



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAURA LAHR LOURENÇO DA SILVA

**CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE
TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE**

Londrina
2012



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

LAURA LAHR LOURENÇO DA SILVA

**CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE
TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE**

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586c Silva, Laura Lahr Lourenço da.
Citogenética convencional e molecular de três espécies de peixes da família
Characidae / Laura Lahr Lourenço da Silva. – Londrina, 2012.
84 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Peixe – Citogenética – Teses. 2. Characideo – Citogenética – Teses. 3. Biologia
molecular – Teses. 4. Translocação (Genética) – Teses. 5. Polimorfismo – Teses.
I. Dias, Ana Lúcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.312.32:597

LAURA LAHR LOURENÇO DA SILVA

**“CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR DE TRÊS
ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CHARACIDAE”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dra. Sandra Morelli
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof^a Dra. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de dezembro de 2012.

“A Deus, meus avós, minha irmã, Diogo
e a todos que me apoiaram nessa
trajetória!”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela motivação para enfrentar os desafios da vida e por me proporcionar tantas realizações durante a jornada do mestrado.

À minha orientadora prof^a Dra. Ana Lúcia Dias, pela orientação e paciência durante todo esse tempo de parceria, desde a graduação.

Agradeço também às professoras prof^a Dra. Ana Cláudia Swarça e prof^a Dra. Renata da Rosa, pelo apoio e contribuição a esse trabalho em minha banca de qualificação.

Aos membros da banca examinadora prof^a Dra. Sandra Morelli e prof^a Dra. Lucia Giuliano Caetano, por aceitarem compartilhar seu imenso conhecimento na citogenética, enriquecendo este trabalho. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Sueli, secretária da Pós-Graduação da UEL, por ser prestativa e nos auxiliar nas partes burocráticas da Pós.

Aos colegas do laboratório de Citogenética Animal (LACA): Angélica de Paula, Angélica Rossoti, Fábio, Juceli, Larissa Pires, Natália, Tatiane e Vivian, obrigada a todos pelo companheirismo e momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

E por fim e especialmente, à minha família, meus avós Maria e José, minha irmã Carolina e meu companheiro Diogo, por sempre me motivar e acreditar que quando se tem disciplina e persistência os sonhos podem ser realizados.

SILVA, Laura Lahr Lourenço da. **Citogenética Clássica e Molecular de duas Espécies de Peixes da Família Characidae**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A família Characidae compreende 1031 espécies válidas de peixes altamente diversificadas e distribuídas por toda região neotropical. Por possuir gêneros com relações filogenéticas ainda incertas, o grupo Incertae Sedis foi criado para abrigar 620 espécies em 88 gêneros, nos quais se incluem *Astyanax* e *Bryconamericus*. Ambos representam bons modelos de estudos citogenéticos por possuírem grande diversidade cariotípica entre populações e/ou espécies. Assim sendo, o presente estudo realizou uma caracterização citogenética de *A.asuncionensis* do Rio Miranda/MS, *A. altiparanae* do Rio Quexada/PR, Ribeirão Esperança/PR e Rio Jacutinga/PR e *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas/PR, visando melhor compreender a estrutura e evolução cariotípica desses grupos de peixes. Esse é o primeiro estudo citogenético em *A.asuncionensis*, que apresentou $2n=50$, sendo $18m+22sm+6st+4a$ (NF=96) e com RONS terminais no braço curto do par 21 subteloentríco. As três populações de *A.altiparanae* também apresentaram $2n=50$, porém com diferentes fórmulas cariotípicas entre as populações: a do Rio Quexada apresentou $16m+24sm+4st+6a$ (NF=94), enquanto as do Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga apresentaram $16m+20sm+4st+10a$ (NF=90). Essas três populações apresentaram variação interindividual no número e localização das RONS, sendo detectados tanto o padrão de RONS múltiplas como simples. Em *Bryconamericus* aff. *iheringii* diferentes fórmulas cariotípicas foram encontradas evidenciando 6 citótipos: citótipo I apresentou $12m+10sm+16st+14a$ (NF=90), citótipo II $18m+14sm+10st+10a$ (NF=94), citótipo III $20m+18sm+4st+10a$ (NF=94), citótipo IV $20m+14sm+12st+6a$ (NF=98), citótipo V $22m+18sm+8st+4a$ (NF=100) e citótipo VI com $18m+24sm+6st+4a$ (NF=100). O citótipo I foi o único que apresentou, exclusivamente, RONS simples. Os citótipos II e III apresentaram tanto RONS simples quanto múltiplas e os demais apenas o padrão múltiplo. O citótipo I é o que mais difere em relação ao NF e ao padrão das RONS, podendo ser considerado como pertencente a outra espécie do gênero *Bryconamericus*, vivendo em simpatria no Ribeirão Três Bocas. Os demais citótipos podem ter sido gerados por cruzamentos entre eles e por inversões pericêntricas. Após o bandamento C, *Astyanax asuncionensis* e *Bryconamericus* aff. *iheringii* apresentaram heterocromatina pericentromérica, enquanto as três populações de *A.altiparanae* apresentaram heterocromatina pericentromérica e intersticial. Por meio da coloração sequencial com fluorocromos base-específicos, foi possível observar que as RONS são intercaladas à heterocromatina CMA_3^+ nas três espécies, sendo que em *A.asuncionensis* um bloco heterocromático $DAPI^+$ adjacente à RON também foi encontrado. As demais regiões heterocromáticas mostraram-se $DAPI^+$ nas três espécies. As células meióticas dos machos de *A.altiparanae* e *Bryconamericus* aff. *iheringii* também foram analisadas. Essa análise demonstrou que, apesar da alta variabilidade cariotípica, o pareamento cromossômico ocorre normalmente, permitindo a formação de gametas viáveis e a manutenção dessa diversidade nas duas espécies. Os dados mostram que, as espécies de *Astyanax* compartilham algumas características, como número diplóide e RONS simples em *A.asuncionensis* e em alguns indivíduos de *A.altiparanae*, sugerindo uma estreita relação filogenética entre elas. No entanto, a presença de RONS múltiplas em alguns indivíduos de *A.altiparanae* e a distribuição da heterocromatina divergiram entre as duas espécies, indicando um processo natural de especiação. A grande variabilidade encontrada em *Bryconamericus* aff. *iheringii* pode estar relacionada a um alto grau de polimorfismo, no entanto, não é descartada a possibilidade de

ocorrer mais de uma espécie nesta localidade. Os dados confirmaram a grande diversidade genética dos gêneros *Astyanax* e *Bryconamericus* e que, provavelmente, as inversões e/ou translocações são os principais mecanismos envolvidos na evolução cromossômica destes grupos de peixes.

Palavras-chave: *Astyanax*. *Bryconamericus*. Citótipos. Incertae sedis. Inversão pericêntrica. Polimorfismo. Translocação.

