et al. 2009), *A. scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Vicari et al. 2008), *A. xavante* Garutti e Venere, 2009 (Tenório et al. 2013), entre outras. Além de variação na macroestrutura cariotípica e número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), também é comum em *Astyanax* a ocorrência de cromossomos B, de triploidia e de polimorfismos de heterocromatina (Morelli et al., 1983; Kavalco et al., 2007; Machado et al., 2012).

Nas espécies correlacionadas *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* foram encontradas semelhanças no número diplóide, número e posição das RONs e padrão de bandamento C (Fernandes e Martins-Santos 2006; Pacheco et al. 2010). Do mesmo modo, *A. abramis* e *A. asuncionensis* também apresentaram algumas semelhanças citogenéticas, no entanto, variações na fórmula cariotípica e número/localização de cístrons 5S rDNA permitiram diferenciá-las (Paiz et al. 2015).

Nosso objetivo foi expandir as análises citogenéticas de *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* a fim de encontrar marcadores espécie-específicos, além de compará-las com *A. abramis* e *A. asuncionensis*. Além disso, contribuir para aumentar o conhecimento sobre sistemática e taxonomia do complexo *A. bimaculatus* e do “clado *Astyanax*” *sensu* Mirande (2009, 2010).

## **Materiais e Métodos**

Os espécimes analisados foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – (NUP), da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil: nove exemplares de *A. altiparanae* (4 fêmeas e 5 machos, NUP 17156, rio Paraná, bacia do Alto rio Paraná, 22°45'53.50"S; 53°15'27.31"O); seis exemplares de *A. jacuhiensis* (quatro fêmeas e dois machos, NUP 14927, rio Ijuí, bacia do Alto-Médio rio Uruguai, 28°18'06.30"S; 53°53'33.60"O); seis exemplares de *A. abramis* (três machos e três fêmeas, NUP 14581, rio Iguaçu, jusante às Cataratas do Iguaçu, 25°38'18.72"S; 54°28'4.74"O); 25 exemplares de *A. asuncionensis* (treze machos e doze fêmeas, NUP 14584, rio Iguaçu, bacia do Médio-Baixo rio Paraná, jusante às Cataratas do Iguaçu, 25°38'18.72"S; 54°28'4.74"O).

Todos os exemplares foram anestesiados e sacrificados através de *overdose* por óleo de cravo seguindo Griffiths (2000). As preparações foram obtidas através das técnicas propostas por Bertollo et al. (1978). As RONS foram evidenciadas por impregnação com prata, seguindo a técnica descrita por Howell e Black (1980). O bandamento C foi utilizado para determinar as regiões de heterocromatina, seguindo a técnica proposta por Sumner (1972), com modificações sugeridas por Lui et al. (2012). O mapeamento físico das sequências de 5S rDNA e de 18S rDNA foi realizado através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de acordo com Pinkel et al. (1986) e modificações sugeridas por Margarido e Moreira-Filho (2008), com sondas obtidas de *Leporinus elongatus* (= *Leporinus obtusidens* segundo Britski et al. 2012) (Martins e Galetti-Jr. 1999) e de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti-Jr. 2004), respectivamente. As sondas foram marcadas através de *nick translation*, com digoxigenina-11-dUTP (5S rDNA) e biotina-16-dUTP (18S rDNA) (Roche®). A detecção dos sinais foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche®) para sonda de 5S rDNA e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotilada (Sigma-Aldrich) para sonda de 18S rDNA, e os cromossomos foram posteriormente contra-corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 50 µg/mL). O material analisado foi fotografado utilizando-se microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71 em conjunto com o software DP Controller 3.2.1.276. Os cromossomos foram classificados e organizados de acordo com Levan et al. (1964) em metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*), subtelocêntricos (*st*) e acrocêntricos (*a*). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos *m*, *sm*, e *st* como tendo dois braços, e cromossomos *a* como tendo apenas um braço.

## Resultados

### *Astyanax altiparanae*

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $6m+28sm+4st+12a$ , FN=88) para machos e fêmeas (Fig. 1a). Foram observadas RONS simples localizadas no braço curto do par de cromossomos 20 (Fig. 1a, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 2, 8 e 12; intersticial-proximal no braço longo dos pares 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 18, 22 e 25, e coincidente com as RONS (Fig. 1b). A FISH revelou cístrons simples de 5S rDNA em posição centromérica no par  $m$  2, e cístrons simples de 18S rDNA em posição terminal no braço curto do par  $a$  20 (Fig. 2a).

### *Astyanax jacuhiensis*

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $8m+28sm+6st+8a$ , FN=92) para machos e fêmeas (Fig. 1c). Foram observadas RONS simples localizadas em posição terminal do braço curto do par de cromossomos 22 (Fig. 1c, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 2, 6, 9 e 23; intersticial-proximal no braço longo dos pares 6, 9, 10, 11, 12, 15, 20 e 21, e coincidente com as RONS (Fig. 1d). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA na posição centromérica no par  $m$  2 e par  $st$  20, e cístrons de 18S rDNA na posição terminal do braço curto do par  $a$  22 (Fig. 2b).

### *Astyanax abramis*

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $4m+30sm+8st+8a$ , FN=92) para machos e fêmeas (Fig. 1e). Foram observadas RONS simples localizadas em posição terminal no braço curto do par de cromossomos 22 (Fig. 1e, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 7, 14 e 21, intersticial-proximal no braço longo dos pares 22 e 24, telomérica nos braços curto e longo do par 22, e coincidente com as RONS (Fig. 1f). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica no par  $sm$  7 e no par  $sm$  20, e cístrons simples de 18S rDNA em posição terminal no braço curto do par  $a$  22 (Fig. 2c).

### *Astyanax asuncionensis*

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $8m+24sm+6st+12a$ , FN=88) para machos e fêmeas (Fig. 1g). Foram observadas RONS simples localizadas em posição terminal do braço curto do par de cromossomos 20 (Fig. 1g, in box). O bandamento C

mostrou heterocromatina centromérica nos pares 2, 3 e 20, intersticial-proximal no braço curto do par 8 e braço longo dos pares 9, 13 e 14, telomérica no braço longo do par 8, e no braços curto e longo do par 20, e coincidente com as RONS (Fig. 1h). A FISH revelou cístrons simples de 5S rDNA na posição centromérica no par *sm* 9, e cístrons simples de 18S rDNA na posição terminal do braço curto do par *a* 20 (Fig. 2d).

## Discussão

O número diplóide de 50 cromossomos tem sido frequentemente observado em *Astyanax*, como em *A. argyrimarginatus* Garutti, 1999, *A. elachylepis* Bertaco e Lucinda, 2005, *A. aff. bimaculatus*, e *A. xavante* (Tenório et al. 2013), *A. scabripinnis* (Vicari et al. 2008), entre outras. De acordo com Mirande (2010) e Oliveira et al. (2011), o grande número de espécies de *Astyanax* com esta característica pode ser considerado fator importante na realização de uma análise de parentesco, uma vez que o gênero não representa um grupo natural de espécies.

Foi observado em *A. altiparanae*, *A. jacuhiensis*, *A. abramis* e *A. asuncionensis* o primeiro par de cromossomos metacêntricos que se destaca em tamanho em comparação com outros cromossomos do complemento e o predomínio de pares submetacêntricos. Este primeiro par de cromossomos é comum em *Astyanax* e também em outros gêneros de Characidae, o que pode ser uma característica plesiomórfica na família (Morelli et al. 1983; Tenório et al. 2013), e uma simplesiomorfia no gênero (Ferreira-Neto et al. 2009; Kavalco et al. 2009). As exceções para essa condição foram relatadas em *A. schubarti* (Morelli et al. 1983; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001), *A. fasciatus* (Cuvier 1819) (Pazza et al. 2008) e *A. correntinus* (Paiz et al. 2015), que possuem número diplóide menor que 50 cromossomos e grandes pares cromossômicos metacêntricos/submetacêntricos, resultado de fusões cromossômicas. As espécies aqui analisadas apresentaram predominância de cromossomos bi-braçados; no entanto, a fórmula cariotípica permitiu a diferenciação das espécies.

O número e a localização das RONS (coloração por nitrato de prata e FISH com sonda 18S rDNA) mostraram-se conservados nas quatro espécies, todas apresentando RONS simples localizadas no braço curto do primeiro par de cromossomos acrocêntricos. Assim, este par pode representar uma condição plesiomórfica para o complexo *A. bimaculatus*, uma vez que também foi verificado em outras espécies deste grupo, tais como *A. lacustris* (Peres et al. 2008), *A. argyrimarginatus* e *A. aff. bimaculatus* (Tenório et al. 2013). Dessa forma, de acordo com Rubert e Margarido

(2007) o cariótipo putativo para Characiformes é composto por  $2n = 50$  cromossomos bi-braçados e RONS simples, e portanto as espécies aqui analisadas possuem essa condição plesiomórfica.

Os cístrons de 5S rDNA foram simples em *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, e múltiplos para *A. abramis* e *A. jacuhiensis* (4 cístrons), todos localizados em posição centromérica. Cístrons simples também foram relatados em populações de *A. altiparanae* (Peres et al. 2008; Ferreira-Neto et al. 2009; Pacheco et al. 2011), *A. asuncionensis* (Paiz et al. 2015), *A. elachylepis*, *A. xavante* (Tenório et al. 2013) e *A. lacustris* (Peres et al. 2008). Cístrons múltiplos de 5S rDNA foram encontrados em *A. scabripinnis* (Vicari et al. 2008), *A. fasciatus* Ferreira-Neto et al. 2012), *A. abramis* e *A. correntinus* (Paiz et al. 2015). Dados citogenéticos para o gênero têm mostrado variações quanto ao número e localização de cístrons de 5S rDNA, sendo um marcador importante para o diagnóstico e as hipóteses de relações de parentesco entre as espécies (Almeida-Toledo et al. 2002). Resultados semelhantes foram encontrados em outros gêneros, como por exemplo em *Brycon* (Wasko et al. 2001), *Characidium* (Pucci et al. 2014), *Hypostomus* (Pansonato-Alves et al. 2013), *Hoplías* (Blanco et al. 2010), entre outros. Deste modo, este marcador provou ser um caráter derivado em *A. jacuhiensis* e *A. abramis* comparado com *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, além de contribuir para diferenciar estas espécies morfológicamente semelhantes.

Em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, todas as espécies apresentaram heterocromatina pálida na maioria dos cromossomos, preferencialmente centromérica e intersticial-proximal, além de associadas às RONS. Além disso, *A. abramis* e *A. asuncionensis* apresentaram o primeiro par de cromossomos acrocêntricos com heterocromatinas centromérica, intersticial-proximal e telomérica no braço longo. Estas características podem representar cromossomos correspondentes e reforçar a proximidade destas espécies no “clado *Astyanax*” proposto por Mirande (2009; 2010), além de diferenciá-las das outras espécies do complexo *A. bimaculatus* aqui analisadas. Por outro lado, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* apresentaram mais pares de cromossomos com heterocromatina intersticial-proximal do que *A. abramis* e *A. asuncionensis*. O padrão de heterocromatinas intersticial-proximais mais pálidas foi relatado em outros estudos, sendo uma característica compartilhada pelas espécies que compõem o complexo *A. bimaculatus* (Almeida-Toledo et al. 2002; Ferreira-Neto et al. 2009; Pacheco et al. 2010; Peres et al. 2008; Silva et al. 2012; Tenório et al. 2013; Yano et al. 2014).

