

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

LEONARDO MARCEL PAIZ

CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE
“LAMBARIS” (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) COLETADOS À JUSANTE DO
RIO IGUAÇU, PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, BRASIL.

CASCADEL – PR

Março/2013

LEONARDO MARCEL PAIZ

CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE
“LAMBARIS” (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) COLETADOS À JUSANTE DO
RIO IGUAÇU, PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, BRASIL.

Dissertação apresentada 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 obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr Vladimir Pavan Margarido

Coorientador: Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça

CASCADEL – PR

Março/2013

Dedico este trabalho para
minha família, pois nunca
mediram esforços para que
minhas metas e meus
objetivos fossem alcançados.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, pela estrutura que possibilitou realização de todas as minhas atividades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, coordenação e equipe de professores, pela ajuda, auxílio e conselhos durante o meu aperfeiçoamento no mestrado.

A fundação Araucária e CNPq pelo financiamento de projetos, e a CAPES pela bolsa concedida.

Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido que através das orientações, conselhos e muita paciência, sempre buscou meu crescimento pessoal e profissional, além de oferecer excelentes condições para que todos os alunos no laboratório pudessem realizar trabalhos cada vez melhores, muito obrigado!

Ao professor Dr. Weferson Júnio da Graça que aceitou participar deste trabalho, auxiliando através da coorientação e identificação dos exemplares.

A professora Dr^a. Onildes Maria Taschetto, pela contribuição ao equipar o laboratório de fotomicroscopia, proporcionando melhor qualidade aos trabalhos.

Ao Grupo de Pesquisa em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos - GETECH/Unioeste, que através do projeto no Parque Nacional do Iguaçu estabeleceram uma parceria permitindo o desenvolvimento da pesquisa e dissertação.

Ao diretor do Parque Nacional do Iguaçu, Jorge Luiz Pegoraro, que permitiu o desenvolvimento da pesquisa e dissertação.

As colegas de laboratório Ana Paula, Gisele, Jocicléia, Simone e Vanessa, que sempre estiveram envolvidas nos trabalhos compartilhando seus conhecimentos ou experiências.

Ao meu amigo Lucas Baumgartner, que teve participação constante nesta pesquisa, contribuindo desde as coletas até as análises citogenéticas, formando uma parceria importante para a conclusão do trabalho.

Aos meus amigos do GETECH, Dhonatan, Fábio, Lucileine, Patricia e Thiago; e da UNIOESTE, Vladimir P. Margarido, Rafaela M. Moresco e Lucas Baumgartner, pelo esforço, suporte e auxílio nas inúmeras coletas realizadas no Parque Nacional do Iguçu.

Aos meus pais Zigomar e Celita, minha irmã Liziane e meu cunhado André, que sempre acreditaram no meu sucesso, e desde a minha graduação sempre buscaram me apoiar e dar condições para que eu seguisse em frente.

Aos antigos e novos amigos da faculdade, que estando perto ou longe sempre me apoiaram durante esta trajetória.

Obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO GERAL	1
1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS	2
2. INTRODUÇÃO	4
2.1. Bacias do Alto e Baixo rio Paraná	4
2.2. Importância de estudos citogenéticos em peixes	6
2.3. Considerações em Characiformes e Characidae	7
2.4. Considerações em <i>Astyanax</i> , <i>Moenkhausia</i> , <i>Roeboides</i> e <i>Tetragonopterus</i>	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Local e método de coleta	11
3.2. Preparação dos cromossomos mitóticos.	12
3.3. Preparo de lâminas.	12
3.4. Detecção de regiões organizadoras de nucléolos (RONs).	13
3.5. Determinação de heterocromatina.	13
3.6. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	13
3.7. Estudos cariotípicos.	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
5. CAPÍTULO 1	28
Citogenética básica e molecular em quatro espécies de <i>Astyanax</i> (Characidae: <i>Incertae Sedis</i>) coletadas à jusante das Cataratas do rio Iguaçu (Médio rio Paraná), Brasil: considerações à taxonomia e sistemática do gênero	28
Resumo	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	33

Discussão	36
Agradecimentos	40
Referências.....	40
Figura 1	49
Figura 2	50
6. CAPÍTULO 2	51
Mapeamento físico dos genes 5S rDNA e 18S rDNA em quatro espécies de lambaris coletados à jusante das Cataratas do rio Iguaçu (Baixo rio Paraná), Parque Nacional do Iguaçu, Brasil (Characiformes: Characidae)	51
Resumo	52
Introdução	53
Materiais e Métodos.....	55
Resultados.....	56
Discussão	57
Agradecimentos	60
Referências.....	60
Figura 1	68
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 Local de coleta.....11

Capítulo 1

Figura 1 Cariótipos corados com Giemsa de (a) *Astyanax abramis*, (c) *Astyanax asuncionensis*, (e) *Astyanax correntinus*, (g) *Astyanax* sp., e C-bandados de (b) *Astyanax abramis*, (d) *Astyanax asuncionensis*, (f) *Astyanax correntinus*, (h) *Astyanax* sp.....49

Figura 2 Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e 18S rDNA (verde) de (a) *Astyanax abramis*, (b) *Astyanax asuncionensis*, (c) *Astyanax correntinus* e (d) *Astyanax* sp.....50

Capítulo 2

Figura 1 Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e 18S rDNA (verde) de (a) *Astyanax abramis*, (b) *Moenkhausia dichroura*, (c) *Roeboides descalvadensis* e (d) *Tetragonopterus argenteus*.....68

RESUMO GERAL

Os peixes representam o grupo mais numeroso e ocupam a posição mais basal na filogenia dos vertebrados, comportam grande variedade morfológica e estão presentes em diversos habitats, tornando-se um grupo interessante para o estudo da variabilidade genética e evolução. Dentre estes, para espécies popularmente conhecidas como lambaris, crescentes números de estudos sistemáticos e filogenéticos são apresentados, principalmente decorrente da descoberta de sinonímias e descrição de novas espécies. No presente estudo foram analisadas citogeneticamente sete espécies de lambaris (*A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. correntinus*, *Astyanax* sp., *M. dichroua*, *R. descavadensis* e *T. argenteus*) coletadas à jusante das Cataratas do Iguazu (Bacia do Baixo rio Paraná), sendo este trecho correspondente a área de preservação ambiental do Parque Nacional do Iguazu. Verificou-se marcadores espécie-específicos, como macroestrutura cariotípica, padrão de distribuição da heterocromatina e localização dos genes 5S rDNA e 18S rDNA. Os resultados auxiliaram na diferenciação entre *A. abramis* e *A. asuncionensis*; os primeiros dados citogenéticos de *A. correntinus* sugeriram correlação com o grupo *A. schubarti* devido à alta similaridade cariotípica. A análise de *Astyanax* sp. confirmou tratar de uma espécie ainda não descrita taxonomicamente. As análises em *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus* evidenciaram os primeiros dados citogenéticos moleculares, revelando variabilidade quanto ao número e localização dos sítios de 5S rDNA e 18S rDNA, confirmando a diversidade destes genes entre os diferentes gêneros de Characidae, e possibilitando a utilização destes marcadores em análises comparativas com espécies congêneres.

Palavras chave: Macroestrutura cariotípica, Heterocromatina, AgRONS, 5S rDNA-FISH, 18S rDNA-FISH, Citossistemática.

1. APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Desde as primeiras revisões citogenéticas em 1978, com análises de números diplóides, vários estudos cromossômicos têm fornecido resultados auxiliando na identificação e diferenciação de espécies de peixes; apesar disto, atualmente ainda são encontradas lacunas referentes às caracterizações básicas para diversos grupos, dificultando a compreensão das relações filogenéticas entre as espécies. Dentre estes grupos encontra-se Characidae com aproximadamente 950 espécies válidas e 400 espécies ainda não descritas, sendo caracterizada por ampla distribuição nos sistemas hidrográficos neotropicais que, em consequência desta diversidade, questões são geradas quanto à classificação sistemática e taxonômica, além de dúvidas quanto o real número de gêneros e espécies fazendo que Characidae seja considerado um grupo complexo.

Entre os gêneros de Characidae, foram analisados no presente estudo *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus*, que estão associados às constantes revisões filogenéticas nas subfamílias em que estão alocados. Recentemente, foi formado um “clado *Astyanax*” que agrupa 14 espécies do gênero, dentre estas *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *A. correntinus*, mais *Hyphessobrycon anisitsi* e *Psellogrammus kennedyi*, através de características morfológicas como osso supraorbital. Do mesmo modo, estudos filogenéticos reorganizaram *M. dichroura* e *T. argenteus* em Tetragonopterinae, alterando a classificação anteriormente proposta na subfamília, em que somente eram alocadas espécies de *Tetragonopterus*.

Dados citogenéticos em *Astyanax* apresentaram número diplóide de 36 cromossomos em *A. schubarti* a 50 cromossomos em *A. scabripinnis*, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis*. Para os demais gêneros foram verificados o número diplóide de 50 cromossomos em *Moenkhausia dichroura*, e 52 cromossomos em *Roeboides* (*R. paranensis*, *R. xenodon* e *R. bonariensis*) e *Tetragonopterus chalceus*. Em comparação aos dados na literatura, variações no número e posição das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), bem como diferentes padrões de distribuição heterocromática são verificados para os quatro gêneros.

Devido ao local de coleta estar associado à área de preservação ambiental referente ao Parque Nacional do Iguaçu, nenhum estudo citogenético foi realizado à jusante das Cataratas do rio Iguaçu, possibilitando no presente trabalho análises de espécies ainda não estudadas citogeneticamente. Este trecho, com aproximadamente 25 km até a foz com o rio Paraná, abriga a ictiofauna da Bacia do Baixo rio Paraná-Paraguai, onde tem sido realizadas descrições com base em levantamentos e composição da estrutura ictiofaunística. Desta forma o presente estudo teve como objetivo analisar, através das técnicas citogenéticas básicas e moleculares, as espécies *A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. correntinus*, *Astyanax* sp., *M. dichroua*, *R. descalvadensis* e *T. argenteus*, mostrando sua importância como ferramenta na contribuição de estudos citotaxonômicos e filogenéticos. Ainda, são apresentados os primeiros dados citogenéticos moleculares para todas as espécies, proporcionando resultados que poderão ser utilizados em futuras comparações citogenéticas, uma vez que estudos referentes ao mapeamento dos genes ribossômicos 5S rDNA e 18S rDNA estão restritos a poucos grupos de Characidae.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Bacias do Alto e Baixo rio Paraná

A ictiofauna de peixes neotropicais é a mais diversa do mundo com mais de 4.000 espécies descritas (Reis *et al.*, 2003), sendo que este número atualmente é subestimado, podendo chegar a aproximadamente 8.000 espécies (Nelson, 2006). Representado por sistemas hidrográficos de grandes proporções, o Brasil destaca-se pela riqueza e diversidade da sua fauna de peixes em rios e riachos, registrando em ambientes de água doce mais de 2.500 espécies válidas (Buckup *et al.*, 2007). A razão desta grande diversidade ocorre devido a um conjunto de fatores históricos, ecológicos e evolutivos que estão sofrendo alterações a milhões de anos desde a separação da Gondwana e ainda estão em constante modificação (Ribeiro *et al.*, 2006). Deste modo, conhecer a ictiofauna dessas regiões torna-se essencial para o desenvolvimento de ações que possam contribuir para modelos de preservação e manejo nesses sistemas aquáticos neotropicais (Vari & Malabarba, 1998).

Assim, toda heterogeneidade que ocorre na região Neotropical pode ser considerada interessante objeto de estudo para melhor compreensão e conhecimento da ictiofauna que compõem os ambientes dulcícolas. Desta forma, em busca da preservação ambiental, ações como a conservação de determinados trechos de uma bacia hidrográfica, entendimento do ciclo de espécies chaves e manutenção da integridade hidrológica, podem ajudar a minimizar a influência das atividades antropogênicas (Dias *et al.*, 2005).

Os sistemas hidrográficos do rio Paraná drenam áreas com grandes centros urbanos, industriais e agrícolas, e está constituída na região mais intensivamente explorada do país, principalmente pelo fato de ser responsável por mais que 70% da produção hidrelétrica (Eletrobrás, 1991). Na América do Sul, o rio Paraná possui um dos sistemas hidrográficos mais represados, transformando seus principais afluentes em lagos artificiais (Agostinho & Júlio Jr., 1999), ocasionando o empobrecimento da fauna, particularmente em relação às espécies de peixes. Além desta situação, espécies ainda não descritas constituem um grupo

vulnerável à degradação de seu habitat, necessitando de estudos que forneçam respostas básicas a questões de preservação e manejo. Para este processo, torna-se necessário fornecer subsídios técnico-científicos, como conhecer as características físicas, químicas e biológicas das hidrografias, a fim de aperfeiçoar o uso dos recursos naturais (Esteves, 1999).

O rio Paraná é o principal rio do sistema hidrográfico do Prata, apresenta a segunda maior extensão da América do Sul, percorre dentro do território brasileiro 3.100 km desde sua nascente na confluência dos rios Grande e Paranaíba até seu desague no rio da Prata, totalizando área com drenagem de aproximadamente 891.000 km². A Bacia do rio Paraná divide-se em duas sub-bacias: Bacia do Alto rio Paraná e Bacia do Médio/Baixo rio Paraná, que são compostas por tributários de porte significativo como os rios Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema, Piquiri, Iguaçu, entre outros (Agostinho *et al.*, 2004).