SILVA, Laura Lahr Lourenço da. **Citogenética Clássica e Molecular de duas Espécies de Peixes da Família Characidae**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The family Characidae includes 1031 valid species of fishes highly diverse and distributed throughout the Neotropics. Due to genus with phylogenetic relationships still uncertain, Incertae Sedis Group was created to include 620 species in 88 genus, which include *Astyanax* and *Bryconamericus*. Both genus represent a good model for cytogenetic studies, because they have great karyotypic diversity among populations and/or species. Therefore, the present study conducted the cytogenetic characterization of *A.asuncionensis* from Miranda River/MS, *A. altiparanae* from Quexada River/PR, Esperança Stream/PR and Jacutinga River/PR and *Bryconamericus* aff. *iheringii* from Três Bocas Stream/PR, in order to better understand the structure and karyotype evolution of this group of fishes. This is the first cytogenetic study in *A.asuncionensis* that presented $2n=50$, and $18m+22sm+6st+4a$ (NF=96) and terminal NORs on the short arm of the subtelocentric pair 21. The three populations of *A.altiparanae* also presented $2n=50$, but with different karyotypic formulas between populations: those of Quexada River presented $16m+24sm+4st+6a$ (NF=94), while the populations of Esperança Stream and Jacutinga River showed $16m+20sm+4st+10a$ (FN=90). These three populations showed interindividual variation in number and location of NORs, detecting both patterns of multiple and simple NORs. In *Bryconamericus* aff. *iheringii* different karyotypic formulas were found, showing six cytotypes: cytotype I with $12m+10sm+16st+14a$ (FN=90), cytotype II with $18m+14sm+10st+10a$ (FN=94), cytotype III with $20m+18sm+4st+10a$ (NF= 4), cytotype IV with $20m+14sm+12st+6a$ (NF=98), cytotype V with $22m+18sm+8st+4a$ (NF=100) and cytotype VI with $18m+24sm+6st+4a$ (NF=100). Only the cytotype I presented NORs simple, exclusively. The cytotypes II and III showed both simple and multiple NORs, while the others have presented just multiple RONS. The cytotype that most differ in relation to the NF and the pattern of NORs, can be considered as belonging to another species of the genus *Bryconamericus*, living in sympatry in Três Bocas Stream. The other cytotypes may have been generated by interbreeding between them and pericentric inversions. After C-banding, both *Bryconamericus* aff. *iheringii* as *Astyanax asuncionensis* presented pericentromeric heterochromatin, while the three populations of *A.altiparanae* showed pericentromeric and interstitial heterochromatin. Through sequential staining with base-specific fluorochromes was observed that the NORs are interspersed with the heterochromatin CMA_3^+ in all three species, and in *A.asuncionensis* a block heterochromatic $DAPI^+$ adjacent to NOR was also found. The other heterochromatic regions were $DAPI^+$ in all three species. Meiotic cells of male *A.altiparanae* and *Bryconamericus* aff. *iheringii* were also analyzed. This analysis showed that, despite the high variability karyotype, chromosome pairing occurs normally, allowing the formation of viable gametes and maintaining this diversity in both species. The data show that species of *Astyanax* share some characteristics, such as diploid number in both species and simple NORs in *A.asuncionensis* and some individuals of *A.altiparanae*, suggesting a close phylogenetic relationship between those. However, the presence of multiple NORs in some individuals of *A.altiparanae* and the heterochromatin distribution differed between the two species, indicating a natural process of speciation. The great variability found in *Bryconamericus* aff. *iheringii* may be related to a high degree of polymorphism, however, the possibility of occurrence of more than one species in this locality is not ruled out. These data confirm the high genetic diversity of *Astyanax* and *Bryconamericus* and that inversions and/or translocations are, probably, the main mechanisms involved in chromosomal evolution of these groups of fishes.

Keywords: *Astyanax*. *Bryconamericus*. Cytotypes. Incertae sedis. Pericentric inversion. Polymorphism. Translocation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa do Brasil destacando os locais de coleta nas bacias do Rio Paraguai e Paraná. Os exemplares de cada espécie estão demonstrados da esquerda para a direita: *Bryconamericus* aff. *iheringii*, *A.altiparanae* e *A.asuncionensis* 33

CAPÍTULO I: Diferenciação e similaridade cromossômica de duas espécies de peixes do “Complexo bimaculatus”

- Figura 1** - Locais de coleta e espécies analisadas. Os exemplares de *A.asuncionensis* e *A.altiparanae* estão demonstrados à direita e à esquerda, respectivamente 44
- Figura 2** - Cariogramas de: *Astyanax asuncionensis* do Rio Miranda (a), *A.altiparanae* do Rio Quexada (b), do Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga (c)..... 45
- Figura 3** - Cromossomos de *A.asuncionensis* e *A.altiparanae* submetidos ao tratamento com nitrato de prata, hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S e fluorocromo cromomicina A₃..... 45
- Figura 4** - Metáfases somáticas de *A. asuncionensis* e *A.altiparanae* submetidas ao bandamento C. Coloração sequencial com Giemsa, CMA₃ e DAPI 45
- Figura 5** - Fases meióticas em *Astyanax altiparanae* do Rio Quexada, Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga. Espermatogonial (a), Paquíteno inicial (b), Paquíteno mediano (c), Paquíteno final (d), Metáfase I (e) e Metáfase II (f) 46

CAPÍTULO II: Diversidade cariotípica em uma população de *Bryconamericus* aff. *iheringii*

- Figura 1** - Mapa do Brasil destacando o local de coleta no Ribeirão Três Bocas, pertencente à bacia do Paranapanema, estado do Paraná 63
- Figura 2** - Citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas: CitI (a), CitII (b), CitIII (c), CitIV (d), CitV (e), CitVI (f) 64
- Figura 3** - Cromossomos de *Bryconamericus* aff. *iheringii* submetidos à impregnação pelo nitrato de prata, fluorocromo CMA₃ e hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S nos diferentes citótipos 65

Figura 4 -	Metáfases somáticas dos citótipos I, II e III de <i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> submetidas ao bandamento C, com coloração por Giemsa, CMA ₃ e DAPI.....	66
Figura 5 -	Metáfases somáticas dos citótipos IV, V e VI de <i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> submetidas ao bandamento C, com coloração sequencial por Giemsa, CMA ₃ e DAPI	67
Figura 6 -	Fases meióticas de células gonadais de machos de <i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> do Ribeirão Três Bocas: Espermatogonial (a), Zigóteno (b), Paquíteno inicial (c), Paquíteno mediano (d), Paquíteno final (e), Diplóteno (f), Diacinese (g), Metáfase I (h), Metáfase II (i).....	68
Figura 7 -	Esquema representativo para a possível origem dos citótipos III e V de <i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> do Ribeirão Três Bocas, através de cruzamentos entre os citótipos IV x VI e III x VI, respectivamente	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Astyanax* 19

Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Bryconamericus*..... 28

CAPÍTULO I: Diferenciação e similaridade cromossômica de duas espécies de peixes do “Complexo bimaculatus”

Tabela 1 - Resumo dos dados de AgRONS e FISH com sonda de DNAr 18S em *Astyanax altiparanae*, mostrando a variação interindividual e o número de tipos de cromossomos nucleolares em cada população..... 38

Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do Complexo bimaculatus..... 48

CAPÍTULO II: Diversidade cariotípica em uma população de *Bryconamericus aff. iheringii*

Tabela 1 - Citótipos de *Bryconamericus aff. iheringii* do Ribeirão Três Bocas..... 57

Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Bryconamericus*..... 69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA CHARACIDAE	13
1.2	CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS DO GÊNERO ASTYANAX.....	14
1.3	CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS DO GÊNERO BRYCONAMERICUS.....	25
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS	32
3.1	STYANAX ASUNCIONENSIS	32
3.2	STYANAX ALTIPARANAE	32
3.3	RYCONAMERICUS AFF. IHERINGII	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CAPÍTULO I: Diferenciação e similaridade cromossômica de duas espécies de peixes do “Complexo bimaculatus” altiparanae.....		35
Introdução		35
Material e Métodos		36
Resultados		37
Discussão		39
Anexos		44
REFERÊNCIAS		50
CAPÍTULO II: Diversidade cariotípica em uma população de Bryconamericus aff. iheringii		54
Introdução		55
Material e Métodos		56
Resultados		57
Discussão		59

Anexos	63
REFERÊNCIAS	71
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA FAMÍLIA CHARACIDAE

A ordem Characiformes é um grande e diversificado grupo de peixes de água doce com muitos gêneros e espécies, a maioria encontrada na América do Sul, América Central e África, pertencentes à enorme e amplamente distribuída superordem Ostariophysi. Este grupo é caracterizado por possuir aparelho de Weber, que transmite ondas sonoras recebidas pela bexiga natatória ao ouvido interno, onde elas são transformadas em impulsos elétricos enviados ao cérebro (Menezes *et al.*, 2007).

A família Characidae pertence à ordem Characiformes e inclui espécies que apresentam grande variação de tamanho, hábitos alimentares, estratégias reprodutivas, padrões comportamentais, preferências de habitats, padrões de colorido e variações osteológicas, anatômicas e morfológicas, o que a caracteriza como a família mais heterogênea dentro de peixes neotropicais (Graça & Pavanelli, 2007). Os caracídeos apresentam, como características distintivas, o corpo coberto por escamas, nadadeiras pélvicas geralmente situadas bem atrás da inserção das nadadeiras peitorais, raios das nadadeiras moles e, em muitos casos, presença de uma nadadeira adiposa (Britski *et al.*, 1999).