Garutti (1995) e Garutti e Britski (2000) mencionam que as espécies do complexo *A. bimaculatus* que possuem um dente no maxilar, assim como a espécie-tipo do grupo, são encontradas no Amazonas e bacias do norte, e não ocorrem nas bacias do rio São Francisco, do Prata, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e Sistema da Laguna dos Patos. No entanto, foi encontrado dente no maxilar nas quatro espécies aqui analisadas. Este dente é pequeno, uni ou tricuspídeo e geralmente ocorre em apenas um dos ossos e em baixa frequência: cinco dos 28 espécimes de *A. asuncionensis*, NUP 14584; um de quatro espécimes de *A. jacuhiensis*, NUP 14927; dois de 23 espécimes em *A. altiparanae*, NUP 17156. Em *A. abramis*, NUP 14581 (seis espécimes), não foi encontrado dente no maxilar, mas a análise adicional no NUP 7956 (seis espécimes), do rio Ariranha - bacia do rio Paraguai, foi encontrado um indivíduo com dente tricuspídeo. Em outro lote de *A. altiparanae*, NUP 6771 (dois espécimes), do rio Pitangui - bacia do Alto rio Paraná, ambos os espécimes apresentaram o dente. Sua ocorrência em espécies da bacia do Prata, embora com baixa frequência, deve ser levado em conta em futuras revisões e descrições de espécies.

Além de semelhanças morfológicas, estudos citogenéticos também mostraram similaridade cromossômica entre espécies do complexo *A. bimaculatus*, por exemplo, Pacheco et al. (2010) em *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis*, Peres et al. (2008) em *A. altiparanae* e *A. lacustris* e Tenório et al. (2013) em *A. altiparanae*, *A. argyrimarginatus* e *A. aff. bimaculatus*, demonstrando relação mais estreita entre elas e sugerindo que estas espécies devem ser mais estreitamente relacionadas dentro do “clado *Astyanax*”, quando comparado a outras espécies congêneres. Análises moleculares de DNA nuclear foram realizadas por Carvalho et al. (2002) em espécies de Characiformes da região Neotropical, incluindo *A. abramis* e *A. asuncionensis*, além de outras que também pertenciam a *Incertae sedis* em Characidae segundo Lima et al. (2003). Tais marcadores associados com outras ferramentas citogenéticas como fórmula cariotípica, padrão de distribuição de heterocromatina e localização dos genes ribossômicos (5S e 18S), podem contribuir para a caracterização e diferenciação de espécies similares como aqui verificado.

Após análises de filogenia em Characidae e o estabelecimento do “clado *Astyanax*” por Mirande (2009, 2010), estudos citogenéticos básicos e moleculares em *A. abramis* e *A. asuncionensis* evidenciaram marcadores específicos, tais como fórmula cariotípica e localização dos cístrons de 5S rDNA (Paiz et al. 2015), corroborados aqui.

Estes marcadores podem ser utilizados na separação destas espécies e de outros grupos dentro do “clado *Astyanax*”.

Do mesmo modo, apesar de *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* serem consideradas sinônimos juniores de *A. lacustris* devido a sobreposição dos caracteres morfológicos (Lucena & Soares, 2016), nossos dados mostram diferenças entre estas espécies, como fórmula cariotípica, padrão de distribuição da heterocromatina e localização dos cístrons de 5S rDNA. As diferenças encontradas na macro e micro estrutura cariotípica permitem a detecção de cariótipos espécie-específicos, que associados com análise molecular e morfológica, pode contribuir para a formação de grupos filogeneticamente relacionados em *Astyanax*, buscando elucidar as hipóteses de relações de parentesco neste grupo de peixes.

Em suma, o número diplóide e o par cromossômico portador das RONS são caracteres compartilhados pelas espécies do complexo *A. bimaculatus*, corroborando sua similaridade morfológica. A presença de dente no maxilar, embora menos frequente nas espécies das bacias do São Francisco, bacia do Prata e bacias costeiras do que no Amazonas e bacias do norte, não é caráter diagnóstico entre as espécies do complexo *A. bimaculatus*. Marcadores cromossômicos utilizados pela citogenética são muito eficientes em alguns grupos de peixes, e apesar de não substituírem a taxonomia clássica, eles podem representar uma importante ferramenta quando associada às análises da sistemática e taxonomia. Aqui verificado, a localização dos cístrons de 5S rDNA e o padrão de distribuição da heterocromatina devem ser incluídos em análises filogenéticas envolvendo todas as espécies do complexo.

### Referências Bibliográficas

- 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*, doi: 10.1159/000066609
- Artoni, R. F., Shibatta, A. O., Gross, M. C., Schneider, C. H., Almeida, M. C., Vicari, M. R., & Bertollo, L. A. C. (2006) *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252006000200005

- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S., & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1(2), 103-120.
- Blanco, D. R., Lui, R. L., Bertollo, L. A. C., Diniz, D., & Moreira-Filho, O. (2010). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, doi: 10.1007/s11160-009-9116-3
- Britski, H. A., Birindelli, J. L. O., & Garavello, J. C. (2012). A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 52(37), 441-475.
- Britski, H. A., Silimon, K. Z. S., & Lopes, B. S. (2007). *Peixes do Pantanal: manual de identificação*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Carvalho, M. L., Oliveira, C., Navarrete, M. C., Froehlich, O., & Foresti, F. (2002). Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572002000100010
- Daniel-Silva, M. F. Z., & Almeida-Toledo, L. F. (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia*, doi: 10.1080/00087114.2001.10589228
- Eschmeyer, W. N., & Fong, J. D. (2016). Species by family/subfamily. Eletronic version.  
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Characidae/>. Accessed 29 February 2016.
- Fernandes, C. A., & Martins-Santos, I. C. (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572006000300011
- Ferreira-Neto, M., Artoni, R. F., Vicari, M. R., Moreira-Filho, O., Camacho, J. P. M., Bakkali, M., et al. (2012) Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax*

- fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.2151
- Ferreira-Neto, M., Vicari, M. R., Camargo, E. F., Artoni, R. F., & Moreira-Filho, O. (2009) Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572009005000078
- Garutti, V. (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. Tese (Livre-Docência), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Garutti, V., & Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia* 13, 65-88.
- Garutti, V., & Langeani, F. (2009) Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252009000300003
- Graça, W. J., & Pavanelli, C. S. (2002) *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguazu River basin. *Acta Scientiarum*, 24(2), 451-453.
- Griffiths, S. P. (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology*, doi:10.1006/jfbi.2000.1406
- Hatanaka, T., & Galetti-Jr, P. M. (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, doi: 10.1007/s10709-004-2039-y
- Howell, W. M., & Black, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, doi: 10.1007/BF01953855
- Kavalco, K. F., Brandao, K. O., Pazza, R., & Almeida-Toledo, L. F. (2009) *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*. *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572009005000055

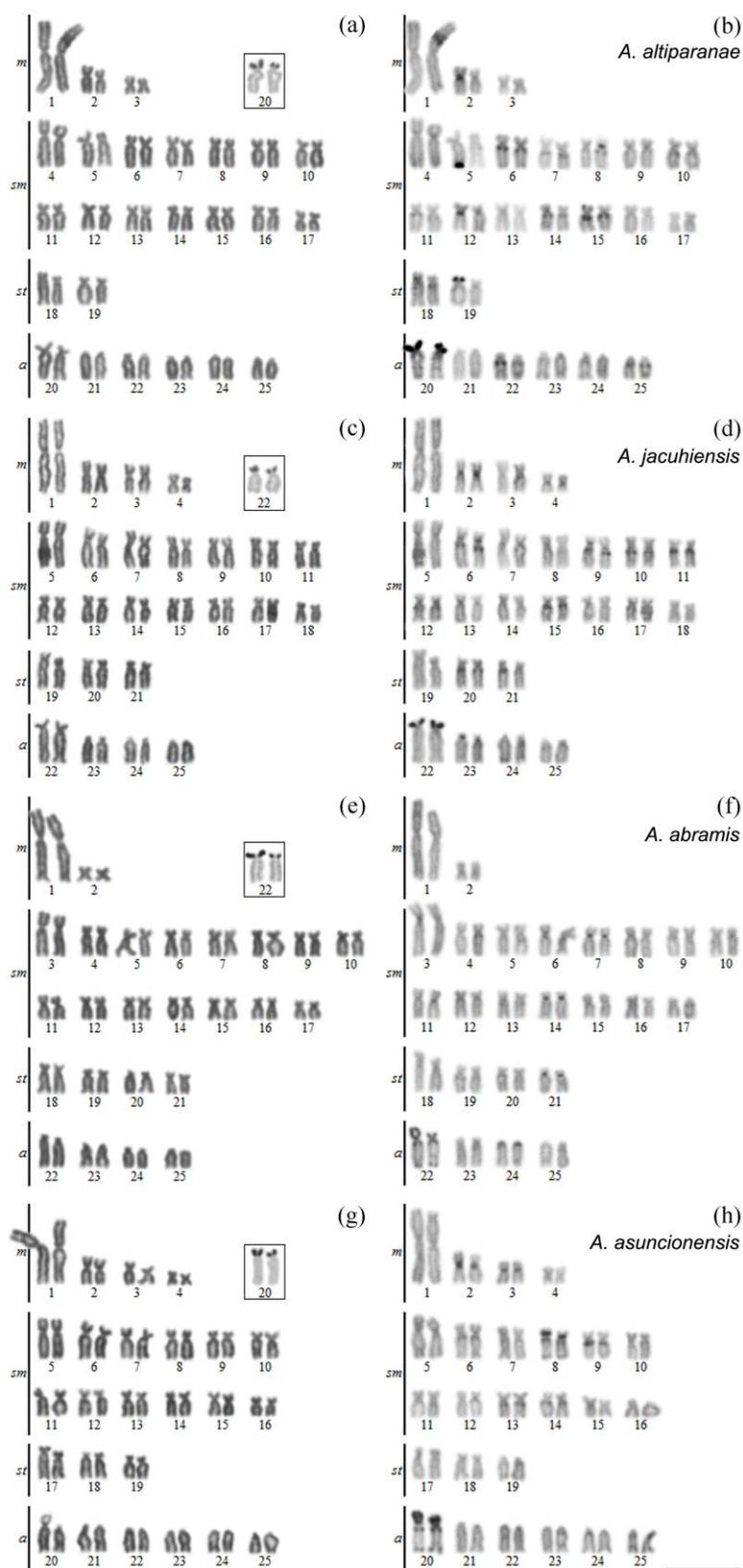
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2007) Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572007000400005
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Silva, J. F. P., Vari, R. P., Harold, A., et al. (2003). Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris-Jr, C. J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (pp. 106-169). Porto Alegre: Edipucrs.
- Lucena, C. A. S., & Soares, H. G. (2016) Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup *sensu* Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, doi: org/10.11646/zootaxa.4072.1.5
- Lui, R. L., Blanco, D. R., Moreira-Filho, O., & Margarido, V. P. (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*, doi: 10.3109/10520295.2012.696700
- Machado, N. S., Ferreira-Neto, M., Bakkali, M., Vicari, M. R., Artoni, R. F., Oliveira, C., & Foresti, F. (2012). Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia*, 65, 40-46. doi: 10.1080/00087114.2012.678086.
- Margarido, V. P., & Moreira-Filho, O. (2008) Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572008000200012
- Martins, C., & Galetti-Jr, P. M. (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, doi: 10.1023/A:1009216030316
- Melo, F. A. G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 59:1-46.
- Mirande, J. M. (2009) Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, doi: 10.1111/j.1096-0031.2009.00262.x