O trecho pertencente à Bacia do Alto rio Paraná limita-se na barragem da Usina hidroelétrica de Itaipu, construída em 1982, cuja formação substituiu barreiras físicas naturais como os saltos de Sete Quedas, fazendo com que a delimitação existente entre a ictiofauna montante e jusante aos saltos fossem deslocados em 150 quilômetros abaixo, permitindo a dispersão de espécies do Médio rio Paraná para trechos a montante (Graça & Pavanelli, 2007). Deste modo ocorreu um acréscimo significativo no número de espécies que compõe essa região montante a barragem de Itaipu, com aproximadamente 310 espécies, de 11 ordens e 38 famílias, tendo Siluriformes e Characiformes representando os grupos dominantes (Langeani *et al.*, 2007). Com relação à ictiofauna, a planície de inundação do Alto rio Paraná revela-se um importante local de estudo, revelando uma comunidade amplamente diversificada composta por 9 ordens, 35 famílias, 114 gêneros e 182 espécies (Graça & Pavanelli, 2007).

A bacia do Baixo rio Paraná compreende sua área a partir da Usina Hidroelétrica de Itaipu, até a conexão com o rio Paraguai. Nesse trecho recebe águas do rio Iguaçu, que também por possuir uma barreira física (Cataratas do Iguaçu), dividi as comunidades ictiofaunísticas da Bacia do rio Iguaçu (montante as quedas) e Bacia do Baixo rio Paraná (jusante as quedas). Trabalhos desenvolvido no trecho jusante às Cataratas do Iguaçu até sua foz no rio Paraná (curso com aproximadamente 30 Km) são escassos devido representar uma área de preservação ambiental fiscalizada por órgãos federais, o que torna difícil o seu

acesso, estando restritos principalmente a descrições de espécies e aspectos reprodutivos/migradores (Makrakis *et al.*, 2007a, b; Santos *et al.*, 2013), sendo que este trecho pode ser representado pela ictiofauna das bacias dos rios Paraná e Paraguai.

2.2. Importância de estudos citogenéticos em peixes

Os peixes constituem o grupo mais numeroso e diversificado com aproximadamente 30.000 espécies reconhecidas entre um total aproximado de 55.000 dos vertebrados. Em uma posição basal na filogenia, apresentam grande variedade morfológica e estão presentes em diversos habitats, representando um grupo interessante para o estudo da variabilidade genética e evolução. Devido ao crescente interesse de estudo com sistemática e filogenia, muitos grupos estão expandindo em números de espécies através de recentes descrições, enquanto alguns diminuem de acordo com a descoberta de sinonímia entre as espécies (Nelson, 2006).

Uma recente contagem aponta especificamente que mais de 2.600 espécies/subespécies já tenham sido cariotipadas, sendo este valor referente apenas quando somadas as ordens Characiformes, Cypriniformes, Cyprinodontiformes, Siluriformes e Perciformes (para revisão Arai, 2011). Contudo, este é um número considerado baixo quando comparado à quantidade de peixes existente, evidenciando a importância do desenvolvimento de estudos citogenéticos relacionados aos grupos. Mesmo que as espécies já caracterizadas representem somente uma pequena parte da totalidade da ictiofauna neotropical, a citogenética de peixes vem acumulando dados que auxiliam em um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, que se tornam mais conclusivos em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia (Artoni *et al.*, 2000).

Segundo Guerra (1988), análises citotaxonômicas contribuem para o estudo da evolução pelo fato do material genético estar contido nos cromossomos; sendo assim, as alterações genéticas são em sua maioria significativas para poder-se inferir processos evolutivos das espécies. Os dados citogenéticos mais utilizados na citotaxonomia são o número e morfologia dos cromossomos, além do padrão de bandas, e quantidade, posição e

a variação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), tendo como objetivos analisar a estrutura e o comportamento cromossômico, que garantem a conservação, transmissão e ordenação da informação genética para o desenvolvimento dos organismos, além de estudar os seus mecanismos de controle, variação e suas implicações genéticas e evolutivas (Lacadena, 1996).

Os peixes pertencentes às regiões Neotropicais apresentam uma diversidade cromossômica alta, com variações em número diplóide, cromossomos sexuais, e cromossomos supranumerários, e muitos casos de variações estruturais chamados polimorfismos (Galetti Jr., 1998). Com isso, a citogenética de peixes torna-se uma importante ferramenta para a caracterização das espécies em estudos citotaxonômicos e verificação da biodiversidade (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Vissotto *et al.*, 1999; Vicari *et al.*, 2008).

2.3. Considerações em Characiformes e Characidae

De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 espécies ocorrem na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas, e cerca de 1.550 conhecidas porém ainda não descritas formalmente. Entre as principais ordens de peixes, Characiformes é considerada uma das mais diversificadas ictiofaunas do mundo, encontrados em ambientes lênticos e lóticos da África e das Américas do Norte, Central e do Sul (Nelson, 2006). Composta por 23 famílias que agrupam mais de 1.700 espécies (Oliveira *et al.*, 2011), compreende elevada representatividade na região Neotropical, e principalmente nos sistemas hidrográficos brasileiros com mais de 1000 espécies (Buckup *et al.*, 2007). São exclusivamente peixes de água doce, e seu confinamento nesses habitats tem originado um interessante grupo modelo para diversos estudos biogeográficos (Ortí & Meyer, 1997).

Recentemente, Oliveira *et al.* (2011) propuseram um estudo reorganizando as relações filogenéticas em Characiformes, e entre as principais famílias desta ordem, Characidae agrupa espécies com portes variados encontrados em quase todos os ambientes dulcícolas, presentes desde riachos até os principais sistemas hidrográficos brasileiros

(Buckup *et al.*, 2007). Seus representantes geralmente apresentam nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas conhecidos popularmente como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, entre outros. Apesar do pequeno porte, essas espécies apresentam grandes importâncias ambientais, estabelecendo um elo na cadeia alimentar (Gurgel, 2004), além de relevância econômica quando considerado seu volume de captura e pesca esportiva (Barbieri *et al.*, 1982). A diversidade encontrada na família revela espécies com portes variados, correspondente a 2 cm, como os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (Britski, 1972).

A família também é conhecida por englobar grupos complexos que revelam lacunas quanto às relações morfológicas e sistemáticas. Segundo Malabarba & Weitzman (2003) e Calcagnotto *et al.* (2005), existem evidências de monofiletismo em muitas subfamílias de Characidae; entretanto, grande parte dos gêneros e espécies ainda não possui nenhuma hipótese dessa relação. Em consequência da sua natureza heterogênea, as espécies que ainda não se enquadram nestas condições são listadas em *Incertae Sedis* por não apresentarem relações filogenéticas bem definidas (Lima *et al.*, 2003).

2.4. Considerações em *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus*

Considerado um dos gêneros mais especiosos em Characidae, *Astyanax* aloca aproximadamente 140 espécies distribuídas na América Central e do Sul (Froese & Pauly, 2013), principalmente nas bacias hidrográficas brasileiras com mais de 50 registros (Buckup *et al.*, 2007). Levantamentos ictiofaunísticos são bem conhecidos na Bacia do Alto rio Paraná (Graça & Pavanelli, 2007), Bacia do rio Iguaçu (Ingenito *et al.*, 2004; Bifi *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2012) e recentemente na Bacia do Paraná-Paraguai (Neris *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013).

Pertencendo atualmente em *Incertae Sedis*, *Astyanax* foi primeiramente classificado em Tetragonopterinae (Géry, 1977); porém, uma revisão na subfamília reorganizou a sistemática do gênero (Lima *et al.*, 2003). Com recentes contribuições filogenéticas, Mirande (2009) propôs uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertae Sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado “clado *Astyanax*”.

Amplamente reconhecidas quando analisadas as ictiofaunas de riachos das Bacias do Alto rio Paraná, *Astyanax paranae*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae* e *A. scabripinnis* (Langeani *et al.*, 2007), têm sido consideradas “complexos de espécies”, caracterizadas pela semelhança morfológica entre os espécimes, o que torna mais difícil sua identificação (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Pazza *et al.*, 2006).

Dados citogenéticos para o gênero apresentam número diplóide de 36 cromossomos em *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983) a 50 cromossomos em *A. scabripinnis*, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* (Souza & Moreira-Filho, 1995; Artoni *et al.*, 2006; Ferreira Neto *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2010), além de *A. fasciatus* conhecida pela ocorrência de números diplóides com 45 cromossomos (Pazza *et al.*, 2006) até 50 cromossomos (Artoni *et al.*, 2006). A diversidade no gênero também é observada na quantidade e localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), apresentando marcações simples em algumas espécies como *A. scabripinnis* (Rocon-Stangee & Almeida-Toledo, 1993), além de variações intraespecíficas como observado em *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004) e *A. fasciatus* (Peres *et al.*, 2009). Do mesmo modo, para *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2006; Medrado *et al.*, 2008) e *A. scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2004; Santos & Morelli, 2006) são observadas divergências nas estruturas cromossômicas interpopulacionais, principalmente associadas aos padrões de distribuição heterocromática, além de polimorfismos, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies e/ou populações (Artoni *et al.*, 2000). Esta variabilidade é também estendida aos dados citogenéticos moleculares de 5S rDNA e 18S rDNA, representados por cístrons simples, como em *A. altiparanae* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2011), ou múltiplos como observado em *A. scabripinnis* (Mantovani & Moreira-Filho, 2005; Domingues *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008; Ferreira-Neto *et al.*, 2012).

Outro gênero amplamente conhecido em Characidae é *Moenkhausia*, que recentemente alocado em Tetragonopterinae (Oliveira *et al.*, 2011), comporta 75 espécies válidas distribuídas nas bacias hidrográficas neotropicais (Froese & Pauly, 2013), e mesmo sem apresentar características morfológicas que indiquem o monofiletismo do gênero, agrupa espécies com padrões morfológicos originando uma sistemática complexa (Benine *et al.*, 2009; Bertaco *et al.*, 2011), que de acordo com Mirande (2010) não possui hipóteses de monofiletismo. Dados cromossômicos para o gênero estão restritos principalmente a

citogenética básica, revelando número diplóide com 50 cromossomos, presença de RONS simples (Portela-Castro *et al.*, 1988) ou múltiplas (Foresti *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 2012), distribuição de heterocromatina centromérica e pericentromérica, além da presença de cromossomos Bs (Foresti *et al.*, 1989, Portela-Castro *et al.*, 2001; Portela-Castro & Júlio Jr., 2002; Hashimoto *et al.*, 2012).

Gêneros como *Roeboides* apresentam uma condição sistemática mais estável em Characidae, alocando 21 espécies distribuídas nas grandes bacias do território brasileiro (Froese & Pauly, 2013), sendo principalmente conhecidas em trabalhos que envolvem estudos de inter-relações e taxonomia em subgrupos do gênero (Lucena, 2000; 2001; 2003; 2007). Assim como muitos gêneros em Characidae, resultados cromossômicos estão relacionados a análises citogenéticas básicas, como em *R. paranensis* (Martins-Santos & Tavares, 1996), *R. xenodon* (Venere *et al.*, 1997) e *R. bonariensis* (Pastori *et al.*, 2009), com número diplóide com 52 cromossomos, RONS simples e heterocromatina centromérica na maioria dos pares cromossômicos.

Anteriormente reconhecido como o único gênero válido em Tetragonopterinae (Lima *et al.*, 2003), *Tetragonopterus* é representado por 6 espécies (Froese & Pauly, 2013); entretanto, a filogenia proposta por Mirande (2009; 2010) aponta o gênero pertencendo a uma unidade monofilética em Tetragonopterinae que aloca gêneros como *Moenkhausia*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*. Dados cromossômicos para o gênero são restritos aos de Portela *et al.* (1988), que realizaram a primeira descrição básica no gênero, verificando número diplóide com 52 cromossomos e RONS simples em *T. chalceus*.