Segundo Eschmeyer (2012), a família Characidae apresenta 1031 espécies válidas com características altamente heterogêneas, motivo pelo qual são agrupadas em subfamílias. São reconhecidas somente as subfamílias nas quais existe evidência de monofiletismo, deixando uma grande parcela de caracídeos listados como Incertae Sedis. De acordo com Lima *et al.* (2003), constituem um grupo altamente heterogêneo de peixes de pequeno a grande porte com 620 espécies distribuídas em 88 gêneros, incluindo *Hyphessobrycon* Durbin, em Eigenmann, 1908 (97 espécies), *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (86 espécies), *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (58 espécies), *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (56 espécies), *Hemigrammus* Gill, 1858 (43 espécies) e outros. Muitos destes gêneros foram incluídos na subfamília Tetragonopterinae, entretanto, por falta de evidências de que essa subfamília constitua um grupo monofilético, essa classificação não pode ser adotada. Considerando a alta diversidade desta família e as relações filogenéticas ainda incertas, a citogenética torna-se uma interessante ferramenta para subsidiar os estudos evolutivos e taxonômicos neste grupo de peixes.

1.2 CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS DO GÊNERO *ASTYANAX* BAIRD & GIRARD 1854

O gênero *Astyanax* apresenta 149 espécies (Eschmeyer, 2012) amplamente distribuídas pelas bacias neotropicais e, segundo Britski *et al.* (2007), caracteriza-se por apresentar duas séries de dentes no pré-maxilar, a interna com 5 dentes e a externa com número variável, linha lateral completa e nadadeira caudal nua, coberta com escamas apenas na base. A ampla distribuição geográfica desse gênero, juntamente com sua diversidade morfológica, são fatores que dificultam a determinação das relações filogenéticas entre as espécies. Assim, a falta de caracteres morfológicos que assegurem o monofiletismo de *Astyanax* contribui para a ocorrência de complexos de espécies (Bertaco & Garutti, 2007). Segundo Nelson *et al.* (1999), um complexo de espécies ocorre quando duas ou mais espécies são colocadas sob uma mesma nomenclatura, devido à falta de características morfológicas ou quando a caracterização morfológica é incipiente para diferenciá-las.

Garutti (1995) sugeriu o complexo *Astyanax bimaculatus* para agrupar um conjunto de espécies e subespécies descritas e não descritas das bacias do Rios Paraná, São Francisco e Amazonas. Este grupo compartilha as seguintes características: uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons na região umeral e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até os raios caudais medianos. O complexo inclui: *A.abramis* Jenyns, 1842; *A.orthodus* Eigenmann, 1907; *A.goyacensis* Eigenmann, 1908; *A.janeiroensis* Eigenmann, 1908; *A.paraguayensis* Fowler, 1918; *A.superbus* Myers, 1942; *A.saltor* Travassos, 1960; *A.validus* Géry, Planquette & Le Bail, 1991; *A.maculisquamis* Garutti & Britski, 1997; *A.argyrimarginatus* Garutti, 1999; *A.rupununi* Fowler, 1914; *A.novae* Eigenmann, 1911; *A.jacuhiensis* Cope, 1894; *A.unitaenitatus* Garutti, 1998; *A.clavitaeniatus* Garutti, 2003; *A.siape* Garutti, 2003; *A.utiariti* Bertaco & Garutti, 2007; *A.incaius* Tortonese, 1942 (Garutti, 1999; 2003; Garutti & Britski, 2000; Bertaco & Garutti, 2007; Garutti & Langeani, 2009).

Garutti & Britski (2000) verificaram que a denominação *Astyanax bimaculatus* correspondia somente àquelas populações do Suriname e descreveram uma nova espécie que, anteriormente, pertencia ao complexo *bimaculatus*: *A. altiparanae* da bacia do Alto Paraná (Garutti & Britski, 2000). Além disso, segundo Lima *et al.* (2003), as espécies das bacias do Baixo Paraná e Paraguai e do Rio São Francisco, previamente identificadas como *A.bimaculatus*, atualmente são chamadas de *A.asuncionensis* Géry, 1972 e *A.lacustris* Lutken, 1875, respectivamente. No entanto, há controvérsias em relação à validade desta

última espécie devido à sobreposição de características com *A. altiparanae*. Peres *et al.* (2012) analisaram espécimes do complexo *bimaculatus* das bacias do Alto Paraná e São Francisco e de um canal de ligação entre essas duas bacias, o Rio Piumhi. Para esses autores, *A. altiparanae* e *A. lacustris* fazem parte da mesma unidade taxonômica, uma vez que observaram evidências de cruzamentos entre essas espécies na zona híbrida.

As espécies de *Astyanax* têm recebido atenção especial devido à grande variação das suas características morfológicas e citogenéticas, entre diferentes populações e/ou espécies (Kantek *et al.*, 2007). Neste gênero, o número diplóide igual a 50 é comum, podendo ser considerado uma plesiomorfia para suas espécies. Isso se torna relevante para a separação das espécies em grupos mais primitivos, aqueles que mantêm esse número diplóide, e grupos mais derivados, que apresentam número diplóide diferente (Domingues *et al.*, 2007). Na tabela 1 estão listados estudos citogenéticos nas espécies do gênero *Astyanax*, cujo número diplóide varia de $2n=36$ (em *A. schubarti* Britski, 1964 analisado por Morelli *et al.*, 1983a) a $2n=50$, sendo este o número modal.

Em algumas espécies de *Astyanax*, além dos cromossomos que compõem o cariótipo normal, são observados cromossomos extras, geralmente pequenos e heterocromáticos, chamados cromossomos B, supranumerários ou acessórios. Nas espécies em que eles ocorrem, o número cromossômico é muito variável entre os indivíduos, devido ao comportamento meiótico irregular, migração preferencial para um dos pólos, retardo anafásico ou, raramente, por pareamento com cromossomos A (Guerra, 1988). Esses cromossomos já foram documentados para algumas espécies do gênero, como *A. bockmanni* Vari & Castro, 2007 (Torres-Mariano & Morelli, 2008) *A. scabripinnis* Jenyns, 1842 (Fauaz *et al.*, 1994; Fernandes & Martins-Santos, 2005), *A. altiparanae* (Hashimoto *et al.*, 2008) e *A. mexicanus* De Filippi, 1853 (Kavalco & Almeida-Toledo, 2007). Na população de *Astyanax* aff. *fasciatus* do rio Cará-Cará analisada por Artoni *et al.* (2006), um espécime apresentou $2n=49$ cromossomos sendo $7m+18sm+14st+10a$, sugerindo que esse espécime pode ser o resultado de uma rara hibridação entre as fórmulas cariotípicas A ($2n=48$) e B ($2n=50$) também encontradas nessa população ou ainda, menos provável, um caso de cromossomo extranumerário.

Também já foram documentados indivíduos que apresentam conjuntos haplóides inteiros acima do nível diplóide, os chamados poliplóides, os quais podem se originar de um erro meiótico (não redução cromossômica) ou de uma endomitose de uma célula precursora da meiose. Em ambos os casos, formarão um gameta $2n$ que poderá ser

fecundado por um gameta normal n , dando origem a um indivíduo triploide. Esses indivíduos, provavelmente, são estéreis, devido ao pareamento anormal na meiose (Guerra, 1988). A ocorrência de triploides já foi documentada em algumas espécies de *Astyanax*, como *A. bockmanni* Vari & Castro, 2007 (Fauaz *et al.*, 1994), *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Malacrida *et al.*, 2003), *Astyanax* sp. *D* (Kantek *et al.*, 2007), *A. fasciatus* Cuvier, 1819 (Peres *et al.*, 2009) (tabela 1).

Para melhor caracterizar o cariótipo de uma espécie, uma das técnicas mais utilizadas é a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs). A impregnação por nitrato de prata é uma metodologia frequentemente utilizada para localizar essas regiões devido a sua eficácia e fácil execução. No entanto, o nitrato de prata identifica as proteínas nucleolares e não o sítio de DNAr diretamente, identificando regiões que tiveram atividade transcricional na intérfase anterior.