- Mirande, J. M. (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252010000300001
- Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a “species complex”. *Brazilian Journal of Genetics*, 14(2), 331-357.
- Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira-Filho, O., & Toledo-Filho, S. A. (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotype variability. *Caryologia*, doi: 10.1080/00087114.1983.10797664
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., et al. (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology*, doi: 10.1186/1471-2148-11-275
- Pacheco, R. B., Giuliano-Caetano, L., Julio-Jr, H. F., & Dias, A. L. (2010) Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252010000300013
- Pacheco, R. B., Rosa, R., Giuliano-Caetano, L., Julio-Jr, H. F., & Dias, A. L. (2011) Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetics*, doi: 10.3897/CompCytogen.v5i3.1235
- Paiz, L. M., Baumgartner, L., Graça, W. J., & Margarido, V. P. (2015) Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. *Comparative Cytogenetics*, doi: 10.3897/CompCytogen.v9i1.9002
- Pansonato-Alves, J. C., Serrano, E. A., Utsunomia, R., Scacchetti, P. C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2013) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, doi: 10.1007/s11160-013-9303-0
- Pazza, R., Kavalco, S. A. F., Penteadó, P. R., Kavalco, K. F., & Almeida-Toledo, L. F. (2008) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x

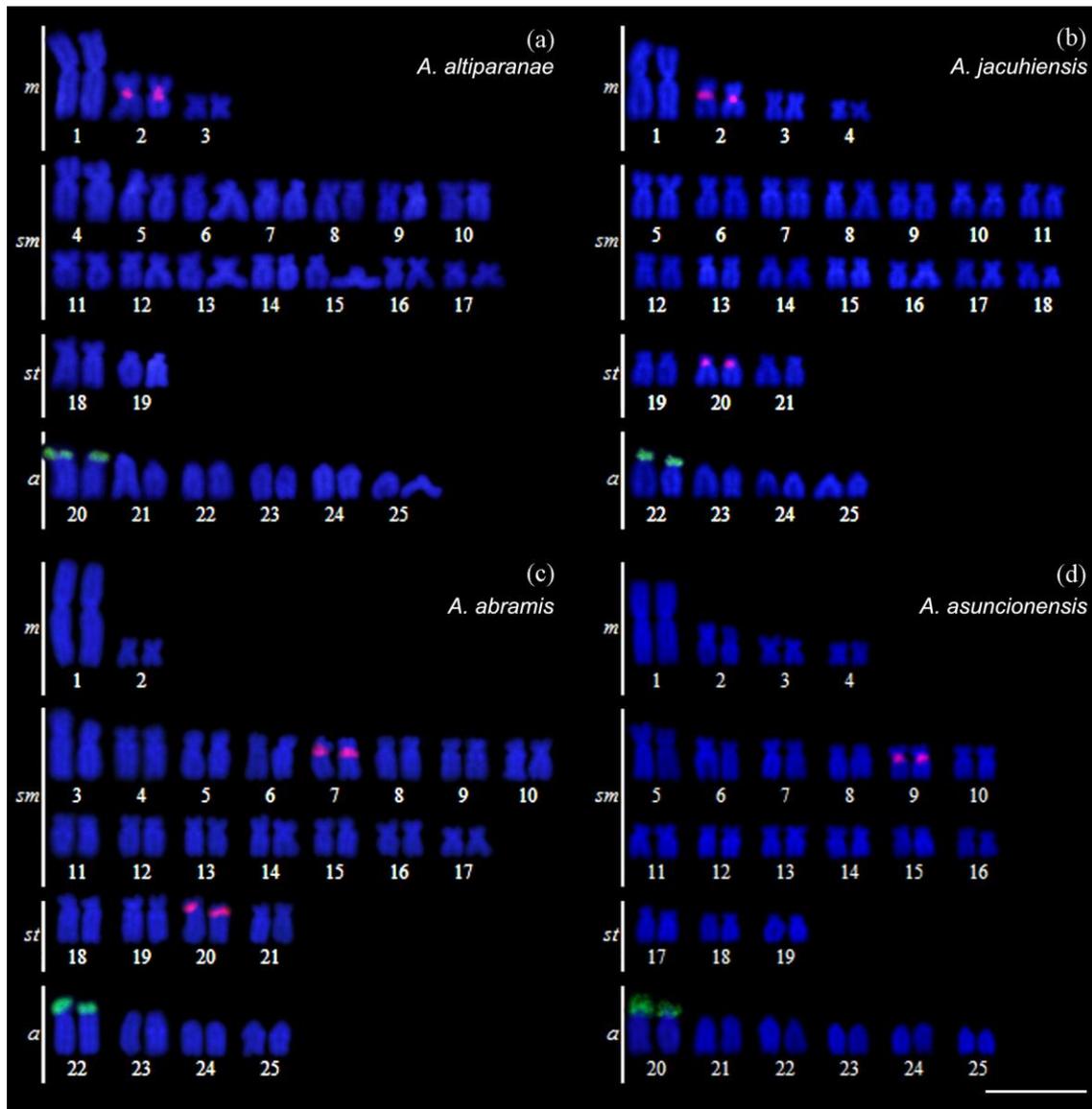
- Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572008000200009
- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.83.9.2934
- Prioli, S. M. A. P., Prioli, A. J., Júlio-Jr, H. F., Pavanelli, C. S., Oliveira, A. V., Carrer, H., et al. (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, doi: 10.1590/S1415-47572002000400011
- Pucci, M. B., Barbosa, P., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Pansanoto-Alves, J. C., et al. (2014) Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biological Journal of the Linnean Society*, doi: 10.1111/bij.12218
- Rosa, R., Rubert, M., Malabarba, L. R., Martins-Santos, I. C., & Giuliano-Caetano, L. (2009) Cytogenetics analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252009000400007
- Rubert, M., & Margarido, V. P. (2007) Cytogenetic Studies in Three Species of the Genus *Oligosarcus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, doi: 10.1590/S1516-89132007000100015
- Silva, L. L. L., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2012) Chromosome Studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, Using *in situ* Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA3 Staining. *Folia Biologica – Krakow*, doi: 10.3409/fb60\_3-4.135-140
- Soares, H. G., & Lucena, C. A. S. (2013) Análise taxonômica de *Astyanax jacuhiensis* e comparação com *A. altiparanae* (Characiformes, Characidae). XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Maringá, Paraná, Brasil.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Tenório, R. C. C. O., Vitorino, C. A., Souza, I. L., Oliveira, C., & Venere, P. C. (2013) Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on

the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology*, doi: 10.1590/S1679-62252013000300008

- 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*, doi: 10.1590/ S1415-47572009005000078
- Yano, C. F., Moreira-Filho, O., & Margarido, V. P. (2014) Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. *Biologia*, doi: 10.2478/s11756-014-0366-8
- Wasko, A. P., Martins, C., Wright, J. M., & Galetti-Jr, P. M. (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, doi: 10.1139/gen-44-5-893



**Fig. 1** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax altiparanae*, (c) *A. jacuhiensis*, (e) *A. abramis*, (g) *A. asuncionensis* e C-bandados de (b) *A. altiparanae*, (d) *A. jacuhiensis*, (f) *A. abramis*, (h) *A. asuncionensis*. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10  $\mu$ m.



**Fig. 2** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax altiparanae*, (b) *A. jacuhiensis*, (c) *A. abramis*, (d) *A. asuncionensis*. A barra representa 10  $\mu$ m.

## 6. CAPÍTULO 2

**Caracterização citogenética em seis espécies de *Astyanax* Baird & Girard 1854  
(Characiformes: Characidae) de duas bacias hidrográficas brasileiras:  
contribuições à taxonomia e sistemática do grupo**

Mariane Gavazzoni<sup>1</sup>, Carlos A. M. Oliveira<sup>3</sup>, Carla S. Pavanelli<sup>2,3</sup>, Weferson J. da  
Graça<sup>2,3,4</sup>, Vladimir P. Margarido<sup>1,2</sup>

Artigo elaborado e formatado  
conforme as normas para publicação  
científica no periódico *Neotropical  
Ichthyology*.

Título curto: Diversidade cromossômica em *Astyanax*.

**Caracterização citogenética de seis espécies de *Astyanax* Baird & Girard 1854 (Characiformes: Characidae) de duas bacias hidrográficas brasileiras: contribuições à taxonomia e sistemática do grupo**

Mariane Gavazzoni<sup>1</sup>, Carlos A. M. Oliveira<sup>3</sup>, Carla S. Pavanelli<sup>2,3</sup>, Weferson J. da Graça<sup>2,3,4</sup>, Vladimir P. Margarido<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 85819-110 Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá, Pós Graduação em Biologia Comparada, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

\*Autor para correspondência: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 2069, Cascavel, PR 85819-110, Brasil, Tel.: +55 45 3220-3235; Fax: +55 45 3224-4566. e-mail:

[vladimir.margarido@unioeste.br](mailto:vladimir.margarido@unioeste.br)

Título curto: Diversidade cromossômica em *Astyanax*.

**Resumo:** *Astyanax* compreende um grupo complexo com ampla distribuição geográfica e diversidade de espécies com formas bastante semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas, o que dificulta a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas, e por vezes resulta em sinonímias desnecessárias. Análises citogenéticas básicas e moleculares foram realizadas em seis espécies de *Astyanax* de duas bacias hidrográficas: *A. cf. aramburui*, *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus*, *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* e *Astyanax* sp. (bacia do Alto-Médio rio Uruguai), e *A. aff. fasciatus* (bacia do Alto rio Paraná). Os resultados mostraram variação interespecífica no número diplóide, de  $2n=46$  cromossomos em *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus*,  $2n=48$  cromossomos em *A. eigenmanniorum*, e  $2n=50$  cromossomos no restante das espécies. As AgRONS, confirmadas pela 18S rDNA-FISH, evidenciaram cístrons simples em *A. cf. aramburui*, *A. aff. laticeps* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), e cístrons múltiplos em *A. eigenmanniorum* (4 cístrons), *A. aff. fasciatus* (rio Piquiri) (4 cístrons), *A. cf. paris* (9 cístrons) e *Astyanax* sp. (10 cístrons), confirmando a alta variabilidade encontrada no gênero. FISH com sonda de 5S rDNA evidenciou cístrons múltiplos em posição centromérica em um par de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos acrocêntricos para todas as espécies analisadas, sendo que *A. cf. aramburui*, *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) e *A. cf. paris* apresentaram cístrons adicionais em um par de cromossomos metacêntricos, um par de cromossomos acrocêntricos, e um cromossomo submetacêntrico, respectivamente. O padrão de distribuição da heterocromatina se mostrou distinto para todas as espécies, com exceção de *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), onde foi verificado semelhanças citogenéticas que podem indicar maior proximidade entre estas espécies quando comparado com as demais analisadas, sendo que a distribuição dos genes ribossomais 5S rDNA se mostrou importante na diferenciação destas espécies crípticas. Os resultados relatam os primeiros dados citogenéticos para *A. cf. paris* e revelam semelhanças citogenéticas com outras espécies congêneres. Em suma, os resultados do presente estudo fornecem dados que auxiliam na taxonomia e sistemática do “clado *Astyanax*” e “clado *Astyanax paris*”, reforçando a necessidade de revisões amplas, que incluam marcadores como mapeamento dos cístrons de 5S rDNA e padrão de distribuição da heterocromatina, para melhor compreensão das relações filogenéticas no grupo.