Em relação aos dados apresentados, as espécies pertencentes a *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus* não estão totalmente definidas nas subfamílias de Characidae, situação verificada devido ao número de revisões sistemáticas e filogenéticas nos grupos. Assim, o presente estudo buscou através de resultados citogenéticos básicos e moleculares, auxiliar nas discussões que envolvem estes gêneros, incorporando novos dados nas abordagens a fim de melhor relacionar estas espécies em Characidae.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e método de coleta

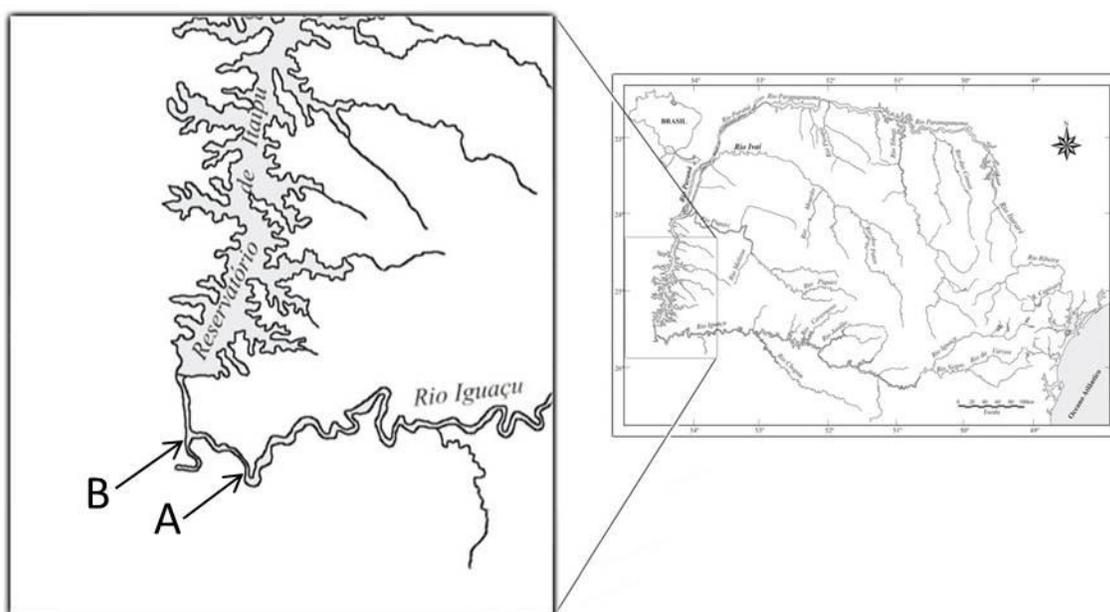


Figura 1: Locais de coleta em evidência. Seta A (jusante a Cataratas do Iguaçu); Seta B (foz do rio Iguaçu), trecho referente à Bacia do Baixo rio Paraná (aprox. 25 km).

Os exemplares foram coletados no rio Iguaçu ($25^{\circ}39'02''S$ / $54^{\circ}27'25''O$), jusante às Cataratas do Iguaçu, trecho correspondente a Bacia do Médio/Baixo rio Paraná. Foram utilizadas tarrafas e redes para a captura dos exemplares, que posteriormente foram transportados vivos e em condição de oxigenação adequada para o laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), onde foram mantidos em aquários aerados até a realização das técnicas citogenéticas para obtenção dos cromossomos metafásicos.

3.2. Preparação dos cromossomos mitóticos (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993).

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 1mL/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 ressuscitado 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 ressuscitado e centrifugado durante 10 minutos.

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

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

9. O material foi novamente ressuscitado 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 (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄ x 12H₂O), 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 H₂O + 0,5 mL de ácido fórmico).
2. Sobre cada gota de gelatina foram adicionadas 1 gota de H₂O e 2 gotas de AgNO₃.
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 1 minuto e 10 segundos a lâmina foi colocada em solução aquosa de Ba(OH)₂ x 8H₂O 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 solução de Iodeto de Propídeo (50 mg/ml), coberta com lamínula e analisada ao microscópio de fluorescência.

3.6. Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (Pinkel *et al.*, 1986; Margarido & Moreira-Filho, 2008)

Para as análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram utilizadas sondas de 5S rDNA e 18S rDNA obtidas a partir das espécies *Leporinus elongatus* 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 μg de DNA sonda, H_2O *mili-Q* autoclavada para completar os 16 μL de solução e 4 μL de *mix* de reação (Kit) (Roche®);
2. A solução foi homogeneizada com uma micropipeta e levada ao banho-maria (isopor) por 1 e ½ horas a 15°C;
3. Adicionar 1 μL EDTA 0,5 M, pH = 8,0, e aquecer a 65°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 μL 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°C.

Preparação das Lâminas:

1. As lâminas foram incubadas com 88 μL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) sob lamínula, a 37 °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°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 em temperatura ambiente; e posteriormente secas ao ar.

Hibridização:

1. Foram adicionados ao tubo 6 µL da sonda 18S rDNA e 6 µL sonda 5S rDNA; 6µL de 20xSSC; 30 µL de formamida e 12 µL de sulfato dextrano 50%, por lâmina;
2. A solução de hibridização foi colocada em banho-maria a 100°C por 10 minutos; e posteriormente retirada e colocada imediatamente no gelo;
3. Foi colocado 58 µL de solução de hibridização em lamínula para cada lâmina, e em seguida as lâminas foram arrumadas em câmara úmida e incubadas a 37 °C por 12 horas (*overnight*). A câmara úmida deve ser preparada com H₂O.

Deteção 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 em tampão 5% NFDm/4xSSC ambiente por 15 minutos 3. Lavadas 2 vezes, 5 min com Tween 0,05%/4xSSC, 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, a 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; secar ao ar.

Montagem das lâminas:

1. Foram misturados 200 µL de antifading mais 1 µL de 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, subtelocêntrico 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*).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A.A. & Júlio Jr., H.F. (1999). Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: Lowe-McConnel, R.H. Estudos de comunidades de peixes tropicais, 374-399.
- Agostinho, A.A., Bini, L.M., Gomes, L.C., Júlio Jr., H.F., Pavanelli, C.S. & Agostinho, C.S. (2004). Fish assemblages. In: Thomaz, S.M., Agostinho, A.A. & Hahn, N.S. The Upper Paraná River and its Floodplain: physical aspects, ecology and conservation, 223-246.
- Arai, R. (2011). Fish Karyotype. Check List, 340p.
- Artoni, R.F., Shibatta, A.O., Gross, M.C., Schneider, C.H., de 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.
- 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.
- Barbieri, G., Santos, M.V.R. & Santos, J.M. (1982). Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). Pesquisas Agropecuárias Brasileiras, 17:1057-1065.
- Baumgartner, G., Pavanelli, C.S., Baumgartner, D., Bifi, A.G., Debona, T. & Frana, V.A. (2012). Peixes do baixo rio Iguaçu, 203p.

- Benine, R.C., Mariguela, T.C., & Oliveira, C. (2009). New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 7:161-168.
- Bertaco, V.A., Jerep, F.C., & Carvalho, F.R. (2011). New species of *Moenkhausia Eigenmann* (Ostariophysi: Characidae) from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9:57-63.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetic*, 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. (1972). Peixes de água doce de São Paulo: sistemática. In: *Poluição e Psicultura*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, p. 79-108.
- Buckup, P.A., Menezes, N.A. & Guazzi, M.S. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 193p.
- 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.
- 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.

- Domingues, M.S., Vicari, M.R., Abilhoa, V., Wamser, J.P., Cestari, M.M., Bertollo, L.A.C., Almeida, M.C. & Artoni, R.F. (2007). Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti, Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Parana basin. *Neotropical Ichthyology*, 5:37–44.
- Eletrobrás. (1990). Plano Diretor de Meio Ambiente do Setor Elétrico 1991/1993. Rio de Janeiro, Centrais Elétricas Brasileiras, 284p.
- Esteves, F.A. (1999). Ecologia trófica de peixes em riachos. In: Caramaschi, E.P., Mazzoni, R. & Peres-Neto, P.R. *Ecologia de peixes de riacho, Série Ecologia Brasiliensis*, 260p.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2004). Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, 141:328-332.
- 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 Cytogenetic*, 6:29–40.
- Foresti, F., Almeida-Toledo, L.F. & Toledo, A.S. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79:107–114.
- Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49:810-813.

- Froese, R. & Pauly, D. (2013). FishBase. Internet References. (2013) <http://www.fishbase.org> Accessed February.
- Galetti Jr., P.M. (1998). Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies, Italian Journal of Zoology, 65:53-56.
- Géry, J. (1977). The characoids of the world. Neptune, T.F.H. Publications, 672p.
- 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.
- Guerra, M. (1988). Introdução a Citogenética Geral. Rio de Janeiro, Guanabara, 142p.
- Gurgel, H. de C.B. (2004). Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 21:131-135.
- Hashimoto, D.T., Voltolin, T.A., Paes, A.D.N.V.A., Foresti, F., Bortolozzi, J., Porto-Foresti, F. (2012). Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). Comparative Cytogenetics, 6:141–151.
- Hatanaka, T., Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica, 122:239-244.

- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Ingenito, L.F.S; Duboc, L.F. & Abilhoa, V. (2004). Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, 7:23-26.
- Lacadena, J.R. (1996). *Citogenética*. Editorial Complutense, Madri, Espanha. 928p.
- Langeani, F., Serra, J.P., Carvalho, F.R., Chaves, H.F., Ferreira, C.P. & Martins, F.O. (2007). Fish, *Hasemanina crenuchoides* Zarske & Géry, 1999 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae): rediscovery and distribution extension in the upper rio Paraná system, Minas Gerais, Brazil. *Check List*, 3:119-122.
- 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). Family Characidae. Pp. 104-169. In: Reis, R.E., Kullanders, S.O. & Ferraris, C.J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, 729p.
- Lucena, C.A.S. (2000). Revisão taxonômica e filogenia das espécies transandinas do gênero *Roeboidea* Günther (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS*, 13:3-63.

- Lucena, C.A.S. (2001). Uma nova espécie de *Roeboides* Günther da região superior da bacia Amazônica (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Biotemas*, Florianópolis, 14:61-70.
- Lucena, C.A.S. (2003). Revisão taxonômica e relações filogenéticas das espécies de *Roeboides* grupo-microlepis (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Iheringia*, Série Zoologia, Porto Alegre, 93:283-308.
- Lucena, C.A.S. (2007). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Roeboides* grupo-affins (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Iheringia*, 97:117-136.
- 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 and Histochemistry*, 87:433-438.
- Makrakis, M.C., Miranda, L.E., Makrakis, S., Fernandez, D.R., Garcia, J.O. & Dias, J.H.P. (2007a). Movements patterns of armado, *Pterodoras granulosus*, in the Paraná River Basin. *Ecology of Freshwater Fish*, 16: 410-416.
- Makrakis, M.C., Miranda, L.E., Makrakis, S., Xavier, A.M.M., Fontes, H.M. & Morlis, W.G. (2007b). Migratory movements of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, in the highly impounded Parana River. *Journal of Applied Ichthyology*, 23:700-704.
- Malabarba, L.R. & S.H. Weitzman. (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. & 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* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7:363-367.
- Martins-Santos, I.C. & Garcia-Tavares, M. (1996). Chromosomal analysis of *Roeboides paranensis* (Pisces, Characidae) from the Paraná River. *Brazilian Journal of Genetics*, 19:271-274.
- Medrado, A.S., Figueiredo, A.V.A., Waldschmidt, A.M., Affonso, P.R.A.M. & Carneiro, P.L.S. (2008). Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology*, 31:208-214.
- 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.
- 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. Karyotypic Variability. *Caryologia*, 36:235–244
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, New York. 610p.
- Neris, N., Villalba, F., Kamada, D. & Viré, S. (2010). *Guide to the Fish of Paraguay*. 299p.
- Oliveira, C., Avelino, G.S., Abel, 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.
- 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., Rosa, R., Giuliano-Caetano, L., Júlio 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.
- Pacheco, R.B., Rosa, R., Giuliano-Caetano, L., Júlio Jr., H.F. & Dias, A.L. (2011). Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetic*, 5:237–246.
- Pastori, M.C., Roncati, H.A., Aichino, D.R., Ledesma, M.A & Fenocchio, A.S. (2009). Chromosome Characterization and Cytotaxonomic considerations on Characidae, Acestrorhynchidae and Cynodontidae (Pisces, Characiformes) from the Parana River (Argentina). *Caryologia*, 62:69-74.

- Pazza, R., Kavalco, K.F. & Bertollo, L.A.C. (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112:313-319.
- Peres, W.A.M., Buckup P.A., Kantek, D.L.A., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica*, 137:305–311.
- 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.
- Portela-Castro, A.L.B., Galetti Jr., P.M. & Bertollo, L.A.C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetic*, 11: 307–316.
- Portela-Castro, A.L.B., Julio Jr., H.F. & Nishiyama, P.B. (2001). New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Parana River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*, 110: 277–283.
- Portela-Castro, A.L.B. & Julio Jr., H.F. (2002). Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. *Cytologia*, 67:329–336.
- Reis, R.E., Kullanders, S.O. & Ferraris, C.J. (2003). Check list of the fresh water fishes of south and Central America. Porto Alegre, Edipucrs. 729p.

- 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.
- Rocon-Stage, E.A. & Almeida-Toledo, L.F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, 16:601-615.
- Santos, A.C. & Morelli, S. (2006). Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do triângulo Mineiro. *Bioscience Journal*, 22:145-150.
- Santos, D.O., Assumpção L., Makrakis, M.C., Makrakis, S., Margarido, V.P., Xavier, R. & Fogaça, P.L.C. (2013). Caracterização e estrutura da ictiofauna do rio Iguaçu, trecho a jusante das Cataratas a foz com o rio Paraná. XX encontro brasileiro de ictiologia.
- Souza, I.L. & Moreira-Filho, O. (1995). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60:1-1.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromérica heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 74:304-306.
- Vari, R.P. & Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M. S. & Lucena, C.A.S. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, 603p.
- Venere, P.C., Pfister, S.C., Moreira-Filho, O. & Galetti Jr., P.M. (1997). Chromosomal Characterization in Characinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). *Cytobios*, 92:123-131.

- 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.
- Vissotto, P.C., Foresti, F. & Oliveira, C. (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3:1-7.