O padrão de AgRONs múltiplas, ou seja, a presença de mais de um par cromossômico portador da RON, é mais comum dentro do gênero sendo observada em *A. bockmanni* (Kavalco *et al.*, 2009a), *A. mexicanus* (Kavalco & Almeida-Toledo, 2007), *A. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Affonso *et al.*, 2007; Pamponet *et al.*, 2008), *A. scabripinnis* (Vicari *et al.*, 2008a), *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2006a; Ferreira Neto *et al.*, 2009), *A. schubarti* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002) entre outras listadas na tabela 1. No entanto, AgRONs simples já foram observadas para outras populações de *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007), *A. lacustris* Lutken, 1875 (Peres *et al.*, 2008), *A. fasciatus* (Medrado *et al.*, 2008; Peres *et al.*, 2009) e *A. jacuhiensis* Cope, 1894 (Pacheco *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

O DNA ribossomal nos eucariotos superiores está organizado em duas classes de genes repetitivos: a classe maior (DNAr 45S), que compreende os RNAr 18S, 5.8S e 28S e está associado ao nucléolo, e a classe menor (DNAr 5S), representada por RNAr 5S que não está relacionada a estas regiões. Sendo assim, a hibridação fluorescente in situ (FISH) com sondas de DNAr 45S, 28S ou 18S tem sido amplamente utilizada para detectar o número e a localização exata dos cístrons de DNAr em várias espécies de *Astyanax*, confirmando o padrão de RONs múltiplas em *A. scabripinnis*, *A. schubarti*, *A. lacustris*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni* e *A. altiparanae* e detectando o padrão de RONs simples em *A. jacuhiensis* e outras populações de *A. altiparanae* (tabela 1). A identificação de 3 sítios de DNAr 45S foi documentada por Rosa *et al.* (2009) em *Astyanax laticeps* Cope, 1894 do rio Forquetinha/RS,

podendo indicar a deleção da RON em um dos homólogos de um par cromossômico ou a transposição entre os homólogos desse par, visto que o sinal é consideravelmente conspícuo.

Dentro do gênero é comum a associação entre as RONs e as regiões ricas em pares de bases CG, demonstradas por meio de fluorocromos base específicos cromomicina A₃ (CMA₃) ou mitramicina (MM), ao mesmo tempo em que essas mesmas regiões demonstram-se pobres em pares de bases AT, indicadas pelo 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Essa relação já foi documentada para *A. scabripinnis* (Fernandes & Martins-Santos, 2005; Vicari *et al.*, 2008a), *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues *et al.*, 2007), *A. laticeps* (Rosa *et al.*, 2009) e *A. jacuhiensis* (Pacheco *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012), indicando que os cístrons de RONs estão intercalados a regiões do DNA que são repetitivas e ricas em pares de base GC.

Um tipo de DNA repetitivo amplamente utilizado na citogenética e que tem sido tema de inúmeros estudos é a heterocromatina. Sabe-se que essa região apresenta replicação tardia, no final da fase S e que não possui atividade gênica. No entanto, em relação a essa última característica, ainda há muita controvérsia, visto que pesquisas em *Drosophila* revelaram a existência de atividade gênica nas regiões heterocromáticas, incluindo um importante papel na regulação da transcrição (Kasahara, 2009). Essa região é um importante marcador citogenético na caracterização e diferenciação de espécies e/ou populações e a técnica de bandamento C identifica, de forma precisa e rápida, as regiões heterocromáticas.

No gênero *Astyanax*, a distribuição da heterocromatina é bem variável, podendo ser encontrada em regiões pericentroméricas/intersticiais em *A. altiparanae* (Pacheco *et al.*, 2001; Domingues *et al.*, 2007) e *A. jacuhiensis* (Pacheco *et al.*, 2010); em regiões pericentroméricas/terminais em *A. scabripinnis* (Maistro *et al.*, 2000), *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2008a) e *A. altiparanae* (Ferreira Neto *et al.*, 2009); em regiões terminais/intersticiais em diferentes populações de *Astyanax* sp. D (Kantek *et al.*, 2008a) ou ainda em regiões pericentroméricas/terminais/intersticiais, como em *A. janeiroensis* Eigenmann, 1908 (Vicari *et al.*, 2008b) (tabela 1). Existem espécies com quantidade de heterocromatina reduzida como algumas populações de *A. altiparanae*, até espécies com grandes blocos heterocromáticos como *Astyanax* sp. D, *A. scabripinnis*, *A. fasciatus* e *A. janeiroensis* (tabela 1).

O padrão de distribuição da heterocromatina foi utilizado por Artoni *et al.* (2006) para diferenciar as fórmulas cariotípicas B e C de *Astyanax* aff. *fasciatus* coletados na Lagoa Dourada, rio Tibagi e rio Cará-Cará. As três populações apresentavam a fórmula

cariotípica A com $2n=48$ cromossomos distribuídos em $6m+18sm+14st+10a$ (NF=86) e fórmulas B e C com $2n=50$ sendo $8m+18sm+14st+10a$ (NF=90). Enquanto o citótipo B apresentou blocos heterocromáticos conspícuos nas regiões terminais dos braços longos de cromossomos acrocêntricos, o citótipo C apresentou poucos cromossomos com heterocromatina intersticial.

Em *A. scabripinnis* do córrego Tatupeba analisada por Fernandes & Martins-Santos (2005) foram observadas diferenças na distribuição heterocromática dentro da fórmula cariotípica I. Nos machos foram observados blocos terminais na maioria dos cromossomos e fracas marcações pericentroméricas em alguns; nas fêmeas com $2n=50$ cromossomos, a heterocromatina mostrou-se fortemente corada nas regiões pericentroméricas em todos os cromossomos e um heteromorfismo de tamanho foi visualizado no par 18 (acrocêntrico). Já as fêmeas com $2n=51$ cromossomos, a heterocromatina distribuiu-se nas regiões pericentroméricas em quase todos os cromossomos, apresentando o macrocromossomo B totalmente heterocromático.

Sabendo-se que as características morfológicas tradicionalmente utilizadas na taxonomia de *Astyanax* não são suficientes para distinguir morfotipos do grupo *altiparanae/asuncionensis* (Prioli *et al.*, 2012), a citogenética torna-se uma importante ferramenta para a distinção das espécies, além de fornecer dados para uma melhor compreensão das relações filogenéticas dentro do grupo. A tabela abaixo relaciona dados citogenéticos no gênero *Astyanax*, obtidos até o momento, sendo o gênero mais estudado dentro da família Characidae e os resultados demonstram uma grande variabilidade cariotípica neste grupo de peixes.

Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Astyanax*. 2n = número diplóide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloentríco, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérica, c.= centromérica, i.= intersticial, subter.= subterminal, bitel. = bitelomérica, p = braço curto, q = braço longo, BC = bandamento C, bl = blocos heterocromáticos, RF= referência.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Número de AgRONS	Nº de cístrons DNAr 18S, 28S ou 45S	BC	RF
<i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski 2000	Rio Meia Ponte/GO	50	26sm+24a	76	-	-	-	1
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	10m+24sm+4st+12a	88	-	-	-	2
	Rio Claro/PR	50	10m+26sm+4st+10a	90	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Claro/PR	50	10m+24sm+4st+12a	88	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Claro/PR	50	10m+22sm+4st+14a	86	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Paranapanema/SP	50	10m+22sm+6st+12a	88	-	-	-	4
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	32m/sm+18st/a	82	2-3 (t. p a; q sm)	4 (t. p a; p. m)	-	5
	Rio dos Índios/PR	50	6m+30sm+4st+10a	90	10 (t. p m,sm,st; q sm)	-	c., i.	6
	Rio Paraná/PR	50	6m+26sm+6st+12a	88	2 (t. p a)	4 (t.)	c., i.	6; 7
	Ribeirão Tatupeba/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	4 (t.)	-	7
	Ribeirão Keçaba/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	7 (t.)	-	7
	Ribeirão Maringá/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	4 (t.)	-	7
	Rio Tibagi/PR	50	6m+28sm+8st+8a	92	4 (t. p sm, st; q sm)	7 (t.)	c., i., p	8
	Rio Iguaçu/PR	50	6m+30sm+8st+6a	94	2 (t. p st)	2 (t. p sm)	c., i.	8
	Rio Campo Novo/SP	50	12m+18sm+12st+8a	92	-	-	c., pc., i., p	9
	Ribeirão Monjolinho/SP	50	8m+20sm+12st+10a	90	2 (t. p st)	2 (t. p st)	-	10
	Ribeirão Pântano/SP	50	6m+28sm+4st+12a	88	2 (t.)	2 (t.)	c., pc., t.	11
	Ribeirão Feijão/SP	50	6m+30sm+8st+6a	94	4 (t.)	4 (t.)	c., pc., t.	11
	Rio Jordão/PR	50	6m+28sm+8st+8a	92	6 (t.)	6 (t.)	c., pc., t.	11
	Rio Tietê/SP	50	8m+20sm+10st+12a	88	2 (t. p ou q st/a)	3	t., i.	12
	Rio Paranapanema/SP	50	8m+22sm+14st+6a	94	2 (t. p ou q st/a)	4	t., i.	12
	Rio Água dos Patos/SP	50	8m+24sm+6st+12a	88	2-4 (t. p st)	4 (t. p st)	-	13
	Lago Igapó/PR	50	8m+ 28sm+4st+10a	90	1-3 (t. p st, q sm)	2 (t. p st)	-	13
Rio Tietê/SP	50	6m+12sm+20st+12a	88	2 (t.p st)	-	-	14	
Rio Mogi-Guaçu/SP	50	6m+12sm+20st+12a	88	2 (t.p st)	-	-	14	
Rio Grande/MG	50	8m+32sm+2st+8a	92	2 (p.t st)	2 (p.t st)	-	74	
<i>Astyanax bockmanni</i> Vari & Castro 2007	Rio Grande/MG	50	6m+20sm+8st+16a	76	-	-	c., t.	15
	Rio Grande/MG	75	(3x) 9m+30sm+12st+24a	114	-	-	c., t.	15

	Rio Paranapanema/SP	50	10m+12sm+12st+16a	84	1-4 (t. p st/a, sm)	8 (t. p sm, st; q st; p. a)	p., t.	16
	Ribeirão Caetano/MG	48	14m+18sm+10st+6a	90	6 (t. p m, sm, a)	-	c., t., p	20
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	10m+24sm+4st+12a	88	-	-	-	2
Linnaeus 1758	Rio Paraná/Argentina	50	10m+18sm+12st+10a	90	1-6 (t. p st/a, bitel.)	-	c., t., p	17
	Rio Aguapey/Argentina	50	10m+18sm+12st+10a	90	1-6 (t. p st/a, bitel.)	-	c., t., p	17
	Rio Paraná/Argentina	50	6m+24sm+12st+8a	92	4 (t. p st, sm; q a)	-	-	76
<i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	Rio Preto do Costa/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t.)	-	-	18
	Rio Oricó/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t.)	-	-	18
	Rio Contas/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t. p sm/st)	-	-	18; 19
	Ribeirão Mineiro/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t. p sm/st)	-	-	19
	Rio Ribeira de Iguape/SP	50	8m+24sm+12st+6a	94	2	3	pc.	12
	Rio Guapimirim/RJ	50	8m+24sm+12st+6a	94	2	2	pc.	12
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	Saco da Alemoa/RS	48	10m+16sm+10st+12a	84	3 (t. p st)	3-4 (t. p st, q m)	pc.	21
Cope 1894								
<i>Astyanax fasciatus</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	46	14m+20sm+10st+2a	90	-	-	-	3
Cuvier 1819	Rio Juquiá/SP	48	10m+24sm+12st+2a	94	-	-	-	2
	Rio Mogi-Guaçu/SP	46	12m+20sm+10st+4a	88	-	-	pc., t.	4
	Rio São Francisco/MG	46	6m+24sm+8st+8a	84	-	-	pc.	22
	Rio Mogi-Guaçu/SP	46	32m/sm+14st/a	78	2 (t. p sm)	6 (t. p sm; p. m, a)	-	5
	Córrego Paiol Grande/SP	48	8m+22sm+12st+6a	90	2 (t. p sm)	-	pc., t.	23
	Rio Piracicaba/SP	46	12m+20sm+10st+4a	88	-	-	bl., pc., t.	24
	Rio Araguari/MG	46	14m+16sm+10st+6a	86	4 (t. p m, sm)	-	-	25
	Rio Paranapanema/SP	46	12m+20sm+10st+4a	88	4 (t. q sm)	4 (t. q sm)	t.	26
	Rio Mogi-Guaçu (Araras/SP)	48	8m+22sm+12st+6a	90	2 (t. q a)	6 (t. p sm, q sm)	t.	26
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	45	12m+20sm+10st+3a	87	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	46	12m+20sm+10st+4a	88	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	47	12m+19sm+10st+6a	94	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	47	12m+21sm+10st+4a	90	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	47	12m+20sm+10st+5a	89	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga/SP)	48	8m+22sm+12st+6a	90	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Ouro Fino/MG)	47	12m+20sm+10st+5a	89	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Ouro	48	8m+22sm+12st+6a	90	-	-	bl., c., t.	27

	Fino/MG)							
	Rio Mogi-Guaçu (Barrinha/SP)	46	12m+20sm+10st+4a	88	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Mogi-Guaçu (Barrinha/SP)	48	8m+22sm+12st+6a	90	-	-	bl., c., t.	27
	Rio Contas/BA	48	8m++24sm+12st+4a	92	4 (t. p sm, m; q st)	-	-	28
	Rio Preto do Costa/BA	48	8m+24sm+10st+6a	90	2 (t. q st)	-	-	28
	Ribeirão Mineiro/BA	48	8m+18sm+16st+6a	90	2 (t. q st)	-	-	28
	Ribeirão das Araras/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	-	-	-	29
	Ribeirão dos Patos/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	-	-	-	29
	Rio Piumhi/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	5 (t. p sm, st; q m)	6 (t. p sm, sm/st; q sm)	pc., t.	29
	Rio Piumhi/MG	72	(3x)12m+30sm+24st+6a	138	-	-	-	29
	Ribeirão das Almas/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	-	-	-	29
	Rio São Francisco/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	2 (t. q sm)	2 (t. q sm)	pc., t.	30
	Ribeirão Três Bueiros/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	-	-	-	30
	Rio Grande/MG	48	8m+20sm+16st+4a	92	2 (t. p sm)	4 (bitel. sm; q sm/st)	pc., t.	29
<i>Astyanax aff. fasciatus</i>	Furna 2/PR	48	6m+18sm+14st+10a	86	-	-	t.	30; 31
	Lagoa Dourada/PR	50	8m+18sm+14st+10a	90	-	-	bl., t. ou i.	31
	Lagoa Dourada/PR	48	6m+18sm+14st+10a	86	-	-	bl., t.	31
	rio Tibagi/PR	50	8m+18sm+14st+10a	86	-	-	bl., t. ou i.	31
	rio Tibagi/PR	48	6m+18sm+14st+10a	90	-	-	bl., t.	31
	rio Cará-Cará/PR	50	8m+18sm+14st+10a	86	-	-	bl., t.	31
	rio Cará-Cará/PR	48	6m+18sm+14st+10a	90	-	-	bl., t.	31
	rio Cará-Cará/PR	49	7m+18sm+14st+10a	88	-	-	bl., t.	31
<i>Astyanax giton</i>	Rio Piraitinga/SP	50	6m+8sm+8st+28a	72	6	10	-	32
Eigenmann 1908	Córrego Jacuí/SP	50	6m+8sm+8st+28a	72	6	10	-	32
<i>Astyanax hastatus</i>	Ypiranga/RJ	50	4m+8sm+10st+28a	72	3 (t. p a)	6 (t. p a)	pc.	33
Myers 1928	Santana de Japuíba/RJ	50	8m+10sm+14st+18a	82	3 (t. p a)	6 (t. p a; bitel. a)	pc.	33
	Rio Macacu/RJ	50	6m+8sm+4st+32a	68	1-8 (t. p st/a)	6 (t. p a, sm)	pc.	33
	Cachoeiras de Macacu/RJ	50	6m+8sm+4st+32a	68	1-8 (t. p st/a)	6 (t. p a, sm)	pc.	33
<i>Astyanax intermedius</i>	Rio Piraitinga/SP	50	6m+8sm+4st+32a	68	6 (t. p a, q a)	12	-	32
Eigenmann 1908								
<i>Astyanax jacuhiensis</i>	Lagoa Guaíba/RS	50	8m+30sm+4st+8a	92	2-4 (t. p sm, st; q m)	2 (t. p sm)	pc., t., i.	34
Cope 1894	Rio Maquiné	50	10m+26sm+6st+8a	92	2 (t. p a)	2 (t. p a)	pc., t	73
	Lagoa dos Quadros	50	12m+20sm+6st+12a	88	2 (t. p a)	2 (t. p a)	pc., t	73
<i>Astyanax janeiroensis</i>	Rio Betari/SP	50	6m+14sm+14st+16a	84	6 (t. p sm, st, q st)	-	pc., t., i.	35
Eigenmann 1908	Rio Sacovão/PR	50	6m+14sm+14st+16a	84	3-7	22 (t. p ou q; bitel.)	bl., c., t., i.	36
	Rio Açungui/PR	50	6m+14sm+14st+16a	84	3-7	22 (t. p ou q; bitel.)	bl., c., t., i.	36
<i>Astyanax laticeps</i>	Rio Forquetinha/RS	50	6m+16sm+16st+12a	88	3 (t. p st)	3 (t. p st)	c., t.	37