**Palavras-chave:** Clado *Astyanax*; clado *Astyanax paris*; heterocromatina; FISH; 5S rDNA.

## Introdução

Entre os principais grupos de peixes neotropicais, Characiformes comporta 23 famílias (incluindo Bryconidae, Chalceidae, Iguanodectidae e Thiportheidae), 270 gêneros e aproximadamente 2.100 espécies (Albert *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Eschmeyer & Fong, 2016), sendo Characidae a mais complexa e representativa, com cerca de 1.100 espécies (Eschmeyer & Fong, 2016), representando um componente-chave nos ecossistemas de água doce neotropicais (Oliveira *et al.*, 2011).

Devido a grande variedade de espécies, de formas e distribuição geográfica, além de representar um dos grupos mais ativos em termos de descrição de novas espécies, Characidae possui problemas taxonômicos e sistemáticos que dificultam a classificação e o estabelecimento de relações filogenéticas (Lucena, 1993; Oliveira *et al.*, 2011). Assim, apesar dos esforços taxonômicos e moleculares, vários gêneros e espécies estão listados em *Incertae sedis* devido não apresentarem relações filogenéticas bem definidas (Lima *et al.*, 2003; Mirande, 2009, 2010). Pertencendo atualmente a este grupo, *Astyanax* Baird & Girard 1854 foi primeiramente alocado em Tetragonopterinae, após reorganização taxonômica foi listado em *Incertae sedis* juntamente com todos os gêneros desta subfamília (com exceção de *Tetragonopterus*) (Lima *et al.*, 2003).

Em recente revisão taxonômica, utilizando caracteres morfológicos, Mirande (2009; 2010) propôs uma nova organização na filogenia de Characidae, criando dois novos ramos denominados “clado *Astyanax*” e “clado *Astyanax paris*” visando aproximar gêneros listados em *Incertae sedis*. Segundo o autor, *Astyanax paris* Azpelicueta, Almirón & Casciotta 2002 difere das outras espécies do gênero em características como falta de ganchos ósseos na nadadeira de machos adultos e presença de vários dentes superiores, sendo que possivelmente deva ser transferido para um novo gênero.

*Astyanax* é considerado um taxon polifilético que compreende espécies com formas bastante semelhantes e delimitações taxonômicas pouco detalhadas que dificultam a identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas (Melo, 2001; Mirande, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Além disso, muitas espécies foram descritas com base em poucos exemplares ou foram identificadas erroneamente, causando problemas como sinonímias ou subestimação/superestimação da diversidade no gênero, como por exemplo, *Astyanax* aff. *fasciatus* (Cuvier 1819), que possivelmente deve ser identificado

como *A. aramburui* Protogino, Miquelarena & López 2006 ou *A. rutilus* (Jenyns 1842) para as bacias da Argentina e Uruguai (Mirande & Koerber, 2015).

Também são conhecidos no gênero os complexos de espécies, que são grupos de espécies que compartilham características morfológicas muito similares e alta variabilidade cromossômica, como por exemplo: complexo *Astyanax paranae* Eigenmann 1914, *A. bimaculatus* (Linnaeus 1758), *A. scabripinnis* (Jenyns 1842), *A. fasciatus* e *A. altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006).

Os dados citogenéticos indicam ampla variabilidade cromossômica e elevado grau de polimorfismo entre as espécies de *Astyanax* (Tenório *et al.*, 2013). O número diplóide varia de 36 cromossomos em *A. correntinus* (Holmberg 1891) (Paiz *et al.*, 2015) e *A. schubarti* Britski 1964 (Morelli *et al.*, 1983; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2001, 2005) a 50 cromossomos em *A. altiparanae* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009), *A. jacuhiensis* (Cope 1894) (Silva *et al.*, 2012), *A. laticeps* (Cope 1894) (Rosa *et al.*, 2009), *A. scabripinnis* (Castro *et al.*, 2015), entre outras. Também são observadas variações na fórmula cariotípica e número e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), ocorrência de cromossomos B, triploidia e polimorfismos de heterocromatina (Morelli *et al.*, 1983; Kavalco *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012).

Estudos referentes ao número e localização dos genes ribossomais 5S e 18S também têm mostrado variabilidade interespecífica, e tem contribuído na caracterização e diferenciação de populações e espécies do complexo *A. scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2015), do complexo *A. altiparanae* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Fernandes & Martins-Santos, 2006) e do complexo *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2008; Ferreira-Neto *et al.*, 2012). Apesar da variabilidade encontrada em relação a estes genes, os cístrons de 5S rDNA tendem a ser conservados na região centromérica/pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos metacêntricos (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2008), e os cístrons de 18S rDNA tendem a ser conservados no braço curto de pelo menos um par de cromossomos subtelocêntricos (Tenório *et al.*, 2013), tornando-se assim importantes marcadores para diferenciação das espécies e hipóteses de relações de parentesco (Almeida-Toledo *et al.*, 2002).

O presente estudo teve como objetivo expandir as análises citogenéticas no gênero através da caracterização das espécies *Astyanax* cf. *aramburui*, *A. aff. fasciatus*, *A. eigenmanniorum* (Cope 1894), *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* e *Astyanax* sp. coletadas

na bacia do Alto rio Paraná e Alto-Médio rio Uruguai, buscando auxiliar a sistemática e a taxonomia de *Astyanax*.

## Materiais e Métodos

Os espécimes analisados foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – (NUP), da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil: cinco exemplares de *A. aff. fasciatus* (três machos e duas fêmeas, NUP 17783, rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná, 24°56'54"S; 52°35'49"O); dois exemplares de *A. cf. aramburui* (dois machos, NUP 15740), 15 exemplares de *A. aff. fasciatus* (10 machos e cinco fêmeas, NUP 17784), um exemplar de *A. eigenmanniorum* (fêmea, NUP 17785), dois exemplares de *A. aff. laticeps* (dois machos, NUP 17786), três exemplares de *A. cf. paris* (um macho e duas fêmeas, NUP 14909), e um exemplar de *Astyanax* sp. (macho), rio Ijuí, bacia do Alto-Médio rio Uruguai (28°18'06.30"S; 53°53'33.60"O).

Todos os exemplares foram anestesiados e sacrificados através de *overdose* por óleo de cravo seguindo Griffiths (2000). As preparações foram obtidas através das técnicas propostas por Bertollo *et al.* (1978). As RONS foram evidenciadas por impregnação com prata, seguindo a técnica descrita por Howell & Black (1980). O bandamento C foi utilizado para determinar as regiões de heterocromatina, seguindo a técnica proposta por Sumner (1972), com modificações sugeridas por Lui *et al.* (2012). O mapeamento físico das sequências de 5S rDNA e 18S rDNA foi realizado através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de acordo com Pinkel *et al.* (1986) e modificações sugeridas por Margarido & Moreira-Filho (2008), com sondas obtidas de *Leporinus elongatus* (= *Leporinus obtusidens* segundo Britski *et al.*, 2012) (Martins & Galetti-Jr., 1999) e de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti-Jr., 2004), respectivamente. As sondas foram marcadas através de *nick translation*, com digoxigenina-11-dUTP (5S rDNA) e biotina-16-dUTP (18S rDNA) (Roche®). A detecção dos sinais foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche®) para sonda de 5S rDNA e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotinilada (Sigma-Aldrich) para sonda de 18S rDNA, sendo os cromossomos posteriormente contra-corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (50 µg/mL). O material analisado foi fotografado utilizando-se microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71 em conjunto com o software DP Controller 3.2.1.276. Os cromossomos

foram classificados e organizados de acordo com Levan *et al.* (1964) em metacêntricos (*m*), submetacêntricos (*sm*), subtlocêntricos (*st*) e acrocêntricos (*a*). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos *m*, *sm*, e *st* como tendo dois braços, e cromossomos *a* como tendo apenas um braço.

## Resultados

Os resultados estão resumidos na Tabela 1 e são apresentados abaixo.

### *Astyanax cf. aramburui*

O número diplóide foi de 46 cromossomos ( $10m+22sm+8st+6a$ , NF=86) (Fig. 1a). Foram observadas RONS simples localizada no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 1a, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 19, 22 e 23, além de associada às RONS (Fig. 1b). A FISH revelou cópias múltiplas de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2 e 3, e acrocêntricos 22, e cópias simples de 18S rDNA no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 2a).

### *Astyanax aff. fasciatus (rio Ijuí)*

O número diplóide foi de 46 cromossomos ( $10m+22sm+8st+6a$ , NF=86) para machos e fêmeas (Fig. 1c). Foram observadas RONS simples localizadas no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 1c, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 18, 21, 22 e 23, além de associada às RONS (Fig. 1d). A FISH revelou cópias múltiplas de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 3, e acrocêntricos 21 e 22, e cópias simples de 18S rDNA no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 2b).

### *Astyanax aff. fasciatus (rio Piquiri)*

O número diplóide foi de 46 cromossomos ( $10m+16sm+14st+6a$ , NF=86) para machos e fêmeas (Fig. 1e). Foram observadas RONS múltiplas localizadas em posição telomérica no braço curto do par de cromossomos submetacêntricos 7 e no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 9 (Fig. 1e, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 1, 3, 4, 5 e 9; telomérica no braço longo dos

pares 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 22, além de associada às RONS (Fig. 1f). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 4, e acrocêntricos 22, e cístrons múltiplos de 18S rDNA no braço curto do par de cromossomos submetacêntricos 7 e no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 9 (Fig. 2c).

#### ***Astyanax eigenmanniorum***

O número diplóide foi de 48 cromossomos ( $4m+22sm+6st+16a$ , NF=80) (Fig. 3a). Foram observadas RONS múltiplas localizadas em posição telomérica no braço curto dos pares de cromossomos subteloicêntricos 14 e acrocêntricos 22 (Fig. 3a, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 3, 4, 7, 11, e 15; telomérica no braço curto do par 2, e no braço longo do par 20, intersticial-proximal no braço longo do par 15, além de associada às RONS (Fig. 3b). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2 e acrocêntricos 18, e cístrons múltiplos de 18S rDNA no braço curto dos pares de cromossomos subteloicêntricos 14 e acrocêntricos 22 (Fig. 4a).

#### ***Astyanax aff. laticeps***

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $8m+24sm+6st+12a$ , NF=88) (Fig. 3c). Foram observadas RONS simples localizadas no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 3c, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina telomérica no braço longo dos pares 20, 21 e 22, além de associada às RONS (Fig. 3d). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2 e acrocêntricos 21, e cístrons simples de 18S rDNA no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 23 (Fig. 4b).

#### ***Astyanax cf. paris***

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $6m+24sm+8st+12a$ , NF=88) para machos e fêmeas (Fig. 3e). Foram observadas RONS múltiplas localizadas em posição telomérica no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 4, e telomérica no braço curto dos pares de cromossomos acrocêntricos 20 e 23 (Fig. 3e, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 24 e 25; telomérica no braço longo dos pares 5, 7, 20, 21, 22 e 25, e bitelomérica no par 23, além de associada às RONS (Fig. 3f). A FISH revelou cístrons

múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2 e acrocêntricos 21, e intersticial no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 6, e cístrons múltiplos de 18S rDNA em posição terminal no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 4, no braço curto dos pares de cromossomos acrocêntricos 20, 23 e 25, e bitelomérica no par de cromossomos subtelocêntricos 17 (Fig. 4c).