5. CAPÍTULO 1

Citogenética básica e molecular em quatro espécies de *Astyanax* (Characidae: *Incertae Sedis*) coletadas à jusante das Cataratas do rio Iguaçu (Médio rio Paraná), Brasil: considerações à taxonomia e sistemática do gênero

Leonardo Marcel Paiz¹, Lucas Baumgartner², Weferson Júnio da Graça³ and Vladimir Pavan Margarido^{1*}

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia), 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Running Title: Cytogenetics in four *Astyanax* species

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

e-mail: Vladimir.Margarido@unioeste.br

Periódico: *Cytogenetic and Genome Research*

Resumo

Astyanax está incluído em *Incertae Sedis* em Characidae por não apresentar posição sistemática definida, sendo considerado como um grupo interessante para estudos sistemáticos e evolutivos. Quatro espécies (*A. abramis*, *A. asuncionensis*, *A. correntinus* e *Astyanax* sp.) foram coletadas à jusante das Cataratas do Iguaçu (Bacia do Médio rio Paraná), trecho correspondente a área de preservação ambiental do Parque Nacional do Iguaçu. Resultados evidenciaram para *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp. $2n=50$ cromossomos e RONS simples, enquanto para *A. correntinus* foram revelados $2n=36$ cromossomos e RONS múltiplas, sendo todos os cístrons ribossômicos confirmados pela FISH-rDNA 18S. A FISH-rDNA 5S revelou cístrons simples apenas para *A. asuncionensis*. Padrões de distribuição de heterocromatina distintos foram observados para todas as espécies, com exceção de um par cromossômico acrocêntrico que pode representar homeologia entre *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp. O estudo verificou marcadores citogenéticos espécie-específicos, como macroestrutura cariotípica, localização dos genes ribossômicos 5S rDNA e 18S rDNA, e padrão de distribuição da heterocromatina, auxiliando na identificação e diferenciação entre *A. abramis* e *A. asuncionensis*, além de apresentar os primeiros dados citogenéticos para *A. correntinus*, sugerindo correlação com *A. schubarti* devido à alta similaridade cromossômica e morfológica verificada entre as espécies.

Palavras-chave: macroestrutura cariotípica, heterocromatina, 5S rDNA-FISH, 18S rDNA-FISH, citossistemática.

Introdução

Entre as principais ordens de peixes, Characiformes é considerada uma das mais diversificadas nas ictiofaunas de água doce no mundo, composta por 18 famílias que agrupam 270 gêneros e mais de 1.700 espécies (Nelson, 2006). Esta diversidade é reconhecida principalmente na região Neotropical, que abriga aproximadamente 1.000 espécies somente nos sistemas hidrográficos brasileiros (Buckup et al., 2007).

Entre as famílias que compõem Characiformes, quatro encontram-se no continente Africano (Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae) e 14 estão presentes em regiões Neotropicais (Acestrorhynchidae, Anostomidae, Characidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Ctenolucidae, Curimatidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Lebiasinidae, Parodontidae e Prochilodontidae) (Nelson, 2006); contudo, alguns autores reconhecem Serrasalminidae como válida em Characiformes (Jégu et al., 2003; Calcagnotto et al., 2005; Ortí et al., 2008). Recentemente, Oliveira et al. (2011) propuseram um estudo reorganizando as relações filogenéticas na Ordem, sugerindo uma nova definição para Characidae, baseada em análises a partir de sequências de 2 genes mitocondriais e 3 genes nucleolares, obtidas de 166 gêneros distribuídos em 18 famílias reconhecidas, e mais 56 gêneros incluídos em *Incertae Sedis*. Os resultados elevam as subfamílias Bryconinae, Iguanodectinae e Triportheinae às famílias Bryconidae, Iguanodectidae e Thiportheidae, respectivamente, e a partir da classificação proposta por Albert et al. (2011), acrescentam Chalceidae (composta apenas por *Chalceus*), originando uma nova classificação para Characiformes composta por 23 famílias (incluindo Serrasalminidae).

Devido à sua alta diversidade, Characidae é conhecida por englobar grupos complexos, que revelam lacunas quanto às relações morfológicas e citogenéticas em suas subfamílias, principalmente quando envolvem espécies de pequeno porte. As principais inconsistências apresentadas na família estão relacionadas à

Incertae Sedis, em que estão alocados gêneros e espécies com taxonomia pouco conhecida, além de ausência monofilética comprovada (Lima et al., 2003; Mirande, 2010). Pertencendo a este grupo, *Astyanax* Baird and Girard 1854 foi primeiramente alocado em Tetragonopterinae, porém, a reorganização sistemática na subfamília listou todos os gêneros (com exceção de *Tetragonopterus*) em *Incertae Sedis* (Lima et al., 2003). Com recentes contribuições filogenéticas, Mirande (2009) propôs uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertae Sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado “clado *Astyanax*”.

Considerado um dos gêneros mais especiosos em Characidae, *Astyanax* agrupa aproximadamente 140 espécies válidas e conhecidas popularmente como lambaris (Froese and Pauly, 2013), que estão distribuídas na América Central e do Sul, principalmente nas bacias hidrográficas brasileiras onde ocorrem cerca de 50 espécies válidas (Buckup et al., 2007). Levantamentos ictiofaunísticos nos sistemas hidrográficos do sul do Brasil foram realizados particularmente nos sistemas que compreendem a Bacia do Alto rio Paraná (Langeani et al., 2007; Graça and Pavanelli, 2007) e Bacia do rio Iguaçu (Ingenito et al., 2004; Bifi et al., 2006; Baumgartner et al., 2012). No sistema hidrográfico da Bacia do Paraná-Paraguai foram identificadas 110 espécies, sendo oito representadas por *Astyanax* (Neris et al., 2010). Recentemente, Santos et al. (2013) realizaram estudos relativos à estrutura e composição de peixes do rio Iguaçu (à jusante das Cataratas do Iguaçu até a foz com o rio Paraná, Baixo rio Paraná), e identificaram a presença de 133 espécies, revelando para *Astyanax* significativa representatividade numérica entre as espécies coletadas.

Para a Bacia do rio Paraná, *A. altiparanae* (anteriormente citado como *A. bimaculatus*) foi descrito para o Alto rio Paraná (Garutti and Britski, 2000) e *A. asuncionensis* para o Baixo rio Paraná e rio Paraguai (Lima et al., 2003), sendo que nesta mesma região, *A. abramis*, descrita para o baixo rio Paraná, é grupo-irmão de *A. asuncionensis*, e ambas as espécies apresentam posição derivada no “clado *Astyanax*” (Mirande, 2009), podendo ser consideradas crípticas por apresentarem características morfológicas semelhantes (Britski et al., 2007).

Astyanax correntinus era listado com *A. pelegri* em *Species Inquirendae* dentro de *Ctenobrycon* (Lima et al., 2003). Porém, Mirande et al. (2006) redescreveram estas duas espécies como pertencentes a *Astyanax*, que posteriormente foram reorganizadas e agrupadas no “clado *Astyanax*” próximas a *A. asuncionensis* e *A. abramis* (Mirande, 2009), embora possam ser diferenciadas através de características morfológicas como número de escamas, número de raios ramificados na nadadeira anal e presença ou ausência de máculas e dentes maxilares. Apesar da proximidade no clado, *A. correntinus* não se enquadra morfológicamente em nenhum dos grupos artificiais reconhecidos em *Astyanax*, como ocorre nos complexos *A. bimaculatus*, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis*.

Dados citogenéticos revelam para *Astyanax* número diplóide que varia de 36 cromossomos em *A. schubarti* (Morelli et al., 1983) a 50 cromossomos, como observado nas espécies *A. scabripinnis*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* (Souza and Moreira-filho, 1995; Artoni et al., 2006; Ferreira-Neto et al., 2009; Pacheco et al., 2010). Martinez et al. (2012) fizeram uma revisão em vinte populações de *A. altiparanae*, verificando diferenças intraespecíficas associadas a fórmulas cariotípicas, além do número e posição das regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Do mesmo modo, para *A. fasciatus* (Pazza et al., 2006; Medrado et al., 2008) e *A. scabripinnis* (Mantovani et al., 2004; Santos and Morelli, 2006) foram observadas divergências interpopulacionais nas estruturas cromossômicas, principalmente associadas aos padrões de distribuição heterocromatina.

O mapeamento físico dos genes 5S rDNA e 18S rDNA também tem sido utilizado para auxiliar na caracterização de diferentes populações em espécies do complexo *A. scabripinnis* (Souza et al., 2001; Mantovani et al., 2005; Fernandes and Martins-Santos, 2006; Peres et al., 2008), do complexo *A. altiparanae* (Almeida-Toledo et al., 2002; Fernandes and Martins-Santos, 2006), do complexo *A. fasciatus* (Ferreira-Neto et al., 2012) e em *A. jacuhiensis* (Pacheco et al., 2010). Estes dados têm contribuído para caracterização de diferentes populações e espécies de *Astyanax*, através do número e posição destes genes ribossômicos,

considerados altamente variáveis no gênero (Almeida-Toledo et al., 2002; Mantovani et al., 2005; Fernandes and Martins-Santos, 2006; Peres et al., 2008).

O presente estudo tem como objetivo caracterizar pela primeira vez, através da citogenética básica e molecular, as espécies *A. abramis*, *A. asuncionensis*, *Astyanax* sp. e *A. correntinus*, coletadas à jusante das Cataratas do rio Iguaçu (médio rio Paraná), contribuindo para melhor entendimento citotaxonômico e sistemático do gênero.

Materiais e Métodos

Os exemplares capturados estão depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUP), da Universidade Estadual de Maringá, foram utilizados nove exemplares de *A. abramis* (quatro machos e cinco fêmeas, NUP 14581), 25 exemplares de *A. asuncionensis* (13 machos e 12 fêmeas, NUP 14584), 25 exemplares de *A. correntinus* (11 machos e 14 fêmeas, NUP 14582) e um exemplar de *Astyanax* sp. (fêmea, NUP 14583), no rio Iguaçu, no trecho com aproximadamente 25 km entre a jusante das Cataratas do Iguaçu e a foz com o rio Paraná, Bacia do médio rio Paraná, localizada na área de preservação do Parque Nacional do Iguaçu (PNI). Todos os exemplares foram anestesiados e sacrificados através de *overdose* por óleo de cravo (Griffiths, 2000). As preparações cromossômicas foram obtidas através das técnicas propostas por Bertollo et al. (1978) e Foresti et al. (1993). As AgRONS 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 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*

(Martins e Galetti Jr., 1999) e de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004), respectivamente. A hibridização foi realizada sob condição de elevada estringência (77%). 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) para sonda de 18S rDNA, sendo os cromossomos posteriormente contrainformados com DAPI (50 µg/mL). As metáfases foram fotografadas 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, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos.

Resultados

Astyanax abramis

O número diplóide verificado para *A. abramis* foi 50 cromossomos ($4m + 30sm + 8st + 8a$) para ambos os sexos (Fig. 1a). Foram observadas AgRONS simples, localizadas em posição terminal no braço curto do par de cromossomos 22 (Fig. 1a). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica verificada nos pares 7, 14 e 21, pericentromérica no braço longo dos pares 22 e 24, biteloméricas no par 22, além de associada às RONS (Fig. 1b). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA múltiplos em posição centromérica no par de cromossomos submetacêntricos 7 e subtelocêntricos 20, e cístrons de 18S rDNA simples em posição terminal no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 22 (Fig. 2a).

Astyanax asuncionensis

O número diplóide verificado para *A. asuncionensis* foi 50 cromossomos ($8m + 24sm + 6st + 12a$) para ambos os sexos (Fig. 1c). Foram observadas AgRONS simples, localizadas em posição terminal no braço curto do par de cromossomos 20 (Fig. 1c). O bandamento C mostrou heterocromatina

centromérica verificadas nos pares 2, 3 e 20, pericentromérica no braço curto do par 8 e braço longo dos pares 9, 13, 14, teloméricas no braço longo do par 8 e braço curto do par 20, além de associada às RONS (Fig. 1d). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA em posição centromérica no par de cromossomos submetacêntricos 9, e cístrons de 18S rDNA simples em posição terminal no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 20 (Fig. 2b).

Astyanax correntinus

O número diplóide verificado para *A. correntinus* foi 36 cromossomos ($12m + 16sm + 2st + 6a$) para ambos os sexo (Fig. 1e). Foram observadas AgRONS múltiplas em posição telomérica no braço curto dos pares de cromossomos 12, bitelomérico 17, e braço longo de um dos cromossomos homólogos do par 15 e 16 (Fig. 1e). O bandamento C mostrou heterocromatina centromérica verificada nos pares de cromossomos 1, 2, 4, 7, 9, 10, 12 e 14, telomérica no braço longo do par de cromossomos 17 e braço curto do par 18, bitelomérica no par acrocêntrico 16, além de associada às RONS (Fig. 2f). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA múltiplos em posição centromérica nos pares de cromossomos metacêntricos 2, 4 e submetacêntrico 12, e cístrons de 18S rDNA múltiplos em posição terminal no braço curto dos pares de cromossomos submetacêntricos 12, acrocêntricos 16, 17 e 18, e telomérico no braço longo dos pares de cromossomos metacêntricos 4, submetacêntricos 9, subtelo-cêntricos 15 e acrocêntricos 16 e 17 (Fig. 2c).

Astyanax sp.