Cope 1894

<i>Astyanax lacustris</i>	Rio São Francisco/MG	50	32m/sm+18st/a	82	2 (t. p a)	4 (t. p a; p. m)	-	5
Lutken 1875	Rio São Francisco/MG	50	8m+20sm+16st+6a	94	2 (t. p st)	2 (t. p st)	-	10
	Rio São Francisco/MG	50	8m+34sm+2st+6a	94	2 (t.p st)	2 (t.p st)	-	74
<i>Astyanax mexicanus</i>	Indeterminado	50	40m/sm+10st/a	90	-	-	-	38
De Filippi 1853	Comércio – aquário	50	8m+18sm+12st+12a	88	2 (t. p a)	8 (t. p sm, st, a)	pc., c.	39
<i>Astyanax ribeirae</i>	Rio Ribeira de Iguape/SP	50	4m+10sm+6st+30a	70	2 (t. p a)	4 (t. p a)	pc.	40
Eigenmann 1911								
<i>Astyanax parahybae</i>	Rio Paraibuna	48	8m+18sm+12st+10a	86	1-6	-	pc., t.	23
Eigenmann 1908	Rio Piraitinga/SP	48	8m+18sm+12st+10a	96	4 (t. p m, q a)	8	-	32
<i>Astyanax scabripinnis</i>	Córrego das Pedras/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	c., p	15; 41; 42
Jenyns 1842	Rio Claro/SP	50	6m+24sm+8st+12a	88	-	-	pc., t.	43
	Córrego Monjolinho/SP	50	6m+24sm+8st+12a	88	-	-	pc., t.	43
	Córrego Barreiro Grande/MG	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	-	pc., t.	43
	Córrego Viveiro de Mudanças/MG	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	-	pc., t.	43
	Córrego Curral das Éguas/MG	46	6m+22sm+8st+10a	82	-	-	pc., t.	43
	Córrego Centenário/PR	50	6m+20sm+8st+16a	84	1-4 (t. p m, sm, st)	-	pc., t.	43; 44
	Córrego Marrecas/PR	48	6m+20sm+12st+10a	86	1-5 (t. p ou q m, sm, st)	-	pc., t., i.	43; 44
	Rio Jucu/ES	50	6m+8sm+36a	64	1-15	-	pc., t.	45
	Córrego Pedras/SP	75	(3x) 9m+33sm+15st+18a	132	-	-	c., p	15
	Rio Araquá/SP	75	(3x)6m+30sm+6st+18a	132	-	-	-	46
	Córrego Canta-Galo/SP	50	4m+26sm+4st+16a	84	-	-	-	47
	Rio Piracuama/SP	50	4m+10sm+6st+30a	70	5-11 (t. p st/a)	-	pc., t.	47
	Rio Piracuama/SP	50	6m+24sm+6st+14a	86	4 (t. p st)	-	pc., t., p	47
	Ribeirão das Perdizes/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	pc., t.	42
	Ribeirão do Casquilho/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	pc., t.	42
	Rio Água do Rancho/PR	50	6m+28sm+16a	84	1-5 (t. p sm; q sm, a)	-	t., i.	48; 49
	Ribeirão Ligeiro/PR	48	10m+22sm+2st+14a	82	1-4 (t. p sm; q sm, a)	-	t., i.	48; 49
	Ribeirão Yukatán/PR	50	6m+30sm+4st+10a	90	1-3 (t. p m, sm; q a)	-	pc., t.	48; 49
	Rio Sarandi/PR	50	6m+26sm+4st+14a	86	1-5 (t. p m, sm, q sm, a)	-	t.	48; 49
	Córrego Tamanduá/SP	50	6m+26sm+4st+14a	86	2-4 (t. p st, m; q sm, a)	-	bl., pc.	50
	Córrego Tamanduá/SP	48	6m+28sm+4st+10a	86	2 (t. p st)	-	bl., pc., t.	50
	Córrego das Pedras/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	pc., t., p	51
	Córrego Ribeirão Grande/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	-	52
	Ribeirão Pedras/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	-	-	pc., t.	22

	Tributário do Rio Paranapanema/SP	50	8m+18sm+10st+14a	86	-	-	t.	4
	Ribeirão São Domingos/PR	48	10m+20sm+8st+10a	86	3	-	-	53
	Ribeirão Tamboara/PR	48	10m+24sm+6st+8a	88	7	-	-	53
	Córrego Jataí/MG	50	6m+24sm+6st+14a	86	2-4	-	c., t.	54
	Rio Tietê/SP	50	36m/sm+14st/a	86	2 (t. p a)	6 (t. p a; p. m, a)		5
	Ribeirão Lavrinha/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	2-3 (t. p sm)	6 (t. p sm)	pc., t.	55; 56
	Rio Capivari/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	1-4 (t. p sm)	4 (t. p sm)	pc., t.	55; 56
	Córrego Fojo/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	1-6 (t. p sm)	9 (t. p sm)	pc., t.	55; 56
	Lago Carpas/SP	50	6m+22sm+10st+12a	88	2-7 (t. p sm)	7 (t. p sm)	pc., t.	55; 56
	Córrego Amores/PR	48	8m+24sm+4st+12a	84	6 (t. p m, q m, sm, st)	-	c., t.	57
	Rio Índios/PR	48	8m+20sm+6st+14a	82	8 (t. p a, q sm, st)	-	c., t.	57
	Córrego Apertados/PR	72	9m+33sm+6st+24a	120	2-6	12	-	58
	Rio Macacos/SP	50	8m+20sm+8st+14a	86	4 (t. p a)	7 (t.)	-	32
	Ribeirão Marrecas/PR	48	6m+20sm+12st+10a	86	-	4-16	-	59
	Ribeirão Viveiro das Mudanças/MG	50	6m+30sm+8st+6a	94	-	4-11	-	59
	Ribeirão Curral das Éguas/MG	46	6m+22sm+8st+10a	82	-	2-4	-	59
	Córrego Tatupeba/PR	50	6m+22sm+6st+16a	84	13	14	t.	60; 61
	Córrego Tatupeba/PR	48	8m+26sm+6st+8a	88	4	16	t.	60; 61
	Córrego Tatupeba/PR	46	8m+22sm+6st+10a	82	4	14	t.	60; 61
	Córrego Cambeba/MG	50	8m+20sm+6st+16a	84	3 (t.)	-	-	62
	Rio Machado/MG	50	6m+28sm+6st+10a	90	4 (t., bitel.)	-	-	62
	Córrego Pedra Branca/MG	50	6m+24sm+8st+12a	88	5 (t.)	-	-	62
	Rio São Francisco/MG	50	12m+24sm+8st+6a	94	2 (t. p st)	5 (t. p st, a)	-	10
	Rio Verde/PR	50	8m+18sm+10st+14a	86	2-7	13 (t. p; bitel.st)	pc., t., i.	63
	Rio Açungui/PR	50	8m+18sm+10st+14a	86	2-10	13 (t. p; bitel.st)	pc., t., i.	63
	Rio Jaguariaíva/PR	48	10m+16sm+10st+12a	84	2-4	8 (t. p)	pc., t., i.	63
	Rio Santo Antônio/PR	50	8m+18sm+10st+14a	86	1-4	4 (t. p)	pc., t., i.	63
	Rio Santo Antônio/PR	48	10m+16sm+10st+12a	84	2-5	8 (t. p)	pc., t., i.	63
	Córrego Cruz da Retirada Bonita/MG	50	8m+22sm+12st+8a	92	1-3	-	t., i	75
	Córrego da Manga/MG	50	6m+26sm+10st+8a	92	2-4	-	-	75
<i>Astyanax paranae</i> Eigenmann 1914	Ribeirão Bicudos/SP	50	8m+20sm+14st+8a	92	-	-	-	2
	Rio Araquá/SP	50	4m+30sm+4st+12a	84	4 (t. p st, q a)	-	pc., t.	64; 65
	Ribeirão Grande/SP	50	6m+26sm+8st+10a	82	10	-	pc., t.	65
	Ribeirão São Pedro/SP	50	6m+24sm+8st+12a	80	10	-	pc., t.	65
	Rio Claro/SP	50	6m+28sm+6st+10a	84	4	-	pc., t.	65