#### ***Astyanax* sp.**

O número diplóide foi de 50 cromossomos ( $6m+18sm+12st+14a$ , NF=86) (Fig. 3g). Foram observadas RONS múltiplas localizadas em posição telomérica no braço curto dos pares de cromossomos subtelocêntricos 14 e acrocêntricos 23, e no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 5 (Fig. 3g, in box). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica nos pares 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 24 e 25; no braço curto dos pares 2 e 14, e terminal no braço longo dos pares 4, 5, 16, 19, 20, 21 e 23, além de associada às RONS (Fig. 3h). A FISH revelou cístrons múltiplos de 5S rDNA em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2 e acrocêntricos 20, e cístrons múltiplos de 18S rDNA em posição terminal no braço curto dos pares de cromossomos metacêntricos 3, submetacêntricos 4, subtelocêntricos 14, acrocêntricos 23 e 25, e no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 5 (Fig. 4d).

#### **Discussão**

As espécies analisadas apresentaram diferenças em relação ao número diplóide, com  $2n=46$  cromossomos para *Astyanax* cf. *aramburuii* e *A. aff. fasciatus* (Fig. 1),  $2n=48$  cromossomos para *A. eigenmanniorum* e  $2n=50$  cromossomos para *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* e *Astyanax* sp. (Fig. 3), confirmando a variabilidade cromossômica encontrada em *Astyanax*. Apesar da variação no número diplóide, este caracter pode ser utilizado em análises filogenéticas, uma vez que o grupo não apresenta indícios de monofiletismo (Mirande, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

Os resultados também evidenciaram a presença do primeiro par de cromossomos metacêntricos de tamanho grande nas espécies com 50 cromossomos, característica considerada plesiomórfica para o gênero e também para Characidae (Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Kavalco *et al.*, 2009; Tenório *et al.*, 2013; Paiz *et al.*, 2015, entre outros).

Exceções a esta condição foram evidenciadas em *Astyanax* cf. *aramburuii*, *A. aff. fasciatus* e *A. eigenmanniorum* que apresentaram número diplóide inferior a 50 cromossomos e grandes pares de cromossomos meta-submetacêntricos, representando uma condição derivada no gênero. Os dados encontrados são semelhantes a outras espécies do gênero como *A. schubarti* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002), *A. bockmanni* (citado como *A. eigenmanniorum*) (Torres-Mariano & Morelli, 2008), *A. aff. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2006; Ferreira-Neto *et al.*, 2012), e *A. correntinus* (Paiz *et al.*, 2015), que compartilham baixo número diplóide originado a partir de fusões cromossômicas.

Do mesmo modo que o número diplóide, as RONS (impregnação pela prata e 18S rDNA-FISH) também se mostraram variáveis tanto no número quanto na localização, representando um importante marcador para a caracterização e diferenciação destas espécies. Cístrons simples foram evidenciados em posição telomérica no braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos em *A. cf. aramburuii*, *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) e *A. aff. laticeps*, e cístrons múltiplos para *A. aff. fasciatus* (rio Piquiri) (4 sítios), *A. eigenmanniorum* (4 sítios), *A. cf. paris* (9 sítios) e *Astyanax* sp. (10 sítios). Cístrons simples são comuns no complexo *A. bimaculatus*, como nas espécies *A. jacuhiensis* (Silva *et al.*, 2012), *A. abramis*, *A. asuncionensis* (Paiz *et al.*, 2015) e *A. lacustris* (Peres *et al.*, 2008), mas também são encontradas RONS simples em outras espécies do gênero como em algumas populações do complexo *A. scabripinnis* (Barbosa *et al.*, 2015) e em *A. elachylepis* (Tenório *et al.*, 2013). Cístrons múltiplos são comuns no complexo *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2008; Ferreira-Neto *et al.*, 2012), *A. scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Mantovani *et al.*, 2005; Vicari *et al.*, 2008a; Castro *et al.*, 2015) e em *A. xavante* (Tenório *et al.*, 2013).

Os dados para o gênero mostram que o número e a localização dos cístrons de 18S rDNA são bastante variáveis e múltiplos na maioria das populações/espécies (Ferro *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2005; Vicari *et al.*, 2008a; Ferreira-Neto *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2015 entre outros), o que também foi verificado pelo presente estudo. Tamanha variação pode ser originada por rearranjos cromossômicos do tipo transposição/translocação ocorrido durante o processo de diferenciação deste grupo (Fernandes & Martins-Santos, 2006; Souza *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008b). *Astyanax* cf. *paris* e *Astyanax* sp. apresentaram elevado número de cístrons de 18S rDNA (9 e 10 cístrons, respectivamente), resultados semelhantes aos encontrados nos complexos *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, onde foram relatados até 15 cromossomos portadores destes genes (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Rocon-Stange

& Almeida-Toledo, 1993; Pazza *et al.*, 2008), característica que pode indicar semelhança entre *A. cf. paris* e *Astyanax* sp. e as espécies pertencentes a estes complexos. Utilizando marcadores moleculares, Rossini (2015) verificou a ocorrência de diferentes linhagens dentro de *Astyanax*, sendo que os complexos *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* então mais próximos entre si quando comparado com outros grupos como o complexo *A. bimaculatus* e espécies da América Central.

Com relação aos cístrons de 5S rDNA, todas as espécies analisadas apresentaram cístrons múltiplos (Fig. 2 e 4) localizados em posição centromérica de um par de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos acrocêntricos grande. Somente *Astyanax cf. aramburui*, *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) e *A. cf. paris* apresentaram marcações adicionais localizadas em um par de cromossomos metacêntricos, um par de cromossomos acrocêntricos, e um cromossomo submetacêntrico, respectivamente. Estudos para o gênero revelam que os cístrons de 5S rDNA tendem a ser conservados na região centromérica/pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos e em um par de cromossomos acrocêntricos (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2005; Vicari *et al.*, 2008a, entre outros). No entanto, há evidências de mais pares de cromossomos que carregam estes genes, como verificado em populações de *A. scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2015) e em *A. cf. aramburui*, *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) e *A. cf. paris* pelo presente estudo. Os genes ribossomais 5S rDNA representaram um importante caracter para a diferenciação das espécies crípticas *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), tendo sido utilizados com sucesso na diagnose de outras espécies de *Astyanax*, como em *A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. correntinus* e *Astyanax* sp. (Paiz *et al.*, 2015), e em quatro espécies do complexo *A. bimaculatus* (Gavazzoni *et al.*, 2016 *in press*), bem como em outros grupos de peixes, como em espécies de *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001) e *Characidium* (Pucci *et al.*, 2014), entre outros. De acordo com Almeida-Toledo *et al.* (2002), cístrons de 5S rDNA, apesar de serem considerados conservados quando comparados com 18S rDNA, podem representar importantes marcadores para diagnose das espécies e contribuir com os estudos filogenéticos e evolutivos no grupo.

O padrão de distribuição da heterocromatina se mostrou distinto entre as espécies, com predominância de heterocromatina centromérica em *Astyanax cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), blocos conspícuos de heterocromatina em cromossomos subteloicêntricos/acrocêntricos em *Astyanax aff. fasciatus* (rio Piquiri), *A. cf. paris* e *Astyanax* sp., e pouca heterocromatina em *A. aff. laticeps* e *A.*

*eigenmanniorum*, além de associada às RONS (Fig. 1 e 3), representando um importante marcador para a diferenciação destas espécies. *Astyanax* cf. *aramburuii* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) apresentaram semelhanças citogenéticas em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, número diplóide e cístrons de 18S rDNA, o que demonstra maior proximidade entre estas espécies quando comparado com as outras espécies aqui analisadas; porém, os cístrons de 5S rDNA se mostraram distintos, representando um importante marcador para a diferenciação destas espécies crípticas.

As duas populações de *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí – bacia do Alto-Médio rio Uruguai, e rio Piquiri – bacia do Alto rio Paraná) diferem entre si em relação ao padrão de heterocromatina, com predominância de heterocromatina centromérica para a população do rio Ijuí, e blocos conspícuos na maioria dos cromossomos subteloentéricos e acrocêntricos para a população do rio Piquiri. Dados como o padrão de heterocromatina, fórmula cariotípica e número e localização das RONS permitem a diferenciação destas populações e podem indicar distintas unidades taxonômicas no complexo *A. fasciatus*. *Astyanax fasciatus* representa um complexo de espécies que compartilham características morfológicas como corpo alongado, nadadeiras avermelhadas, escamas com reflexo dourado, ocelo humeral difuso e faixa lateral nítida (Melo 2001, 2005), além de apresentarem ampla variabilidade citogenética (Artoni *et al.*, 2006; Pazza *et al.*, 2006, 2008; Medrado *et al.*, 2012; Ferreira-Neto *et al.*, 2012). De acordo com Melo (2001), *A. fasciatus* do rio São Francisco possui a porção livre do maxilar mais inclinada em direção ao dorso do que as populações do Alto rio Paraná e outras espécies do complexo, sendo que somente as populações do rio São Francisco seriam *A. fasciatus*, enquanto que as outras espécies do leste do Brasil, América Central e rio Paraná seriam espécies muito parecidas nomeadas *Astyanax aff. fasciatus* (Melo & Buckup, 2006; Pazza *et al.*, 2008).

Os dados citogenéticos obtidos para *Astyanax* cf. *paris* são os primeiros resultados relatados para esta espécie, e evidenciam certa similaridade com outras espécies congêneres, principalmente dos complexos *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, em relação a características como número diplóide, primeiro par de cromossomos metacêntricos grande, cístrons múltiplos de 18S rDNA e padrão de distribuição da heterocromatina, reforçando a proximidade da espécie com outras espécies do “clado *Astyanax*” *sensu* Mirande (2009, 2010). *Astyanax paris* foi descrita a partir do arroio \*Yabotí-Grazú, bacia do Alto rio Uruguai (Azpelicueta *et al.*, 2002) e de acordo com

Mirande (2010) a espécie compõe um novo ramo em Characidae denominado “clado *Astyanax paris*” diferindo morfológicamente das outras espécies de *Astyanax*.

Com relação a *A. eigenmanniorum*, a espécie apresentou diferenças no número diplóide, padrão de distribuição da heterocromatina e cístrons de 18S rDNA quando comparado com outra população da Laguna dos Patos (Mendes *et al.*, 2011). Dados de 5S rDNA para a espécie se restringem a exemplares provenientes de aquarofilia (Piscor *et al.*, 2015) e não foram utilizados para comparação. *Astyanax eigenmanniorum* apresentava ampla distribuição pelos sistemas hidrográficos brasileiros, porém após revisão taxonômica a espécie se restringiu as bacias do Baixo Paraná, Uruguai e Laguna dos Patos, e as populações do Alto rio Paraná passaram a ser identificada como *A. bockmanni* (Vari & Castro, 2007; Eschmeyer & Fong, 2016); assim, a maioria dos dados citogenéticos referentes à *A. eigenmanniorum* são na verdade de *A. bockmanni* (Fauaz *et al.*, 1994; Torres-Mariano & Morelli, 2008).

*Astyanax aff. laticeps* diferiu em relação ao número de cístrons de 18S rDNA e ao padrão de distribuição da heterocromatina com outra população do sistema da Laguna dos Patos (Rosa *et al.*, 2009). Também apresentou características citogenéticas semelhantes às encontradas no complexo *A. scabripinnis*, reforçando as semelhanças morfológicas com este grupo, o que pode representar maior proximidade filogenética quando comparado com as demais espécies analisadas. De acordo com Bertaco & Lucena (2010), *A. laticeps* pertence ao complexo *A. scabripinnis* devido às semelhanças morfológicas, porém se destingue das demais espécies do grupo, com exceção de *A. troya*, pela presença de uma mancha umeral negra horizontalmente alongada com uma extensão descendente anteroventral estreita, passado a linha lateral. Estes são os primeiros resultados de 5S rDNA para *A. aff. laticeps* e evidenciam a manutenção de dois pares cromossômicos portadores destes genes em *Astyanax*.