O número diplóide verificado para *Astyanax* sp. foi 50 cromossomos ($4m + 26sm + 8st + 12a$) (Fig. 1g). Foram observadas AgRONS simples em posição telomérica no braço curto do par de cromossomos 25 (Fig. 1g). O bandamento C mostrou heterocromatina pericentromérica verificada no braço longo dos pares de cromossomos 4, 16, 21, 22 e 24, telomérica no braço longo do par 5, além de associada às RONS (Fig. 1h). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA múltiplos em posição centromérica nos pares de

cromossomos submetacêntricos 4 e acrocêntricos 21, e cístrons de 18S rDNA simples em posição terminal no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 25 (Fig. 2d).

Discussão

Astyanax compreende espécies interessantes para estudos citogenéticos, com diferentes modelos evolutivos que apontam desde a manutenção de uma condição cromossômica conservada até características cariotípicas derivadas, utilizadas como importantes ferramentas na diferenciação e identificação das espécies (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Vicari et al., 2008; Ferreira-Neto et al., 2009; Peres et al., 2009).

Apesar de o presente estudo ter verificado para *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp. o mesmo número diplóide ($2n=50$), com cariótipo composto por todos os tipos cromossômicos e predominância de cromossomos bi-braçados, as fórmulas cariotípicas diferem entre as três espécies (Fig. 1a, 1c, 1g), podendo ser utilizada como um marcador citogenético espécie-específico para as espécies aqui analisadas. Resultados similares foram também verificados em outras espécies de *Astyanax* (Oliveira et al., 1988; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001; Kavalco et al., 2003), assim como a presença do primeiro par de cromossomos metacêntricos de tamanho grande, características atribuídas a uma condição simplesiomórfica no gênero (Portella et al., 1988; Ferreira-Neto et al., 2009; Kavalco et al., 2009, entre outros). Diferindo das espécies que possuem estas condições basais no gênero, em *A. correntinus* verificou-se número diplóide de 36 cromossomos, com presença de oito grandes pares cromossômicos meta-submetacêntricos. Estes dados são semelhantes aos verificados em *A. schubarti* por Morelli et al. (1983) e Almeida-Toledo et al. (2002), que apesar de não ter sido analisada por Mirande (2009), compartilha com *A. correntinus* baixo número diplóide ($2n=36$) originado a partir de fusões cromossômicas, presença de grandes

pares cromossômicos meta-submetacêntricos, além de baixo número de cromossomos subtelo-acrocêntricos, evidenciando características mais derivadas. Além disso, morfologicamente as duas espécies possuem corpo alto, uma faixa horizontal prateada na lateral do corpo e uma grande quantidade de raios não ramificados na nadadeira anal. Baseado nos resultados citogenéticos e semelhanças morfológicas é possível hipotetizar que as duas espécies possam estar proximamente relacionadas filogeneticamente.

Do mesmo modo que verificado para o número diplóide, o número e posição das RONS (impregnação pela prata e FISH 18S rDNA) em *Astyanax* foi revelado conservado para as três espécies que apresentaram $2n=50$ cromossomos, com presença de cístrons simples localizados sempre no braço curto e em posição telomérica de cromossomos acrocêntricos de *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp. (Fig. 1a, 1b, 1c). *Astyanax abramis* e *A. asuncionensis* fazem parte do complexo *A. bimaculatus*, que é diagnosticado por possuir com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos. Resultados semelhantes foram observados em populações de *A. altiparanae*, que também faz parte do complexo *A. bimaculatus*, (Domingues et al., 2007; Peres et al., 2008; Pacheco et al., 2011), embora para esta espécie também tenham sido observadas variações intraespecíficas quando comparadas diferentes populações (Fernandes e Martins-Santos, 2006; Ferreira-Neto et al., 2009). Entretanto, em *A. correntinus* foram observadas RONS múltiplas pela impregnação por prata (seis sítios, Fig. 1e) e pela 18S rDNA-FISH, sendo revelado sítios adicionais (14 sítios, Fig. 2c), devido a primeira técnica verificar apenas RONS ativas na intérfase precedente. RONS múltiplas também foram observadas em *A. schubarti* com a presença de quatro cístrons ribossômicos verificados através da 18 rDNA-FISH (Almeida-Toledo et al., 2002). Em espécies congêneres que compõem grupos morfológicos, como o complexo *A. scabripinnis*, foram verificados até 16 cromossomos portadores destes genes ribossômicos (Ferro et al., 2001; Mantovani et al., 2005), demonstrando o elevado grau de variabilidade numérica observada para o gênero.

Com relação à 5S rDNA-FISH, foram verificados cístrons simples para *A. asuncionensis* localizados em posição centromérica, semelhante ao encontrado em diferentes populações de *A. altiparanae*, apesar de diferirem na localização (posição intersticial-proximal (Ferreira-Neto et al., 2009; Pacheco et al., 2011). Cístrons múltiplos foram verificados para *A. abramis* (quatro cístrons), *A. correntinus* (cinco cístrons) e *Astyanax* sp. (quatro cístrons), em posição centromérica para todos os cromossomos portadores. Desta forma, quando comparados *A. abramis* e *A. asuncionensis*, os dados apontam diferenças interespecíficas, possibilitando este marcador ser utilizado como ferramenta para a diferenciação destas espécies que são consideradas crípticas, pois morfologicamente são diagnosticadas apenas pela diferença no número de escamas perfuradas da linha lateral, até 40 em *A. asuncionensis* e 42 ou mais em *A. abramis* (Britski et al., 2007). De modo semelhante, *A. correntinus* apresenta maior número de cromossomos portadores de sítios de 5S rDNA em relação ao verificado em *A. schubarti* (quatro cístrons) (Almeida-Toledo et al., 2002), evidenciando a importância deste marcador para auxiliar nos estudos citotaxonômicos em espécies correlacionadas. Além de *A. correntinus* apresentar uma situação incomum no gênero, com elevado número de cromossomos portadores de sítios de 5S rDNA, foi verificada sintenia em um dos cromossomos homólogos (Fig. 2c). Mantovani et al. (2005) também verificaram em uma população de *A. scabripinnis* sintenia para estes genes ribossômicos, sendo uma característica considerada derivada em termos de organização genômica e evolução cromossômica, que pode ocasionar translocações indesejáveis de sequências 5S rDNA pela associação ao 18S rDNA, não permitindo a evolução destes genes de forma independente (Martins e Galetti Jr., 2000). Desta forma, apesar da distribuição dos cístrons 5S rDNA ser considerada conservada para alguns grupos de peixes, os resultados verificados mostram variação quanto ao número e localização desses genes ribossômicos em *Astyanax*, apontando que esta condição não condiz para todas as espécies do gênero.

Com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, apesar de pouca em *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp., esta foi verificada

principalmente em posição centromérica e intersticial-proximal, além de associadas às RONS. Estes resultados foram também observados em outras espécies próximas do gênero, como em *A. altiparanae* (Domingues et al., 2007; Ferreira-Neto et al., 2009) e *A. jacuhiensis* (Pacheco et al., 2010). Ainda, em *A. abramis* e *A. asuncionensis*, o primeiro par de cromossomos acrocêntricos, além de portar as RONS no braço curto, compartilham um mesmo padrão de bandas: heterocromatina centromérica, heterocromatina intersticial-proximal no braço longo e heterocromatina telomérica no braço longo, podendo este par representar cromossomos homeólogos entre estas espécies (Fig. 1b). Em *A. correntinus* foram observadas heterocromatinas centroméricas na maioria dos pares de cromossomos meta-submetacêntricos grandes (Fig. 1f), sendo este padrão semelhante ao observado em *A. schubarti* (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001). Diferentemente de *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *A. correntinus*, *Astyanax* sp. apresentou um padrão particular, com a presença de cinco pares de cromossomos subtelo-acrocêntricos portando heterocromatina em posição intersticial-proximal no braço longo, além de alguns pares cromossômicos submetacêntricos portarem heterocromatina tanto em posição centromérica quanto telomérica no braço longo (Fig. 1h). *Astyanax* sp. faz parte do complexo *Astyanax scabripinnis* definido por Bertaco and Malabarba (2001); porém os dados citogenéticos e morfológicos aqui obtidos não permitiram enquadrá-la em nenhuma espécie conhecida. Deste modo acreditamos tratar-se de uma nova espécie, sendo que um maior número de exemplares é necessário para averiguação de tal hipótese.

Desta forma, o presente estudo mostra, através da caracterização básica e molecular, marcadores citogenéticos espécie-específicos, como macroestrutura cariotípica, distribuição dos genes ribossômicos 5S rDNA e 18S rDNA, e padrão da distribuição de heterocromatina, que podem servir como caracteres citotaxonômicos na diagnose e diferenciação entre *A. abramis* e *A. asuncionensis*, consideradas espécies crípticas, bem como reforçar a ocorrência de uma espécie ainda não descrita taxonomicamente de *Astyanax*, verificada através da análise morfológica e corroborada pela citogenética. Além disso, os dados obtidos destes primeiros estudos citogenéticos em *A. correntinus* sugerem uma grande

similaridade (macro- e microestrutura cariotípica) com *A. schubarti*, sugerindo que estas espécies possam pertencer ao mesmo grupo morfológico e que podem ser filogeneticamente relacionadas.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Ministério do Meio Ambiente e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste ao GETECH e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

Albert JS, Bart HL Jr, Reis RR: Species richness and cladal diversity. In Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes. University of California 89-104 (2011).

Almeida–Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ: 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 (2002).

Artori RF, Shibatta AO, Gross MC, Schneider CH, de Almeida MC, Vicari MR, Bertollo. LAC: *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 (2006).

Baumgartner G, Pavanelli CS, Baumgartner D, Bifi AG, Debona T, Frana VA: Peixes do baixo rio Iguaçu 203p (2012).

Bertaco VA, Malabarba LR. 2001: Description of new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the "*A. scabripinnis* species complex". Ichthyological Exploration of Freshwaters, 12: 221-234 (2001).

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetic 1:103-120 (1978).

Bifi AG, Baumgartner D, Baumgartner G, Frana VA, Debona T: Composição específica e abundância da ictiofauna do rio dos Padres, bacia do rio Iguaçu, Brasil. Acta Scientiarum 28:203-211 (2006).

Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS: Peixes do Pantanal 230p (2007).

Buckup PA, Menezes NA, Guazzi MS: Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil 193p (2007).

Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R: Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 36:135-153 (2005).

Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF: Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). Caryologia 54:209-215 (2001).

Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Artoni RF: Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Parana basin. *Neotropical Ichthyology* 5:37–44 (2007).

Fernandes CA, Martins-Santos IC: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29:464-468 (2006).

Ferreira-Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae Sedis*) *Genetics and Molecular Biology* 32:792-796 (2009).

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

Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110:55-62 (2001).

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF: A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49:810-813 (1993).

Froese R, Pauly D: FishBase. Internet References. (2013) <http://www.fishbase.org>
Acessado em 15 de fevereiro de 2013.

Garutti V, Britski HA: Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Alto 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 (2000).

Graça WJ, Pavanelli CS: Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes, 241p (2007).

Griffiths SP: The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57:1453-1464 (2000).

Hatanaka T, Galetti Jr. PM: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244 (2004).

Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015 (1980).

Ingenito LFS; Duboc LF, Abilhoa V: Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciência e Veterinária* 7:23-26 (2004).

Jégu M, Keith P, Bail PY: *Myloplus planquettei* n. sp. (Teleostei, Characidae, Serrasalminae), une nouvelle espèce de grand Serrasalminae phytophage du bouclier guyanais (Guyane française). *Revue Suisse de Zoologie* 110:823-853 (2003).

Kavalco KF, Moreira-Filho O: Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraiba do Sul river basin. *Caryologia* 56:453–461 (2003).

Kavalco KF, Brandao KO, Pazza R, Almeida-Toledo LF: *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*. *Genetics and Molecular Biology* 32:477–483 (2009).

Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, Shibatta OA, Pavanelli CS & Casatti L: Diversidade da ictiofauna do alto rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7(3) (2007).

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

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JF, Vari RPP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Casatti L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF: Genera *Incertae Sedis* in Characidae, pp. 134-141. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* 729p (2003).

Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP: Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic and Histochemistry* 87:433-438 (2012).

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

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

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

Martinez ERM, Alves AL, Silveira SM, Foresti F, Oliveira C. Cytogenetic analysis in the *Incertae Sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti , Britzki, 2000 *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin *Comparative Cytogenetic* 6:41–51 (2012).

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

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

Medrado AS, Figueiredo AVA, Waldschmidt AM, Affonso PRAM, Carneiro PLS Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology* 31:208-214 (2008).

Mirande JM: Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25:574–613 (2009).

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

Mirande JM, Azpelicueta MM, Aguilera G: Redescription of *Astyanax correntinus* (Holmberg, 1891) (Teleostei: Characiformes: Characidae), more than one hundred years from original description. *Zoologische Abhandlungen* 55:9-15 (2006).

Moreira-Filho O, Bertollo LAC: *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Brazilian Journal of Genetic* 14:331-357 (1991).

Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Toledo-Filho SA: Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. *Caryologia* 36:235–244 (1983).

Nelson JS: *Fishes of the World*, Fourth Edition. John Wiley, Sons, Hoboken, New Jersey. 601p (2006).

Neris N, Villalba F, Kamada D, Viré S: *Guide to the Fish of Paraguay*. 299p (2010).