	Rio Pardo/SP	50	6m+26sm+6st+12a	84	4	-	pc., t.	65
	Ribeirão Pedras/SP	50	6m+28sm+4st+12a	84	6	-	pc.	65
	Rio Capivara/SP	50	8m+22sm+10st+10a	80	6	-	pc., t.	65
	Ribeirão Cascatinha/SP	50	8m+22sm+10st+10a	80	4	-	pc., t.	65
	Rio Lavapés/SP	50	6m+26sm+8st+10a	82	4	-	pc., t.	65
<i>Astyanax schubarti</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	36	14m+14sm+6st+2a	70	-	-	-	66
Britski 1964	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	21m+21sm+9st+3a	105	-	-	-	66
	Rio Paraná/Argentina	36	14m+14sm+6st+2a	70	2 (t. p a)	-	-	17
	Rio Mogi-Guaçu/SP	36	12m+16sm+4st+4a	68	-	-	pc.	4
	Rio Mogi-Guaçu/SP	36	28m/sm+8st/a	64	2 (t. p a)	4 (t. p a; p. m)	-	5
<i>Astyanax</i> sp.	Furna 1/PR	48	6m+18sm+14st+10a	86	2-4 (t. p st; q st)	-	t.	67
	Rios Contas/BA	48	8m+24sm+12st+4a	92	2 (t. p st)	-	-	18
	Rio Preto do Costa/BA	48	8m+24sm+10st+6a	90	2-5 (t. p st, m, sm)	-	-	18
<i>Astyanax</i> sp. B	Reservatório Salto Caxias/PR	50	6m+24sm+6st+14a	86	-	-	t., c.	68
	Rio Iguaçu – Piraquara/PR	50	4m+22sm+8st+16a	84	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	pc., t., p	69
<i>Astyanax</i> sp. C	Rio Iguaçu – São José dos Pinhais/PR	50	4m+22sm+8st+16a	84	8	-	c., t.	70
	Rio Iguaçu – Piraquara/PR	50	4m+22sm+8st+16a	84	1-3	2	pc., t., p	69; 70
<i>Astyanax</i> sp. D	Rio Iguaçu/PR	50	2m+26sm+6st+16a	84	-	-	bl, pc., t., i.	71
	Rio Iguaçu/PR	75	(3x)3m+39sm+9st+24a	84	-	-	bl, pc., t., i.	71
	Rio Bicudo/PR	50	4m+24sm+6st+16a	84	7-14	15-20	t.	69; 72
	Rio Poço Claro/PR	50	4m+24sm+6st+16a	84	-	-	bl., t.	72
	Córrego a esquerda do Alto Rio Iguaçu/PR	50	4m+24sm+6st+16a	84	-	-	bl., t.	72

1- Jim e Toledo (1975); 2- Morelli *et al.* (1983a); 3- Pacheco *et al.* (2001); 4- Daniel-Silva & Almeida-Toledo (2001); 5- Almeida-Toledo *et al.* (2002); 6- Fernandes & Martins-Santos (2004); 7- Fernandes & Martins-Santos (2006a); 8- Domingues *et al.* (2007); 9- Hashimoto *et al.* (2008); 10- Peres *et al.* (2008); 11- Ferreira Neto *et al.* (2009); 12- Kavalco *et al.* (2011); 13- Pacheco *et al.* (2011); 14- Martinez *et al.* (2012); 15- Fauaz *et al.* (1994); 16- Kavalco *et al.* (2009a); 17- Alberdi & Fenocchio (1997); 18- Affonso *et al.* (2007); 19- Pamponet *et al.* (2008); 20- Torres-Mariano & Morelli (2008); 21- Mendes *et al.* (2011); 22- Moreira-Filho *et al.* (2001); 23- Centofante *et al.* (2003); 24- Abel *et al.* (2006); 25- Torres-Mariano & Morelli (2006); 26- Pazza *et al.* (2008a); 27- Pazza *et al.* (2008b); 28- Medrado *et al.* (2008); 29- Peres *et al.* (2009); 30- Gross *et al.* (2004); 31- Artoni *et al.* (2006); 32- Kavalco & Moreira-Filho (2003); 33- Kavalco *et al.* (2009b); 34- Pacheco *et al.* (2010); 35- Carvalho *et al.* (2002); 36- Vicari *et al.* (2008b); 37- Rosa *et al.* (2009); 38- Kirby *et al.* (1977); 39- Kavalco & Almeida-Toledo (2007); 40- Kavalco *et al.* (2010); 41- Salvador & Moreira-Filho (1992); 42- Vicente *et al.* (1996); 43- Moreira-Filho & Bertollo (1991); 44- Mantovani *et al.* (2000); 45- Rocon-Stange & Almeida-Toledo (1993); 46- Maistro *et al.* (1994); 47- Souza & Moreira-Filho (1995); 48- Mizoguchi & Martins-Santos (1998a); 49- Mizoguchi & Martins-Santos (1998b); 50- Maistro *et al.* (2000); 51- Mestriner *et al.* (2000); 52- Neo *et al.* (2000); 53- Alves & Martins-Santos (2002); 54- Araújo & Morelli (2002); 55- Ferro *et al.* (2001); 56- Ferro *et al.* (2003); 57- Fernandes & Martins-Santos (2003); 58- Malacrida *et al.* (2003); 59- Mantovani *et al.* (2005); 60- Fernandes & Martins-Santos (2005); 61- Fernandes & Martins-Santos (2006b); 62- Biavati & Maistro (2007); 63- Vicari *et al.* (2008a); 64- Maistro *et al.* (1992); 65- Maistro *et al.* (1998); 66- Morelli *et al.* (1983b); 67- Matoso *et al.* (2002); 68- Fazoli *et al.* (2003); 69- Kantek *et al.* (2008b); 70- Kantek *et al.* (2003); 71- Kantek *et al.* (2007); 72- Kantek *et al.* (2008a); 73- Silva *et al.* (2012); 74- Peres *et al.* (2012); 75- Santos & Morelli (2006); 76- Jorge & Moreira-Filho (2001).

1.3 CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS NO GÊNERO *BRYCONAMERICUS* EIGENMANN 1907

A sistemática de *Bryconamericus* ainda não está bem definida e muitos autores acreditam que o gênero não seja monofilético, visto que não há sinapomorfias que agrupem as espécies. De acordo com Lima *et al.* (2003) esse gênero inclui 51 espécies válidas que habitam uma variedade de ecossistemas de água doce em toda América Central e do Sul. Posteriormente, outras cinco espécies foram descritas: *B. ecai* Silva, 2004 e *B. patriciae* Silva, 2004 do Sul do Brasil (Silva, 2004), *B. turiuba* Langeani *et al.*, 2005 da bacia do alto Rio Paraná (Langeani *et al.*, 2005), *B. cinarucoense* n. sp. Román-Valencia *et al.*, 2008 e *B. singularis* n. sp. Román-Valencia *et al.*, 2008 do Rio Cinaruco, da bacia do Rio Orinoco (Román-Valencia *et al.*, 2008), totalizando 56 espécies descritas.