Desta forma, os caracteres citogenéticos permitem a diferenciação das espécies analisadas, bem como comprovam a similaridade entre *A. cf. paris* e outras espécies de *Astyanax*, além de reforçar a ocorrência de uma espécie de *Astyanax* ainda não descrita taxonomicamente, verificada através da análise morfológica e corroborada pelas análises citogenéticas. *Astyanax* sp. difere das outras espécies congêneres com relação a características como número de escamas na linha lateral, série de dentes, e padrão de coloração (Carlos A. M. Oliveira, comunicação pessoal). As semelhanças citogenéticas entre *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) reforçam a proximidade destas espécies no “clado *Astyanax*”, porém os cístrons de 5S rDNA se mostraram distintos e

representam uma importante ferramenta na diferenciação destas espécies. As diferenças citogenéticas entre as populações de *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí e rio Piquiri reforçam a necessidade de estudos mais amplos e revisões taxonômicas detalhadas no grupo, buscando a resolução de conflitos taxonômicos no complexo *A. fasciatus*. Por fim, os resultados reforçam a complexidade encontrada no gênero, sendo necessários estudos citogenéticos, moleculares e revisões taxonômicas detalhadas que incluam marcadores como padrão de distribuição da heterocromatina e mapeamento dos cístrons de 5S e 18S rDNA para auxiliar na identificação e classificação das espécies no grupo.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio) pela autorização da captura dos peixes (número de licença: SISBIO 10522-1). Os autores são gratos à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) pelo apoio logístico. Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FPTI (Fundação Parque Tecnológico Itaipu).

### **Literatura Citada**

- Albert, J. S., H. L. Bart-Jr., & R. E. Reis. 2011. Species richness and cladal diversity. Pp. 89-104. In: Albert, J. S. & R. E. Reis. Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes. Berkeley, University of California Press.
- Almeida-Toledo, L. F., C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, C. Bonillo, F. Porto-Foresti & M. F. Z. Daniel-Silva. 2002. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenetic and Genome Research, 97: 229-233.
- Artoni, R. F., A. O. Shibatta, M. C. Gross, C. H. Schneider, M. C. Almeida, M. R. Vicari & L. A. C. Bertollo. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). Neotropical Ichthyology, 4: 197-202.

- Azpelicueta, M. de Las M., A. E. Almirón & J. Casciotta. 2002. *Astyanax paris*: A new species from the río Uruguay basin of Argentina (Characiformes, Characidae). *Copeia*, 4: 1052-1056.
- Barbosa, P., L. A. Oliveira, M. B. Pucci, M. H. Santos, O. Moreira-Filho, M. R. Vicari, V. Nogaroto, M. C. Almeida & R. F. Artoni. 2015. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica*. 143: 55-62.
- Bellafronte, E., V. P. Margarido & O. Moreira-Filho. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 710-716.
- Bertaco, V. A. & C. A. S. Lucena. 2010. Redescription of *Astyanax obscurus* (Hensel, 1870) and *A. laticeps* (Cope, 1894) (Teleostei: Characidae): two valid freshwater species originally described from rivers of Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8: 7-20.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1: 103-120.
- Britski, H. A., J. L. O. Birindelli & J.C. Garavello. 2012. A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 52: 441-475.
- Bueno, V., P. C. Venere, J. T. Konerat, C. H. Zawadzki, M. R. Vicari & V. P. Margarido. 2014. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-8.
- Castro, J. P., M. O. Moura, O. Moreira-Filho, O. A. Shibatta, M. H. Santos, V. Nogaroto, M. R. Vicari, M. C. Almeida & R. F. Artoni. 2015. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 25: 231-244.
- Daniel-Silva, M. F. Z. & L. F. Almeida-Toledo. 2001. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetraodonopterinae). *Caryologia*, 54: 209-215.
- Daniel-Silva, M. F. Z. & L. F. Almeida-Toledo. 2005. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenetic Genome Research*, 109: 497-501.
- Eschmeyer, W. N. & J. D. Fong. 2016. Species by family/subfamily. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Characidae/> (29/02/2016).

- Fauaz, G., V. E. Vicente & O. Moreira-Filho. 1994. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 17: 157-163.
- Fernandes, C. A. & I. C. Martins-Santos. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, 141: 328-332.
- Fernandes, C. A. & I. C. Martins-Santos. 2006. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 464-468.
- Ferreira-Neto, M., R. F. Artoni, M. R. Vicari, O. Moreira-Filho, J. P. M. Camacho, M. Bakkali, C. Oliveira & F. Foresti. 2012. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, 6: 29-40.
- Ferreira-Neto, M., M. R. Vicari, E. F. Camargo, R. F. Artoni & O. Moreira-Filho. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology*, 32: 792-796.
- Ferro, D. A. M., O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.
- Gavazzoni, M., L. M. Paiz, C. A. M. Oliveira, C. S. Pavanelli, W. J. Graça & V. P. Margarido. 2016. Morphological cryptic species of *Astyanax* Baird & Girard, 1854 diagnosed through cytogenetic characters. *Organisms Diversity and Evolution (in press)*.
- Girardi, S. C. 2014. Citogenética básica e molecular em espécies de Pimelodidae (Siluriformes) coletadas nas bacias do rio Paraná e do rio Uruguai: uma abordagem na taxonomia e sistemática. Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 129p.
- Griffiths, S. P. 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology*, 57: 1453-1464.
- Hatanaka, T. & P. M. Galetti-Jr. 2004. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239-244.
- Howell, W. M. & D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kavalco, K. F., K. O. Brandão, R. Pazza & L. F. Almeida-Toledo. 2009. *Astyanax hastatus* Meyers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? *Genetics and Molecular Biology*, 32: 477-483.

Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2004. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetics and Genome Research*, 106: 107-110.

Kavalco, K. F., R. Pazza, L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2007. Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 30: 320-335.

Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. P. Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Casatti, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera *Incertae sedis* in Characidae. Pp.106-169. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris-Jr. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs.

Lucena, C. A. S. 1993. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese PhD não publicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 158p.

Lui, R. L., D. R. Blanco, O. Moreira-Filho & V. P. Margarido. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*, 87: 433-438.

Machado, N. S., M. Ferreira-Neto, M. Bakkali, M. R. Vicari, R. F. Artoni, C. Oliveira & F. Foresti. 2012. Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia*, 65: 40-46.

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

Margarido, V. P. & O. Moreira-Filho. 2008. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 235-238.

Mariotto, S., L. Centofante, M. R. Vicari, R. F. Artoni & O. Moreira-Filho. 2011. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comparative Cytogenetics*, 5: 289-300.

Martins, C. & P. M. Galetti-Jr. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus elongatus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.

Martins, C. & P. M. Galetti-Jr. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research*, 8: 353-355.

- Medrado, A. S., M. S. Ribeiro, P. R. A. M. Affonso, P. L. S. Carneiro & M. A. Costa. 2012. Cytogenetic divergence in two sympatric fish species of the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 35: 797-801.
- Melo, F. A. G. 2001. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Orgãos. *Arquivo Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 59: 1-46.
- Melo, F. A. G. 2005. Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado não publicada. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 269p.
- Melo, F. A. G. & P. A. Buckup. 2006. *Astyanax heseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 4: 45-52.
- Mendes, M. M., R. Rosa, L. Giuliano-Caetano & A. L. Dias. 2011. Karyotype diversity of four species of the incertae sedis group (Characidae) from diferente hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA. *Genetics and Molecular Research*, 10: 3596-3608.
- Mirande, J. M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25: 574-613.
- Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8: 385-568.
- Mirande, J. M. & S. Koerber. 2015. On some species of *Astyanax* reported erroneously from Argentina. *Ichthyological Contributions of PecesCriollos*, 35: 1-8.
- Moraes-Neto, A., M. Silva, D. A. Matoso, M. R. Vicari, M. C. Almeida, M. J. Collares-Pereira & R. F. Artoni. 2011. Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 9: 97-105.
- Moreira-Filho, O. & L. A. C. Bertollo. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a “species complex”. *Brazilian Journal of Genetics*, 14: 331-357.
- Morelli, S., L. A. C. Bertollo, F. Foresti, O. Moreira-Filho & S. A. Toledo-Filho. 1983. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotype variability. *Caryologia*, 36: 235-244.
- Oliveira, C., G. S. Avelino, K. T. Abe, T. C. Mariguela, R. C. Benine, G. Ortí, R. P. Vari & R. M. Corrêa-e-Castro. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 275.
- Paiz, L. M., L. Baumgartner, W. J. Graça & V. P. Margarido. 2015. Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes,

Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. *Comparative Cytogenetics*, 9: 54-65.

Pazza, R., K. F. Kavalco, & L. A. C. Bertollo. 2006. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112: 313-319.

Pazza, R., S. A. F. Kavalco, P. R. Penteadó, K. F. Kavalco & L. F. Almeida-Toledo. 2008. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, 72: 2002-2010.

Peres, W. A. M., L. A. C. Bertollo & O. Moreira-Filho. 2008. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 222-226.

Pinkel, D., T. Straume & J. W. Gray. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.

Piscor, D., A. L. Alves & P. P. Parise-Maltempi. 2015. Chromosomal microstructure diversity in three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: comparative analysis of the chromosomal locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish*, 12: 81-90.

Pucci, M. B., P. Barbosa, V. Nogaroto, M. C. Almeida, R. F. Artoni, J. C. Pansanoto-Alves, F. Foresti, O. Moreira-Filho & M. R. Vicari. 2014. Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111: 541-553.

Rocon-Stange, E. A. & L. F. Almeida-Toledo. 1993. Supranumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 16: 601-615.