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britsky HA, Toledo-Filho SA: Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetic* 11:577–624 (1988).

Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Corrêa e Castro RM: Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11:275 (2011).

Ortí G, Sivasundar A, Dietz K, Jégu M: Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology* 31:343-351 (2008).

Pacheco RB, Rosa R, Giuliano-Caetano L, Júlio Jr. HF, Dias AL: Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 8:667-671 (2010).

Pacheco RB, Rosa R, Giuliano-Caetano L, Júlio Jr. HF, Dias AL: Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetic* 5:237–246 (2011).

Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC: Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research* 112:313-319 (2006).

Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31:222–226 (2008).

Peres WAM, Buckup PA, Kantek DLZ, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica* 137:305–311 (2009).

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

Portela ALBS, Galetti Jr. P.M., Bertollo LAC: Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* 11:307–316 (1988).

Santos AC, Morelli S: Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do triângulo Mineiro. *Bioscience Journal* 22:145-150 (2006).

Santos DO, Assumpção L, Makrakis MC, Makrakis S, Margarido VP, Xavier R, Fogaça PLC: Caracterização e estrutura da ictiofauna do rio Iguaçu, trecho a jusante das Cataratas a foz com o rio Paraná. XX encontro brasileiro de ictiologia (2013).

Souza IL, Moreira-Filho O: Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* 60:1-1 (1995).

Souza IL, Galián J, De La Rúa P, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia* 66:85-91 (2001).

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 74:304-306 (1972).

Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31:173-179 (2008).

Figura 1

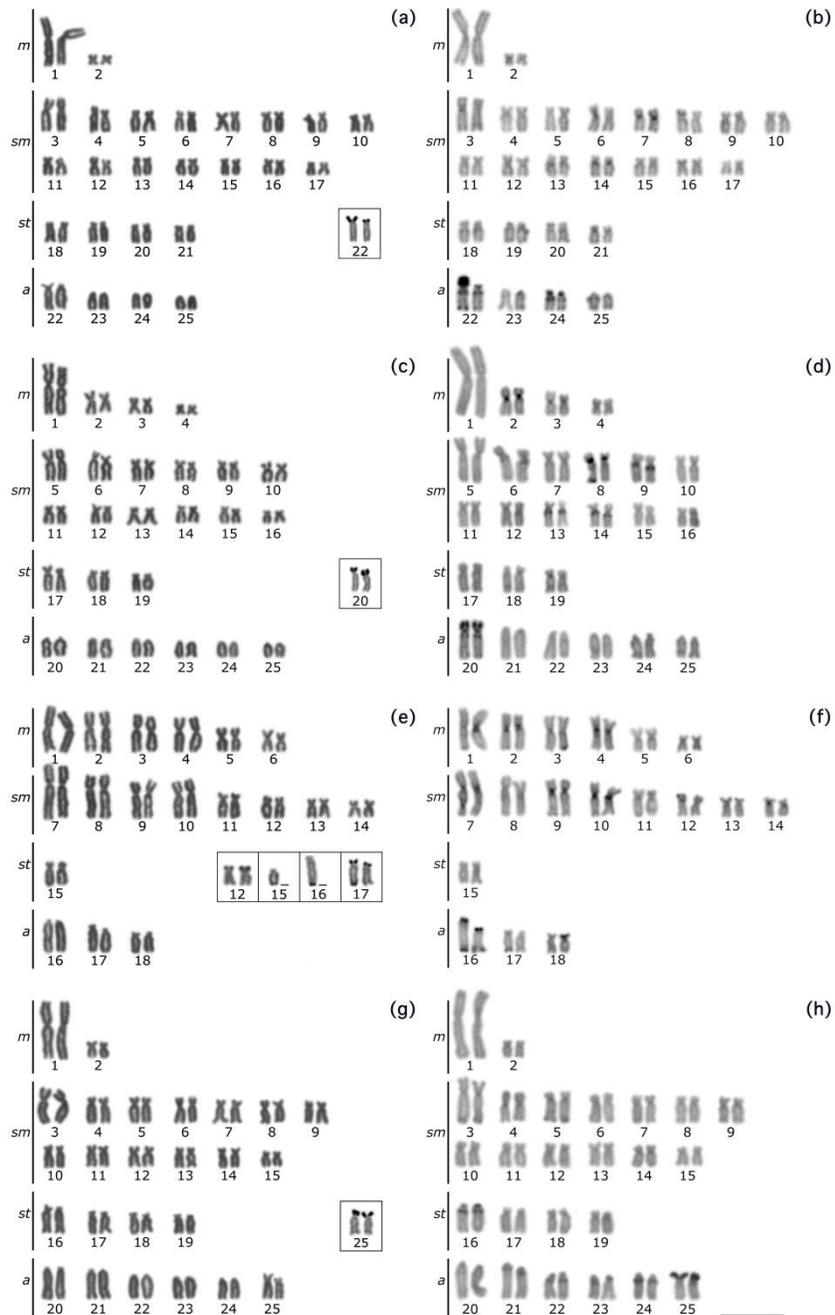


Figura 1. Cariótipos corados com Giemsa de (a) *Astyanax abramis*, (c) *Astyanax asuncionensis*, (e) *Astyanax correntinus*, (g) *Astyanax* sp., e C-bandados de (b) *Astyanax abramis*, (d) *Astyanax asuncionensis*, (f) *A. correntinus*, (h) *Astyanax* sp. Nos boxes, os pares portadores das AgRONS. A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

Figura 2

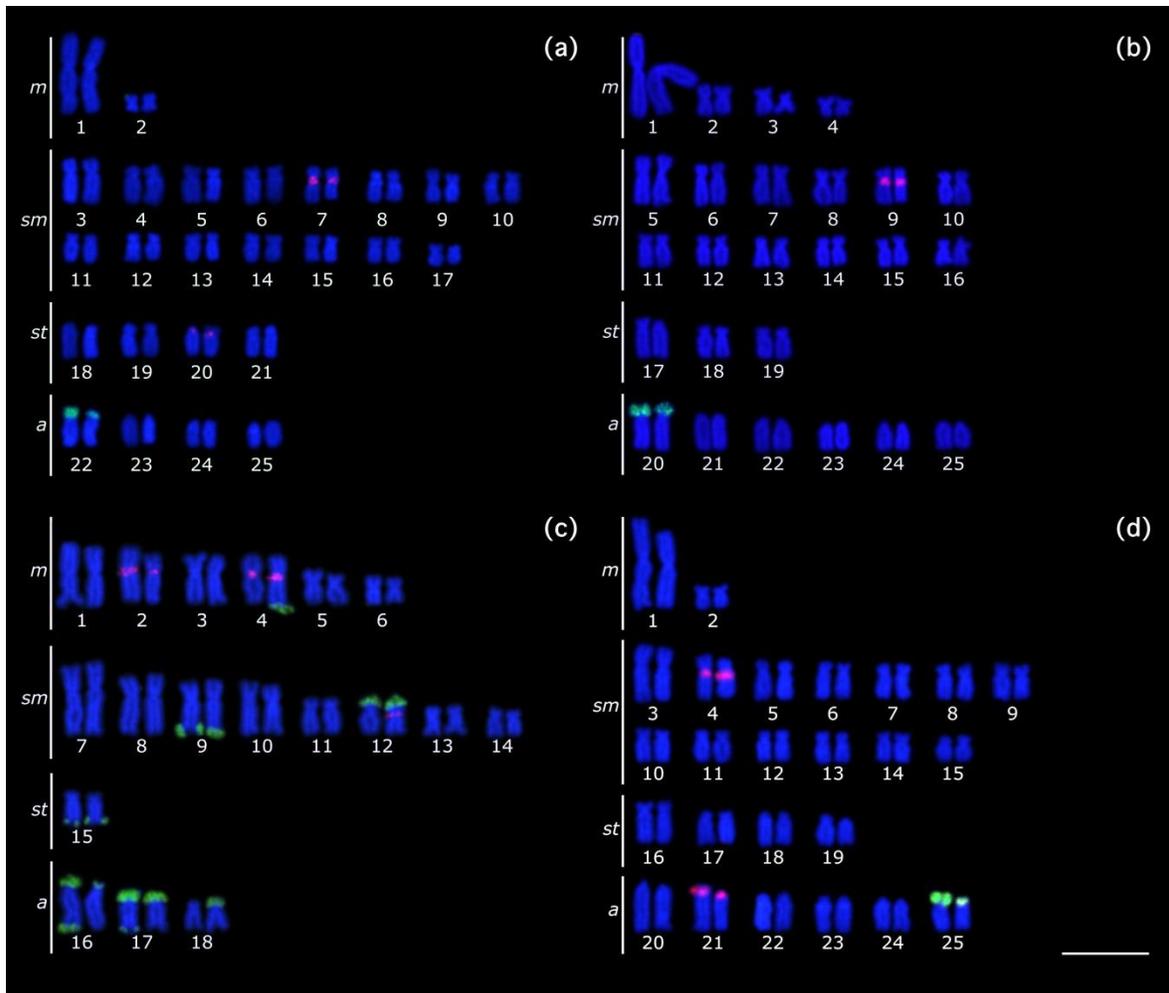


Figura 2. Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e 18S rDNA (verde) de (a) *A. abramis*, (b) *A. asuncionensis*, (c) *A. correntinus* e (d) *Astyanax* sp. A barra representa 10 μ m.

6. CAPÍTULO 2

Mapeamento físico dos genes 5S rDNA e 18S rDNA em quatro espécies de lambaris coletados à jusante das Cataratas do rio Iguaçu (Baixo rio Paraná), Parque Nacional do Iguaçu, Brasil (Characiformes: Characidae)

Leonardo Marcel Paiz¹, Lucas Baumgartner², Weferson Júnio da Graça³ & Vladimir Pavan Margarido^{1*}

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia), 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

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

e-mail: Vladimir.Margarido@unioeste.br

Periódico: *Neotropical Ichthyology*

Resumo

Conhecida pela diversidade na região Neotropical a família Characidae é representada por gêneros e espécies que formam grupos interessantes para análises citogenéticas, sistemáticas e evolutivas. Foram coletados exemplares de quatro gêneros de Characidae (*A. abramis*, *M. dichroura*, *R. descavadensis* e *T. argenteus*) na Bacia do Baixo rio Paraná. Foram verificados $2n=50$ cromossomos para *Astyanax abramis* e *Moenkhausia dichroura*, e $2n=52$ cromossomos para *Roeboides descavadensis* e *Tetragonopterus argenteus*. A FISH com sondas de 5S rDNA evidenciou cístrons simples apenas em *T. argenteus*, enquanto cístrons múltiplos de 5S rDNA foram observados em *A. abramis*, *M. dichroura* e *R. descavadensis*, enquanto a FISH-rDNA 18S, verificou cístrons simples para todas as espécies, mas em diferentes cromossomos e/ou posição. Estes são os primeiros dados citogenéticos moleculares para a espécie *A. abramis* e para os gêneros *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus*, sendo revelados variabilidade quanto ao número e posição dos cístrons de 5S rDNA e 18S rDNA, e a condição conservada apresentada nestas espécies sugere que podem ser aplicados como marcadores espécie-específicos.

Palavras chave: *Astyanax abramis*, *Moenkhausia dichroura*, *Roeboides descavadensis*, *Tetragonopterus argenteus*, citossistemática.

Introdução

Análises citogenéticas têm sido empregadas como uma importante ferramenta na identificação e diferenciação das espécies de peixes, e têm auxiliado na compreensão da diversidade ictiológica dos sistemas hidrográficos (Bertollo *et al.*, 1986). Mais recentemente, a citogenética molecular tem contribuído com resultados que confirmam e complementam discussões cromossômicas e evolutivas, com diversos estudos realizados principalmente em espécies neotropicais (Centofante *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2009; Ferreira-Neto *et al.*, 2012). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de rDNA vem sendo utilizada para localizar seqüências específicas no complemento cromossômico, organizadas em duas famílias multigênicas (5S rDNA e 45S rDNA), fornecendo informações mais precisas sobre a organização do genoma em peixes (Galetti Jr. & Martins, 2004).

Caracterizados por uma seqüência de DNA composta por 120 pares de bases, os genes 5S rDNA estão associados a espaçadores não transcritos (NTS) (Long & Dawid, 1980). Estes cístrons são considerados estáveis, e seu uso tem sido útil em estudos evolutivos como marcadores espécie-específico ou populacionais (Pendás *et al.*, 1995). Estas seqüências podem estar presentes em dois ou quatro cromossomos na maioria dos casos (Vicente *et al.*, 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2006; Vicari *et al.*, 2008), ou em menor frequência apresentando mais de quatro cromossomos portadores desses cístrons (Fujiwara *et al.*, 1998; Diniz *et al.*, 2009).

As seqüências compostas por genes 45S rDNA são formadas por subunidades 5.8S, 18S e 28S que constituem as regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Estas regiões quando ativas na intérfase precedente são normalmente detectadas com impregnação por nitrato de prata que, em peixes têm sido utilizada devido à simplicidade do método contribuindo como importante marcador citotaxonômico em estudos evolutivos em diferentes grupos (Galetti Jr., 1998; Peres *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2012). Entretanto, à especificidade da prata evidencia apenas cístrons ribossômicos ativos, enquanto a FISH-DNAr 18S revela o número total de cístrons (Galetti Jr. & Martins, 2004).