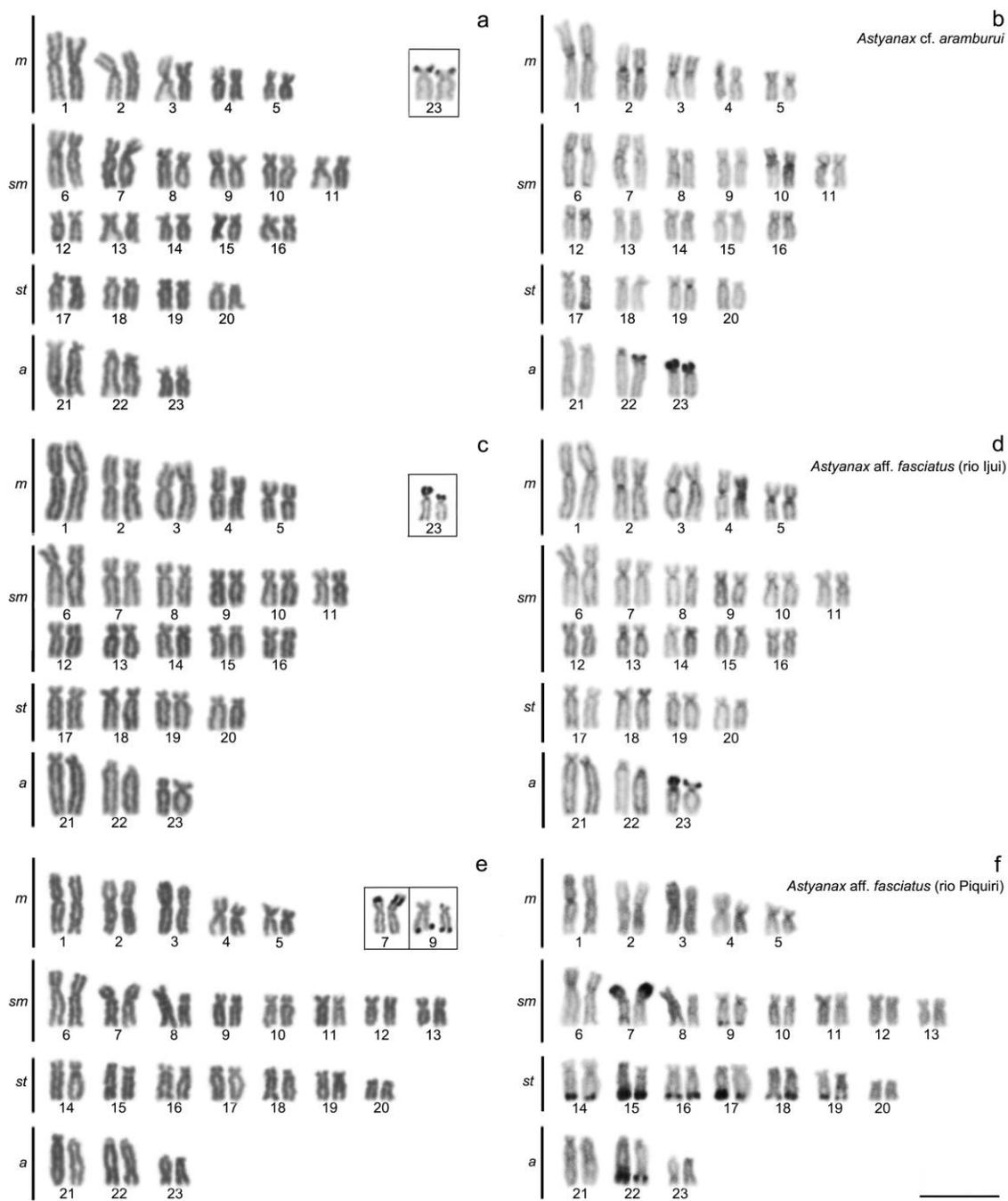
Rosa, R., M. Rubert, L. R. Malabarba, I. C. Martins-Santos & L. Giuliano-Caetano. 2009. Cytogenetics analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotropical Ichthyology*, 7: 601-605.

Rossini, B. C. 2015. Estudo da diversidade e das relações filogenéticas do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) baseado em sequencias de DNA. Tese de Doutorado (não publicada). Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu, 117p.

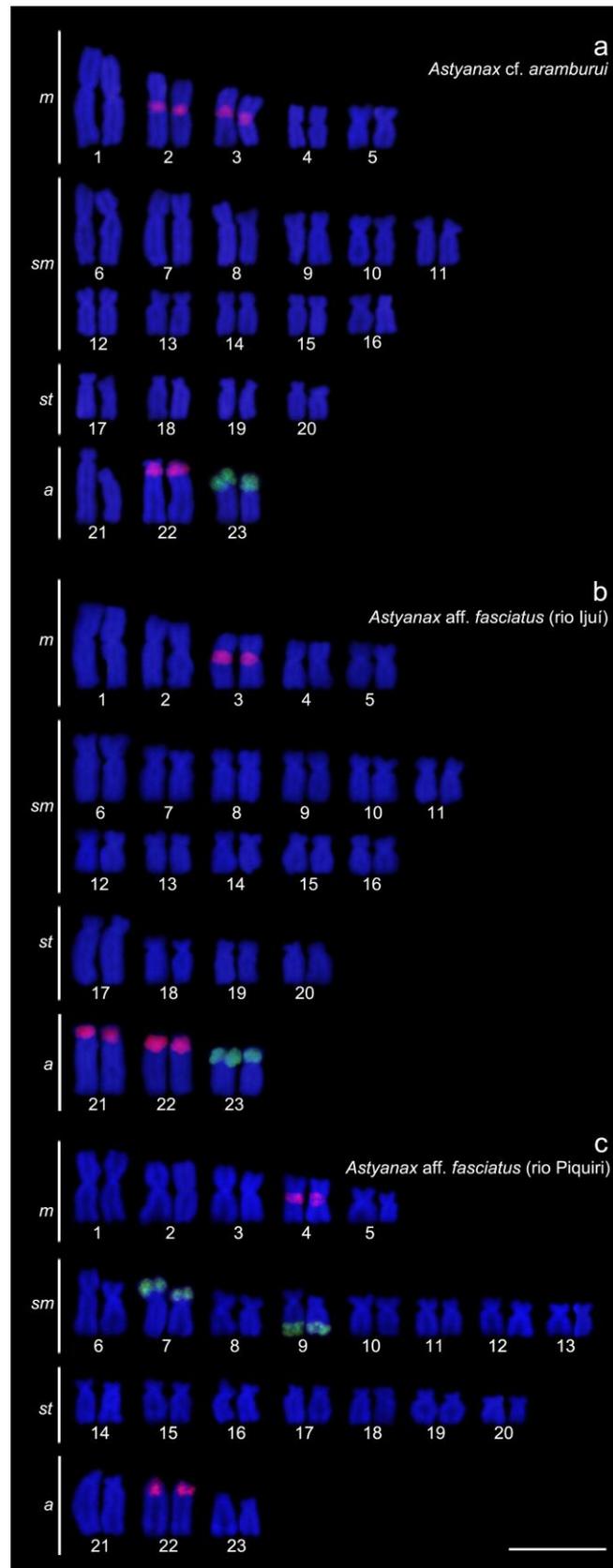
Salvador, L. B. & O. Moreira-Filho. 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) *Heredity*, 69: 50-56.

Silva, L. L. L., L. Giuliano-Caetano & A. L. Dias. 2012. Chromosome Studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, Using *in situ* Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA3 Staining. *Folia Biologica (Kraków)*, 60: 135-140.

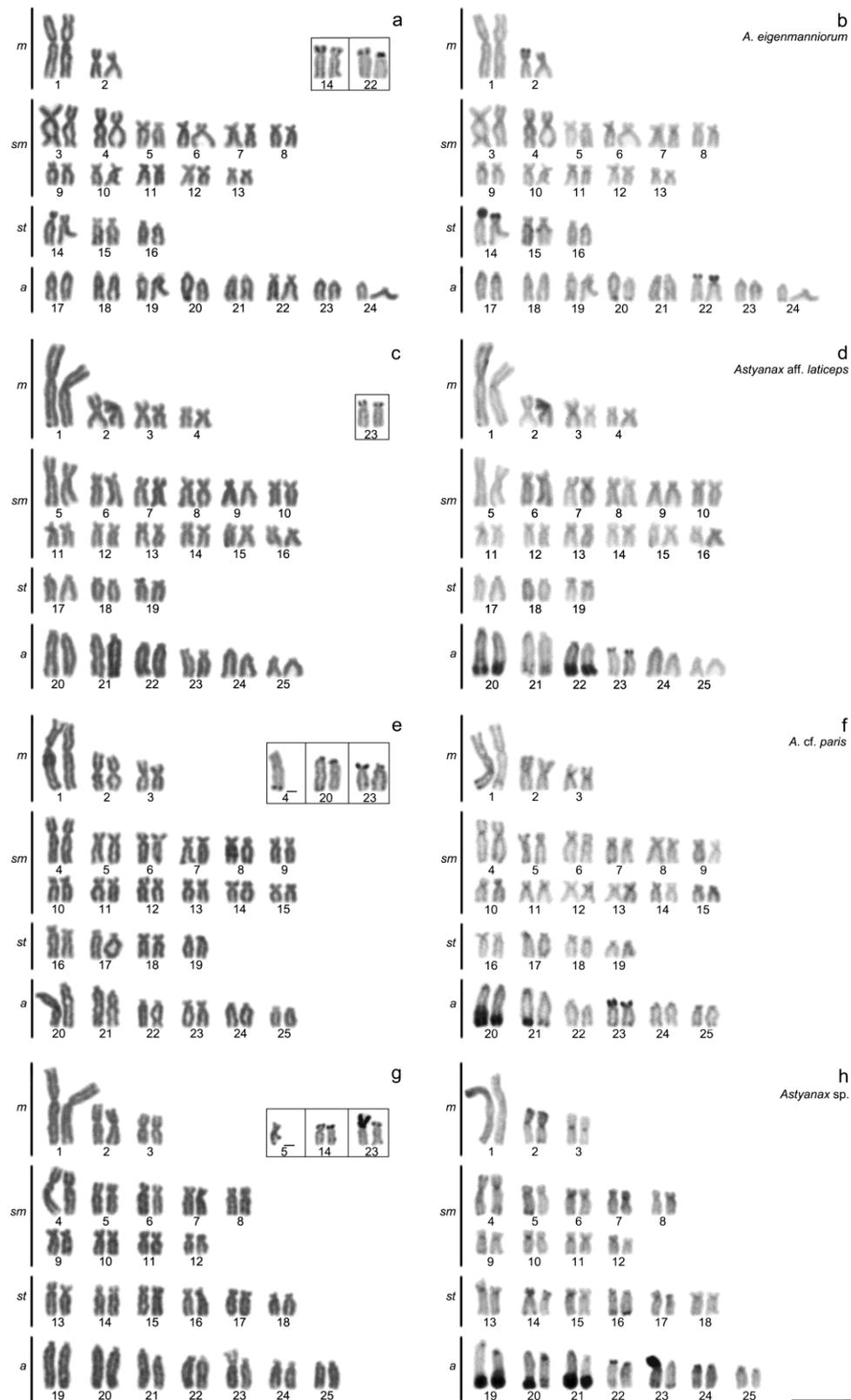
- Souza, I. L., P. C. Venere & O. Moreira-Filho. 2007. Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphism in the small Characidae fish *Astyanax scabripinnis*. *Cytologia*, 72: 63-69.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Tenório, R. C. C. O., C. A. Vitorino, I. L. Souza, C. Oliveira & P. C. Venere. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology*, 11: 553-564.
- Torres-Mariano, A. R. & Morelli, S. 2008. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 246-249.
- Vari, R. P. & R. M. C. Castro. 2007. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper rio Paraná system, Brazil. *Copeia*, 1: 150-162.
- Vicari, M. R., R. B. Noletto, R. F. Artoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertolo. 2008a. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 173-179.
- Vicari, M. R., R. F. Artoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2008b. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 67-72.
- Wasko, A. P., C. Martins, J. M. Wright & P. M. Galetti-Jr. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44: 893-902.



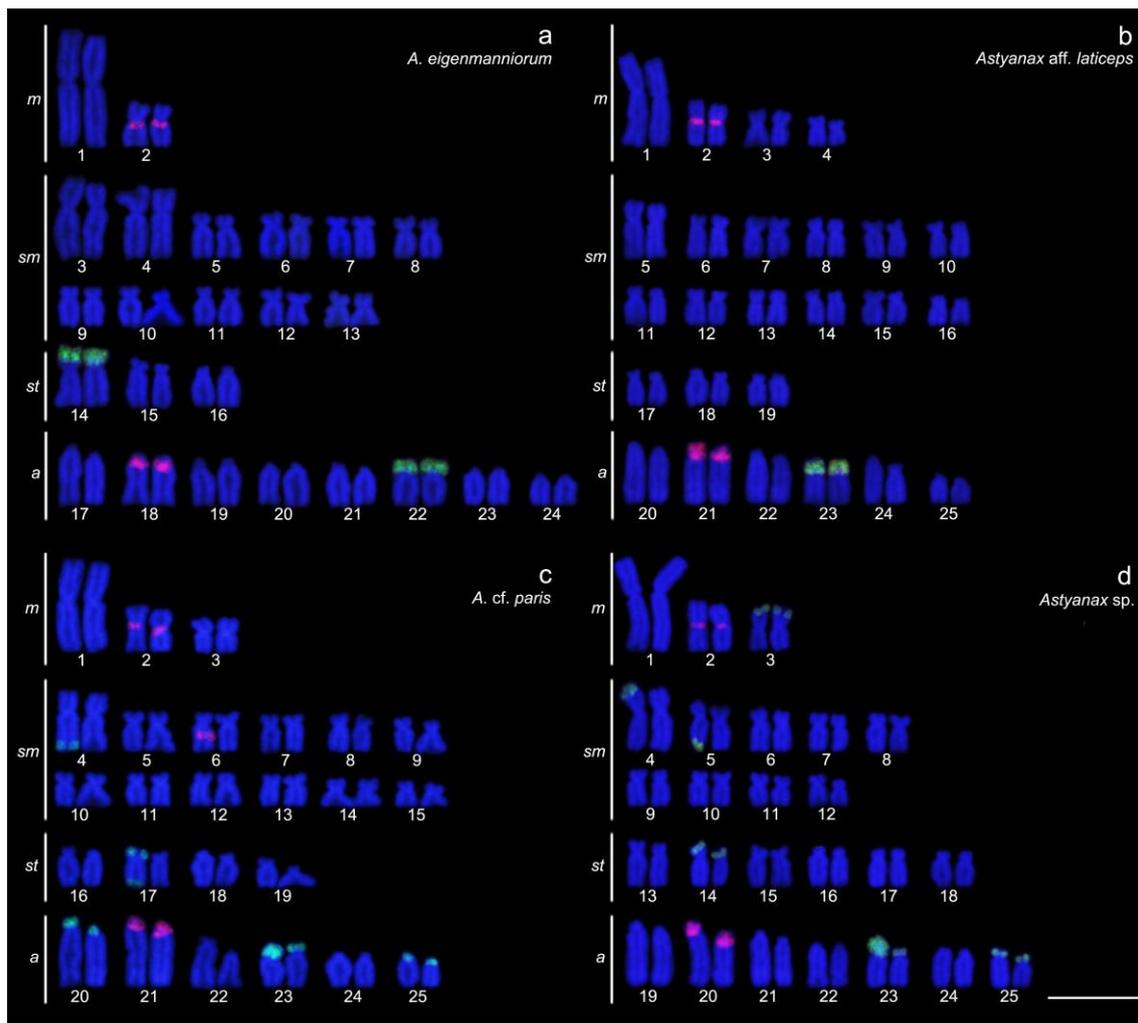
**Figura 1** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax* cf. *aramburui*, (c) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri, (e) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí, e C-bandados de (b) *Astyanax* cf. *aramburui*, (d) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri, (f) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10 µm.



**Figura 2** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax cf. aramburui*, (b) *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí, (c) *A. aff. fasciatus* do rio Piquiri. A barra representa 10 µm.



**Figura 3** Cariótipos corados por Giemsa de (a) *Astyanax eigenmanniorum*, (c) *A.aff. laticeps*, (e) *A. cf. paris*, (g) *Astyanax* sp., e C-bandados de (b) *Astyanax eigenmanniorum*, (d) *A. aff. laticeps*, (f) *A. cf. paris*, (h) *Astyanax* sp. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A barra representa 10 µm.



**Figura 4** Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e de 18S rDNA (verde) em (a) *Astyanax eigenmanniorum*, (b) *A. aff. laticeps*, (c) *A. cf. paris*, (d) *Astyanax* sp. A barra representa 10 µm.

**Tabela 1** Dados citogenéticos obtidos no presente estudo para as espécies de *Astyanax*.

Espécies	Fórmula Cariotípica	Heterocromatina	AgRONS/ 18S rDNA	5S rDNA
<i>A. cf. aramburui</i>	$10m + 22sm + 8st + 6a$	Centromérica e telomérica	tel p (23)	cent (2, 3 e 22)
<i>A. aff. fasciatus</i> (rio Ijuí)	$10m + 22sm + 8st + 6a$	Centromérica e telomérica	tel p (23)	cent ( 3, 21 e 22)
<i>A. aff. fasciatus</i> (rio Piquiri)	$10m + 16sm + 14st + 6a$	Centromérica e telomérica	tel p (7); tel q (9)	cent (4 e 22)
<i>A. eigenmanniorum</i>	$4m + 22sm + 6st + 16a$	Centromérica e telomérica	tel p (14 e 22)	cent (2 e 18)
<i>A. aff. laticeps</i>	$8m + 24sm + 6st + 12a$	Telomérica	tel p (23)	cent (2 e 21)
<i>A. cf. paris</i>	$6m + 24sm + 8st + 12a$	Centromérica e telomérica	tel p (20, 23 e 25); tel q (4); bit (17)	cent (2 e 21); inter q (6)
<i>Astyanax</i> sp.	$6m + 18sm + 12st + 14a$	Centromérica e telomérica	tel p (3, 4, 14, 23 e 25); tel q (5)	cent (2 e 20)

p: braço curto; q: braço longo; cent: centromérica; tel: telomérica; bit: bitelomérica; inter: intersticial

## 7. CONCLUSÕES

➤ O número diplóide foi de  $2n=50$  cromossomos para a maioria das espécies analisadas (*A. abramis*, *A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, *A. jacuhiensis*, *A. aff. laticeps*, *A. cf. paris* e *Astyanax* sp.), além de ter sido verificado o primeiro par cromossômico grande em relação ao restante do complemento, características plesiomórficas para *Astyanax* e também para Characidae.

➤ Nas outras espécies foi observado: redução no número diplóide, primeiro par cromossômico menor em tamanho, e grandes pares de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos, originados a partir de fusões cromossômicas, demonstrando ser uma condição derivada no gênero e observada em outras espécies como *A. correntinus* e *A. schubarti*. As populações de *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí e rio Piquiri) e *A. cf. aramburui* apresentaram  $2n=46$  cromossomos, e *A. eigenmanniorum*  $2n=48$  cromossomos.

➤ Foram reveladas RONS simples (impregnação por prata e 18S rDNA-FISH) para as espécies do complexo *A. bimaculatus* (*A. abramis*, *A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, *A. jacuhiensis*) localizadas sempre no primeiro par de cromossomos acrocêntricos, indicando um caráter plesiomórfico para o complexo. Também foram observados cístrons simples em *A. cf. aramburui*, *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí) e *A. aff. laticeps*.

➤ RONS múltiplas (impregnação por prata e 18S rDNA-FISH) foram observadas em *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus* (rio Piquiri), *A. cf. paris* e *Astyanax* sp., com variação interespecífica em relação ao número e localização dos cístrons, revelando uma característica derivada e reforçando a complexidade encontrada no gênero.

➤ 5S rDNA-FISH evidenciou cístrons simples em *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*, e cístrons múltiplos em *A. abramis*, *A. eigenmanniorum*, *A. aff. fasciatus* (rio Piquiri), *A. jacuhiensis*, *A. aff. laticeps* e *Astyanax* sp. (4 cístrons cada), *A. cf. paris* (5 cístrons), *A. cf. aramburui* (6 cístrons), e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), com variações quanto ao número e localização, se mostrando um importante marcador para a diferenciação das espécies.

➤ Apesar de variável, foi possível verificar a manutenção dos genes ribossomais 5S em pelo menos um par de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos

acrocêntricos, característica observada na maioria das espécies congêneres e que reforça a importância deste marcador nas análises de relação de parentesco em *Astyanax*.

➤ O padrão de distribuição da heterocromatina se mostrou distinto para todas as espécies, com exceção de *A. cf. aramburui* e *A. aff. fasciatus* (rio Ijuí), onde foi verificado semelhanças citogenéticas que podem indicar maior proximidade entre estas espécies quando comparado com as demais analisadas; porém, a distribuição dos genes ribossomais 5S rDNA se mostrou importante na diferenciação destas espécies crípticas.

➤ *Astyanax eigenmanniorum* apresentou diferenças no número diplóide, padrão de distribuição da heterocromatina e cístrons de 18S rDNA quando comparado com outra população da Laguna dos Patos, provavelmente devido a questões metodológicas, como por exemplo o padrão de condensação dos cromossomos e a variação no número de repetições dos *clusters* de 45S rDNA, que pode se tornar indetectável pela FISH.

➤ *Astyanax aff. laticeps* diferiu em relação ao número de cístrons de 18S rDNA e ao padrão de distribuição da heterocromatina com outra população do sistema da Laguna dos Patos. Também apresentou características citogenéticas semelhantes às encontradas no complexo *A. scabripinnis*, reforçando sua proximidade filogenética com este grupo. Estes são os primeiros resultados de 5S rDNA para *A. aff. laticeps* e evidenciam a manutenção de dois pares cromossômicos portadores destes genes em *Astyanax*.

➤ Os primeiros dados cromossômicos para *A. cf. paris*, evidenciam semelhanças citogenéticas com outras espécies de *Astyanax*, e reforçam a necessidade de revisões taxonômicas amplas, uma vez que *A. paris* ocupa um ramo distinto de *Astyanax* na filogenia de Characidae, denominado “clado *Astyanax paris*” sensu Mirande (2010), além de incluir marcadores como padrão de distribuição da heterocromatina e cístrons de 5S e 18S rDNA nas análises filogenéticas.

➤ Em *Astyanax sp.*, apesar do mesmo número diplóide, foi verificada distinta fórmula cariotípica, padrão de distribuição da heterocromatina, e cístrons de 18S rDNA, sugerindo a evidência de uma nova espécie.

➤ O número diplóide e o par cromossômico portador das RONS foram caracteres compartilhados pelas espécies do complexo *A. bimaculatus* (*A. abramis*, *A. altiparanae*, *A.*

*asuncionensis*, *A. jacuhiensis*), corroborando sua similaridade morfológica. No entanto, a localização dos cístrons de 5S rDNA e o padrão de distribuição da heterocromatina se mostraram distintos, e devem ser incluídos em análises filogenéticas envolvendo todas as espécies do complexo.

➤ A presença de dente no maxilar, embora menos frequente nas espécies das bacias do São Francisco, bacia do Prata e bacias costeiras do que no Amazonas e bacias do norte, não é um caráter diagnóstico entre as espécies do complexo *A. bimaculatus*, mas deve ser incluído nas futuras revisões e descrições de espécies no grupo.

➤ As populações de *A. aff. fasciatus* do rio Ijuí e do rio Piquiri apresentaram diferenças em relação a fórmula cariotípica, padrão de distribuição da heterocromatina e número e localização das RONS, o que pode representar unidades taxonômicas distintas e reforça a necessidade reforçando a necessidade de revisões amplas no complexo *A. fasciatus*, que incluam marcadores como mapeamento dos cístrons de 5S rDNA e padrão de distribuição da heterocromatina, para melhor compreensão das relações filogenéticas no grupo.

➤ Os resultados obtidos revelam a existência de marcadores, que permitem a caracterização e diferenciação das espécies de *Astyanax*, e que podem ser correlacionados com propostas filogenéticas, auxiliando na compreensão das relações filogenéticas no gênero. Além disso, evidenciam a necessidade de estudos citogenéticos/taxonômicos em grupos complexos como *A. fasciatus* e *A. bimaculatus*, visando a resolução de problemas dentro destes complexos de espécies.