Astyanax Baird & Girard 1854 agrupa o maior número de espécies com dados citogenéticos em Characidae. É considerado um dos gêneros mais especiosos da família com 137 espécies válidas em toda a região Neotropical (Froese & Pauly, 2013), sendo mais de 50 espécies distribuídas em rios e riachos brasileiros (Buckup *et al.*, 2007), e apresenta características morfológicas diversificadas que dificultam o reconhecimento e organização filogenética dentro do grupo (Mirande, 2009; 2010). Esta variabilidade também é revelada na distribuição dos cístrons de 5S rDNA e 18S rDNA (Mantovani *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2007; Vicari *et al.*, 2008; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2011; Ferreira-Neto *et al.*, 2012).

Moenkhausia Eigenmann 1903, recentemente alocado em Tetragonopterinae (Oliveira *et al.*, 2011), compreende 75 espécies válidas distribuídas nas bacias hidrográficas neotropicais (Froese & Pauly, 2013) que, mesmo sem apresentar características morfológicas que indiquem o monofiletismo do gênero, agrupa espécies com padrões morfológicos semelhantes (Costa, 1994), criando uma sistemática complexa com problemas quanto a sua classificação (Benine *et al.*, 2009; Bertaco *et al.*, 2011). De acordo com Mirande (2010), o gênero provavelmente não é monofilético, sendo classificado como parafilético a *Bario* Myers, 1940 dentro de Tetragonopterinae. Dados cromossômicos para o gênero estão restritos principalmente a citogenética básica, revelando número diplóide de 50 cromossomos, presença de AgRONS simples (Portela-Castro *et al.*, 1988) ou múltiplas (Foresti *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 2012), distribuição de heterocromatina centromérica/pericentromérica, além da presença de cromossomos Bs (Foresti *et al.*, 1989, Portela-Castro *et al.*, 2001; Portela-Castro & Júlio Jr., 2002; Hashimoto *et al.*, 2012).

Roeboides Günther 1864 compreende 21 espécies distribuídas nas grandes bacias do território brasileiro (Froese & Pauly, 2013), sendo principalmente conhecidas em trabalhos que envolvem estudos de inter-relações e taxonomia em subgrupos do gênero (Lucena, 2000; 2001; 2003; 2007). Assim como muitos gêneros em Characidae, resultados cromossômicos estão relacionados a análises citogenéticas básicas, como em *R. paranensis* (Martins-Santos & Tavares, 1996), *R. xenodon* (Venere *et al.*, 1997) e *R. bonariensis* (Pastori *et al.*, 2009), com número diplóide de 52 cromossomos, AgRONS simples e heterocromatina centroméricas na maioria dos pares cromossômicos.

Tetragonopterus Cuvier 1816 era reconhecido como o único gênero válido em Tetragonopterinae (Lima *et al.*, 2003); entretanto, a filogenia proposta por Mirande (2009; 2010) aponta *Tetragonopterus* como uma unidade monofilética em um clado Tetragonopterinae que aloca gêneros como *Moenkhausia*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*. O gênero é representado por 6 espécies (Froese & Pauly, 2013), e dados cromossômicos para o gênero são restritos aos de Portela *et al.* (1988) para *T. chalceus*, que verificaram número diploide de 52 cromossomos e AgRONS simples, o que dificulta as análises comparativas entre espécies congêneres.

Desta forma, o presente estudo busca através da hibridização *in situ* fluorescente, mapear os genes ribossômicos 5S rDNA e 18S rDNA em *Astyanax abramis* (Jenyns 1842), *Moenkhausia dichroua* (Kner 1858), *Roeboides descalvadensis* Fowler 1932 e *Tetragonopterus argenteus* Cuvier 1816, sendo estes os primeiros dados citogenéticos moleculares para estas espécies, e que poderão contribuir a citossistemática nas comparações entre espécies congêneres e de grupos morfológicos correlacionados.

Materiais e Métodos

Foram coletados 9 exemplares de *A. abramis* (4 machos e 5 fêmeas), 30 exemplares de *M. dichroua* (12 machos e 18 fêmeas), 15 exemplares de *R. descalvadensis* (9 machos e 5 fêmeas) e 12 exemplares de *T. argenteus* (7 machos e 5 fêmeas) do rio Iguazu, Bacia do Baixo rio Paraná, no trecho com aproximadamente 25 km entre a jusante as Cataratas do Iguazu e a foz com o rio Paraná, localizada na área de preservação do Parque Nacional do Iguazu (PNI). Todos os exemplares foram anestesiados e sacrificados através de *overdose* por óleo de cravo (Griffiths, 2000). Células metafísicas foram obtidas do rim através da técnica proposta por Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1993). 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* (Martins & Galetti, 1999) e de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004), respectivamente.

A hibridização foi realizada sob condição de elevada estringência (77%). Sondas foram marcadas através de *nick translation*, com digoxigenina-11-dUTP (5S rDNA) e biotina-16-dUTP (18S rDNA) (Roche®). A detecção dos sinais foram realizadas com antidigoxigenina-rodamina (Roche®) para sonda de 5S rDNA e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotinilada (Sigma) para sonda de 18S rDNA, sendo os cromossomos posteriormente contra-corados com DAPI (50 µg/mL). O material analisado foi fotografado utilizando 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, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos.

Resultados

Astyanax abramis

O número diplóide verificado para *A. abramis* foi 50 cromossomos ($4m + 30sm + 8st + 8a$) para ambos os sexos (Fig. 1a). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA múltiplos em posição centromérica no par de cromossomos submetacêntricos 7 e subtelocêntricos 20, e cístrons de 18S rDNA simples em posição telomérica no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 22 (Fig. 1a).

Moenkhausia dichroua

O número diplóide verificado para *M. dichroua* foi 50 cromossomos ($26m + 24sm$) para ambos os sexos (Fig. 1b). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cístrons de 5S rDNA múltiplos em posição centromérica no par de cromossomos metacêntricos 10 e submetacêntrico 17, e cístrons de 18S rDNA simples em posição intersticial no braço curto do par de cromossomos metacêntricos 2 (Fig. 1b).

Roeboides descalvadensis

O número diplóide verificado para *R. descalvadensis* foi 52 cromossomos ($4m + 14sm + 10st + 24a$) para ambos os sexos (Fig. 1c). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cóstrons de 5S rDNA múltiplos em posição pericentromérica no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 15, 20, e 25, e cóstrons de 18S rDNA simples em posição telomérica no braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 22 (Fig. 1c).

Tetragonopterus argenteus

O número diplóide verificado para *T. argenteus* foi 52 cromossomos ($6m + 10sm + 36a$) para ambos os sexos (Fig. 1d). A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou cóstrons de 5S rDNA simples em posição pericentromérica no braço longo do par de cromossomos acrocêntricos 13, e cóstrons de 18S rDNA simples em posição intersticial no braço curto do par de cromossomos submetacêntricos 4 (Fig. 1d).

Discussão

Os dados citogenéticos revelaram para *A. abramis* e *M. dichroua* 50 cromossomos, e para *R. descalvadensis* e *T. argenteus* 52 cromossomos, confirmando dados citogenéticos básicos previamente descritos para estas espécies (Carvalho et al., 2002; Portela-Castro & Júlio Jr., 2002; Venere et al., 1997, Alberdi & Fenocchio 1997, respectivamente). Para o mapeamento físico dos cóstrons ribossômicos, foram verificados cóstrons de 5S rDNA simples apenas em *T. argenteus* (1 par de cromossomos acrocêntricos), e múltiplos em *A. abramis* (1 par de cromossomos submetacêntricos e 1 par de cromossomos subtelocêntricos), *M. dichroua* (1 par de cromossomos metacêntricos e 1 par de cromossomos submetacêntricos) e *R. descalvadensis* (3 pares de cromossomos acrocêntricos), sendo que, com exceção de *T. argenteus* com cóstrons em posição intersticial proximal (Fig. 1d), as demais espécies apresentaram cóstrons em posição centromérica (Fig. 1a-c).

Os dados observados em *A. abramis* quando comparados a espécies congêneres revelam diversidade quanto ao número e posição dos cístrons ribossômicos 5S rDNA. Em *A. altiparanae* e *A. lacustres* são observados cístrons simples em posição intersticial proximal (1 par de cromossomos submetacêntricos e 1 par de cromossomos metacêntricos, respectivamente) (Peres *et al.*, 2008; Ferreira-Neto *et al.*, 2009). Cístrons múltiplos são observados em *A. fasciatus* em posição pericentromérica (1 par de cromossomos metacêntricos, 1 cromossomo subteloentríco e 1 cromossomo acrocêntrico; Peres *et al.*, 2009) e intersticial proximal (1 par de cromossomos metacêntricos e 1 par de cromossomos acrocêntricos; Ferreira-Neto *et al.*, 2012). Diferenças interpopulacionais conspícuas são reveladas em *A. scabripinnis* com cístrons múltiplos em posição intersticial proximal (1 par de cromossomos metacêntricos e 1 par de cromossomos acrocêntricos; Fernandes & Martins-Santos 2006; Vicari *et al.*, 2008; Peres *et al.*, 2008), intersticial proximal e intersticial distal (1 cromossomo metacêntrico e 3 cromossomos não identificados; Ferro *et al.*, 2001), pericentromérico, intersticial e intersticial-distal (1 par de cromossomos metacêntricos, 1 par de cromossomos submetacêntricos e 1 cromossomo acrocêntrico, respectivamente; Mantovani *et al.*, 2005). Desta forma, quando comparados os resultados entre as espécies de *Astyanax*, é possível observar com maior frequência a presença de cístrons de 5S rDNA múltiplos, revelando variação interpopulacional e interespecífica. Segundo Mantovani *et al.* (2005), cístrons predominantemente em posição intersticial podem estar correlacionados a estabilidade destes genes em *A. scabripinnis* e outras espécies do gênero.

Cístrons de 5S rDNA em posição intersticial pode também ser atribuída como característica conservada para outros gêneros em Characidae. Esta condição foi observada em *T. argenteus*, que apesar de ser associado a um modelo cariotípico derivado na família, comporta apenas cístrons 5S rDNA simples em posição intersticial proximal (Fig. 1d). Estes dados também são observados em outros gêneros de famílias correlacionadas a Characidae, como ocorre em *Triportheus* (Diniz *et al.*, 2009) e em *Brycon* (Mariguela *et al.*, 2010). Em contrapartida, para *M. dichroua* e *R. descalvadensis* são revelados cístrons de 5S rDNA múltiplos e em posição centromérica, podendo esta condição ser originada a partir da associação entre estes genes ribossômicos e heterocromatina, facilitando a

dispersão dessas sequências genômicas através de eventos de transposição (Molina & Galetti Jr., 2002).

Para o mapeamento dos cístrons 18S rDNA, foi observado cístrons simples localizados no braço curto para todas as espécies analisadas, porém com divergências no tipo cromossômico, revelado em cromossomos acrocêntricos de *A. abramis* e *R. descalvadensis*, e em posição intersticial proximal nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de *M. dichroua* e *T. argenteus*, respectivamente. Resultados semelhantes a *A. abramis* foram observados em populações de *A. altiparanae* (Domingues *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2011), embora para esta espécie também são reveladas variações intraespecíficas (Fernandes & Martins-Santos, 2006; Ferreira-Neto *et al.*, 2009). Apresentando maior divergência, Ferro *et al.* (2001) e Mantovani *et al.* (2005) verificaram em *A. scabripinnis* variabilidade intrapopulacional em número e posição de cístrons 18S rDNA.

Para *Moenkhausia*, a variação intra e interindividual em número e posição das RONS foram verificadas em diferentes populações de *M. sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 2012). Embora em *Tetragonopterus* e *Roeboides* os dados da literatura com relação às RONS seja restrito a análise por impregnação pela prata, os dados aqui obtidos da FISH-rDNA 18S corroboram a literatura. Portela *et al.* (1988) verificaram em *T. chalceus* RONS simples em posição intersticial proximal em cromossomos meta-submetacêntricos, e Martins-Santos & Tavares (1996) e Pastori *et al.* (2009) verificaram RONS em apenas um par cromossômico em *R. paranensis* e *R. bonariensis*, respectivamente.

Deste modo, além de ser o primeiro estudo envolvendo o mapeamento destes genes ribossômicos em *A. abramis* e em espécies dos gêneros *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus*, os dados aqui apresentados mostram variabilidade quanto ao número e posição dos cístrons de 5S rDNA e 18S rDNA na família Characidae, e a condição conservada apresentada nestas espécies sugere que podem ser aplicados como marcadores espécie-específicos.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Ministério do Meio Ambiente e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio) pela autorização para a captura dos peixes. Os autores agradecem a Unioeste ao GETECH e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) pelo suporte logístico. Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- Alberdi, A.J. & A. S. Fenocchio. 1997. Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia*, 62:171–176.
- Benine, R. C., T. C. Mariguela, & C. Oliveira. 2009. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 7:161-168.
- Bertaco, V. A., F. C. Jerep, & F. R. Carvalho. 2011. New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi: Characidae) from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil *Neotropical Ichthyology*, 9:57-63.
- Bertollo, L. A. C., C. S. Takahashi, & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetic* 1:103-120. *Brazil. Zoologischer Anzeiger*, 232:21-29.

Bertollo, L. A. C., O. Moreira-Filho & P. M. Galetti. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28: 153-159.

Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Guazzi. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. 195p.

Carvalho, M. L., C. Oliveira, M. C. Navarrete, O. Froehlich & F. Foresti. 2002. Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysi) from the Neotropical region. *Genetics and Molecular Biology*, 25:49-55.

Centofante, L., L. A. C. Bertollo, A. J. Justi & O. Moreira-Filho. 2003. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14:361-368.

Costa, W. J. E. M. 1994. Description of two new speceis of the genus *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) fromthe central Brazil. *Zoologischer Anzeiger*, 232:21-29.

Diniz, D., A. Laudicina & L. A. C. Bertollo. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32:37-41.

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

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

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.

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 Cytogenetic, 6:29–40.

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.

Foresti, F., C. Oliveira & L. F. Almeida-Toledo. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. Experientia, 49:810-813.

Foresti, F., L. F. Almeida-Toledo & A. S. Toledo. 1989. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica, 79:107–114.

Froese, R. & D. Pauly, 2013. FishBase. Internet References. <http://www.fishbase.org> Acessado em 10 de Janeiro de 2013.

Fujiwara, A., S. Abe, E. Yamaha, F. Yamazaki & M. C. Yoshida. 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. Chromosome Research, 6:463-471.

Galetti Jr., P. M. 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies, Italian Journal of Zoology, 65:53-56.

Galetti Jr., P. M. & Martins, C. 2004. Contribuição da Hibridização in situ para o Conhecimento dos Cromossomos de Peixes. In: Marcelo Guerra. FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética, 3:61-88.

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.

Hashimoto, D. T., T. A. Voltolin, A. D. N. V. A. Paes, F. Foresti, J. Bortolozzi, F. Porto-Foresti. 2012. Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). *Comparative Cytogenetics*, 6:141–151.

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

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. Silva, R. P. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Casatti, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. Pp. 134-141. In: Reis, R. E., S. O. Kullander, C. J. Ferraris. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. 729p.

Long, E. O. & I. B. Dawid. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49:727-764.

Lucena, C. A. S. 2000. Revisão taxonômica e filogenia das espécies transandinas do gênero *Roeboides* Günther (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). Comunicação do Museu de Ciência e Tecnológica, 13: 3-63.

Lucena, C. A. S. 2001. Uma nova espécie de *Roeboides* Günther da região superior da bacia Amazônica (Teleostei: Characiformes: Characidae). Biotemas, 14:61-70.

Lucena, C. A. S. 2003. Revisão taxonômica e relações filogenéticas das espécies de *Roeboides* grupo-microlepis (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Iheringia, Série Zoologia, 93:283-308.

Lucena, C. A. S. 2007. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Roeboides* grupo-affins (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Iheringia, 97:117-136.

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.

Mariguela, T. C., M. Nirchio & E. Ron. 2010. Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. Comparative Cytogenetics, 4:185-193.

Martinez, E. R. M., A. L. Alves, S. M. Silveira, F. Foresti & C. Oliveira. 2012. Cytogenetic analysis in the *Incertae Sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti, Britzki, 2000 *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. Comparative Cytogenetics, 6: 41–51.

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

Martins-Santos, I. C. & M. Garcia Tavares. 1996. Chromosomal analysis of *Roebooides paranensis* (Pisces, Characidae) from the Paraná River. *Brazilian Journal of Genetics*, 19, 2: 271-274.

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.

Molina, W. F., P.M. Galetti. 2002. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, 24:373-377.

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 ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11:275.

Pacheco, R. B., R. Rosa, L. Giuliano-Caetano, H. F. Júlio Jr. & A. L. Dias. 2011. Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *Comparative Cytogenetic*, 5:237–246.

Pastori, M. C., H. A. Roncati, D. R. Aichino, M. A. Ledesma & A. S. Fenocchio. 2009. Chromosome Characterization and Cytotaxonomic considerations on Characidae, Acestrorhynchidae and Cynodontidae (Pisces, Characiformes) from the Parana River (Argentina). *Caryologia*, 62:69-74.

Pendás, A. M., P. Mórán, J. L. Martínez & E. Garcia-Vasquez. 1995. Applications of 5s rDNA in Atlantic salmon, brow trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, 4:275-276.

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.

Peres, W. A. M., P. A. Buckup, D. L. A. Kantek, L. A. C. Bertollo. & O. Moreira-Filho. 2009. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica*, 137:305–311.

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.

Portela-Castro, A. L. B., P. M. Galetti Jr. & L. A. C. Bertollo. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetic*, 11:307–316.

Portela-Castro, A. L. B., H. F. Julio Jr. & P. B. Nishiyama. 2001. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Parana River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica*, 110: 277–283.

Portela-Castro, A. L. B. & H. F. Julio Jr. 2002. Karyotype relationships among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): cytotaxonomy and evolution aspects. *Cytologia*, 67: 329–336.

Venere, P. C., S. C. Pfister, O. Moreira-Filho, & P. M. Galetti Jr. 1997. Chromosomal Characterization in Characinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). *Cytobios*, 92:123–131.

Vicari, M. R., R. B. Noleto, R. F. Artoni, O. Moreira-Filho & L. A. C. Bertollo. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31:173-179.

Vicente, V. E., C. M. Jesus & O. Moreira Filho. 2001. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, *Parodontidae*). *Caryologia*, 54:365-369.

Figura 1

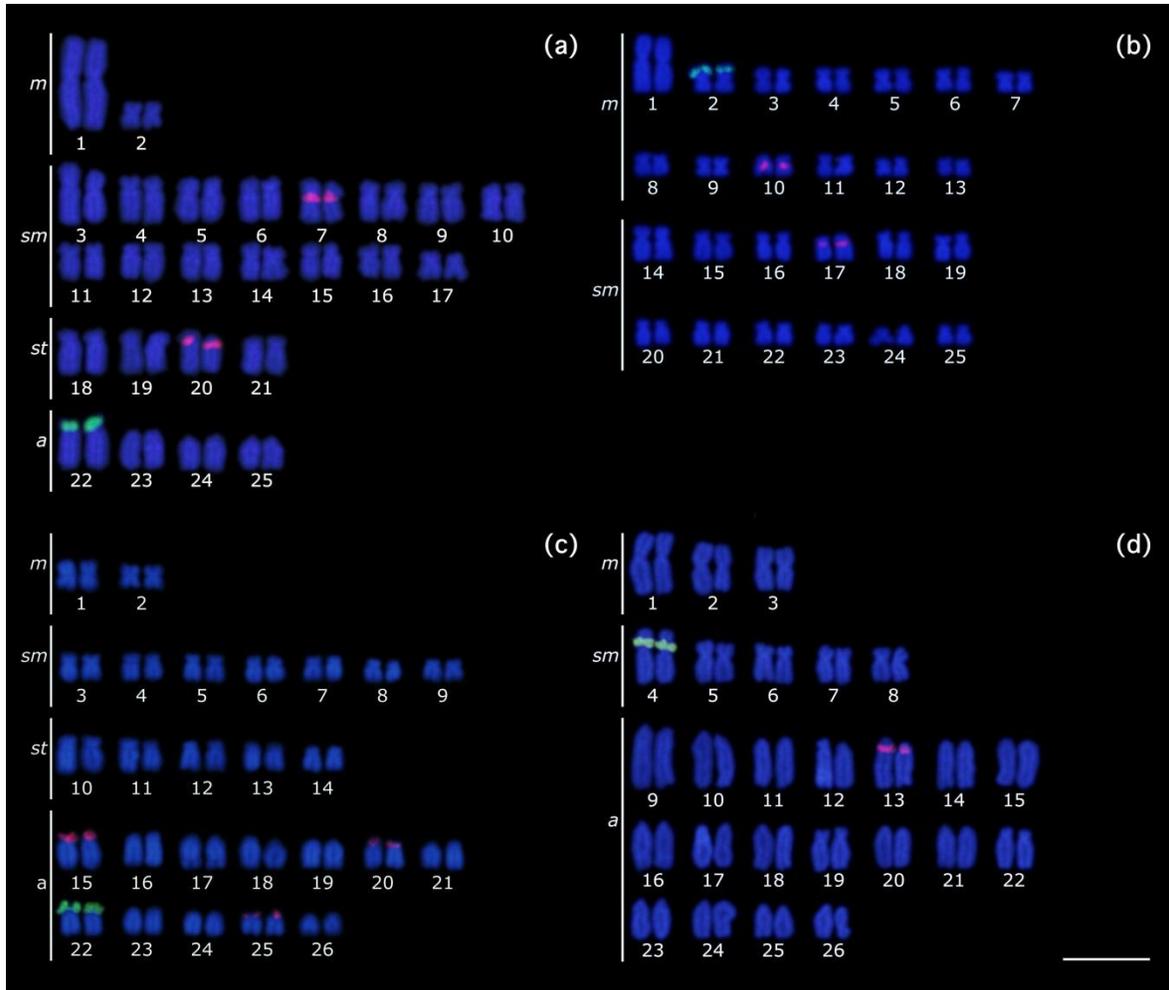


Figura 1. Cariótipos hibridizados com sondas de 5S rDNA (vermelho) e 18S rDNA (verde) de (a) *Astyanax abramis*, (b) *Moenkhausia dichroura*, (c) *Roeboides descalvadensis* e (d) *Tetragonopterus argenteus*. A barra representa 10 μ m.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1- O número diplóide encontrado em *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp. foi 50 cromossomos, além de ter sido verificado nestas espécies o primeiro par cromossômico grande em relação aos demais do complemento, correspondendo a uma característica cariotípica ancestral verificada na maioria das espécies congêneres.

2- Consideradas espécies crípticas, em *A. asuncionensis* e *A. abramis* foram reveladas fórmulas cariotípicas distintas, sendo este um marcador citotaxonômico eficaz na diferenciação das espécies.

3- Apesar do mesmo número diplóide, foi verificado em *Astyanax* sp. fórmula cariotípica distinta de *A. asuncionensis* e *A. abramis*, possivelmente originada a partir de rearranjos cromossômicos como inversões pericêntricas, sugerindo a evidência de uma espécie nova.

4- O baixo número diplóide encontrado em *A. correntinus* com 36 cromossomos com a presença de 8 grandes pares cromossômicos meta-submetacêntricos, originado a partir de fusões, mostra uma característica já observada para outra espécie do gênero (*A. schubarti*), sugerindo proximidade filogenética entre ambas espécies no mesmo grupo morfológico.

5- Foram reveladas RONS simples pela impregnação por prata e confirmadas pela FISH-rDNA 18S nas espécies de *Astyanax* que possuem 50 cromossomos, sendo localizadas no primeiro par de cromossomos acrocêntricos em *A. abramis* e *A. asuncionensis*, e último par em *Astyanax* sp., revelando um estado conservado destes genes em *Astyanax*.

6- Foram reveladas RONS múltiplas pela impregnação por prata e também confirmadas através da FISH-rDNA 18S em *A. correntinus*, evidenciando um estado mais derivado em *Astyanax*.

7- A FISH-rDNA 5S evidenciou cístrons simples apenas em *A. asuncionensis* e múltiplos para *A. abramis* (2 cístrons), *A. correntinus* (5 cístrons) e *Astyanax* sp. (4 cístrons), e apesar

de verificados em posição centromérica para todas as espécies, foi observada variabilidade quanto ao par.

8- Os resultados revelados pela FISH-rDNA 5S contribuem na identificação e diferenciação entre *A. abramis* (cístrons múltiplos) e *A. asuncionensis* (cístrons simples), que somados a fórmula cariotípica evidenciam a importância da citogenética nos estudos taxonômicos e sistemáticos.

9- Apesar de pouca heterocromatina, padrões de distribuição distintos foram observados para todas as espécies de *Astyanax*, com exceção de um par cromossômico acrocêntrico que pode representar homeologia entre *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *Astyanax* sp.

10- O número diplóide verificado em *M. dichroua*, *R. descavadensis* e *T. argenteus* (50, 52 e 52 cromossomos, respectivamente) não diferenciou-se nos já descritos na literatura para cada gênero; contudo, para todas as espécies foram reveladas fórmulas cariotípicas distintas quando comparadas com espécies congêneres, possibilitando o uso desta ferramenta como um marcador espécie-específico.

11- Em *M. dichroua*, as RONS simples determinadas pela impregnação por prata foram confirmadas pela FISH-rDNA 18S, verificando variação interespecífica quando comparado à *M. sanctaefilomenae*.

12- Em *R. descavadensis* e *T. argenteus*, as RONS simples determinadas pela impregnação por prata foram confirmadas pela FISH-rDNA 18S, diferindo apenas quanto à localização do par cromossômico quando comparado as AgRONS das espécies congêneres, além de indicar para ambas as espécies um estado conservado dentro de cada gênero.

13- Os primeiros dados moleculares de FISH-rDNA 5S para *Moenkhausia*, *Roeboides* e *Tetragonopterus*, revelou para *M. dichroua* (4 cístrons), *R. descavadensis* (6 cístrons) e *T. argenteus* (2 cístrons), sendo apresentada diversidade entre os gêneros de Characidae,

tornando necessário mais estudos relacionados aos genes ribossômicos para comparações entre espécies congêneres.