Segundo Eigenmann (1927, apud Silva, 2004) o gênero *Bryconamericus* inclui espécies que possuem duas fileiras de dentes no pré-maxilar com quatro dentes na série interna, um baixo número de dentes ao longo da margem anterior da maxila, ausência de escamas na nadadeira caudal, um grande terceiro infra-orbital em contato com o pré-opérculo, linha lateral completa e ausência de uma bolsa glandular na nadadeira caudal em machos. Silva (2004) propôs que três grandes grupos de *Bryconamericus* podem ser separados com base na posição e forma dos dentes maxilares: o grupo *B. iheringii* Boulenger, 1887, *B. exodon* Eigenmann, 1907 e *B. microcephalus* Miranda Ribeiro, 1908.

Ruiz (2007) realizou uma análise taxonômica das espécies de *Bryconamericus* que ocorrem na bacia do Rio Tibagi e identificou uma espécie que não se enquadra em nenhuma das espécies já descritas, denominando-a de *Bryconamericus* sp. Segundo o autor, essa nova espécie está mais intimamente relacionada às espécies do grupo *B. iheringii*, unindo-se a ele pelo morfotipo geral do corpo, mas se diferenciando pela disposição dos dentes. Sua distribuição inclui a região do médio rio Taquara e Ribeirão Três Bocas, ambos afluentes do rio Tibagi, do município de Londrina. Por essa razão, a espécie de *Bryconamericus* coletada no Ribeirão Três Bocas para o presente estudo será denominada *Bryconamericus* aff. *iheringii*.

A tabela 2 mostra estudos citogenéticos realizados no gênero *Bryconamericus* até o momento e, apesar da grande diversidade cariotípica, o número diplóide igual a 52 é bastante conservado no gênero, exceto *Bryconamericus* sp. E do córrego Avoadeira/MT, que apresentou 54 cromossomos (Wasko & Galetti Jr, 1998).

O padrão de AgRONS múltiplas é o mais comum dentro do gênero como

pode ser observado na tabela 2, já sendo documentado para *Bryconamericus* sp. A, B, C e D, *Bryconamericus* aff. *exodon*, *Bryconamericus* aff. *iheringii* e *Bryconamericus ecai*. A FISH com sonda de DNAr 18S foi utilizada em poucas populações e confirmou o padrão de RONS múltiplas em *B. ecai* (Santos *et al.*, 2012), *Bryconamericus* aff. *exodon* (Paintner-Marques *et al.*, 2002) e *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Maringá e rio Keller (Capistano *et al.*, 2008). Em contrapartida, o padrão de RONS simples já foi documentado para um dos citótipos de *Bryconamericus ecai* (Santos *et al.*, 2012) e para *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Tatupeba (Capistano *et al.*, 2008) e Rio Água da Floresta (Paintner-Marques *et al.*, 2003), sendo este último o primeiro relato de RONS simples no gênero.

Eberhardt (2008), analisando *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas/PR observou tanto um padrão de AgRONS múltiplas como simples, tendo em vista que estas foram evidenciadas, em alguns indivíduos, em um único par de cromossomos submetacêntricos, com marcação no braço curto e em outros indivíduos houve uma variação interindividual de 2 a 5 cromossomos nucleolares.

A coincidência entre sinais positivos para cromomicina A₃ (CMA₃⁺) ou mitramicina (MM⁺) e sítios de RONS já foi observada em *Bryconamericus* sp. A, B, C e D (Wasko & Galetti Jr, 1999), *Bryconamericus* aff. *exodon* (Paintner-Marques *et al.*, 2002) *Bryconamericus ecai* (Santos *et al.*, 2012) e *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Paintner-Marques *et al.*, 2003), significando que é comum a associação das RONS com sequências ricas em pares de bases CG.

No gênero *Bryconamericus*, a heterocromatina se distribui principalmente em regiões terminais e pericentroméricas, como em *Bryconamericus* sp. A, B, C, D e E e *Bryconamericus* aff. *iheringii* (tabela 2). Paintner-Marques *et al.* (2003), consideram que regiões heterocromáticas terminais em cromossomos subteloicêntricos sejam marcadores cromossômicos para *Bryconamericus iheringii* e que a composição da heterocromatina pode variar dentro do mesmo cariótipo. Os autores citados utilizaram a enzima de restrição *AluI* e identificaram dois tipos de heterocromatina na população de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Água da Floresta. Em alguns cromossomos (pares 1, 2, 3 e 4) houve digestão enzimática nas regiões banda C positivas, indicando que a heterocromatina nesses cromossomos é rica em sequência de clivagem da *AluI* (AG/CT), enquanto que em outros cromossomos (pares 16, 17, 18, 19 e 20) não houve digestão nas regiões heterocromáticas, indicando que não possuem blocos com sequência rica em AG/CT.

A composição da heterocromatina também foi utilizada por Santos *et al.*

(2012) para diferenciar os quatro citótipos de *Bryconamericus ecai* do rio Forquetinha/RS, que apresentaram diferentes proporções de bases AT e CG. Também foi documentado nesta população polimorfismo em relação aos sítios de DNAr e sinais CMA₃⁺, que variaram quanto a sua localização e número entre os diferentes citótipos. Com base nestes dados Santos *et al.* (2012) propuseram que espécies distintas de *Bryconamericus* estejam em simpatria no rio Forquetinha/RS.

Como demonstrado na tabela abaixo, o gênero *Bryconamericus* possui poucos dados citogenéticos em relação ao número de espécies descritas e em comparação com o gênero *Astyanax*, entretanto, pode-se notar que também é um grupo com grande variabilidade cariotípica.

Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Bryconamericus*. 2n = número diplóide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloentríco, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérica, c.= centromérica, i.= intersticial, p = braço curto, q = braço longo, BC = bandamento C, RF= Referência.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Nº de sítios AgRONS	Nº de cístrons de DNAr 18S, 28S ou 45S	BC	RF
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>exodon</i>	Ribeirão Três Bocas/PR	52	16m+12sm+6st+18a	86	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	-	1
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	-	1
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Rio Água da Floresta/PR	52	8m+22sm+10st+12a	92	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	t., c.	2
	Ribeirão Maringá (PR)	52	12m+18sm+8st+14a	90	2-4 (t. p sm)	6 (t. p sm)	-	3
	Rio Keller (PR)	52	8m+28sm+6st+10a	94	2-4 (t. p st)	10 (t. p sm, st)	t., pc.	3; 4
	Ribeirão Tatupeba (PR)	52	8m+20sm+8st+16a	88	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	-	3
	Rio Keller (PR)	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	-	t., pc.	4
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	12m+16sm+10st+14a	90	-	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	14m+18sm+10st+10a	94	-	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+14sm+8st+20a	84	-	-	-	5
	<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann 1908	Rio Mogi-Guaçu/SP	52	26m/sm+26st/a	78	-	-	-
<i>Bryconamericus ecai</i> Silva 2004	Rio Forquetinha/RS	52	10m+10sm+8st+24a	80	2-4 (t. p m, sm, st, a; q sm)	4 (t. p m, a; q sm)	pc.	7
	Rio Forquetinha/RS	52	10m+14sm+12st+16a	88	2 (t. p st)	2 (t. p st)	pc.	7
	Rio Forquetinha/RS	52	14m+12sm+8st+18a	86	2-3 (t. p sm, a)	6 (t. p m, sm, st, a; q sm)	pc.	7
	Rio Forquetinha/RS	52	10m+24sm+14st+4a	100	2-3 (t. p sm, st)	2 (t. p m, st)	t., c., i.	7

<i>Bryconamericus</i> sp. A	Rio Piracicaba/SP	52	6m+30sm+6st+10a	94	2-3 (t. p sm, st)	-	t., c., i., pc.	8; 9; 10
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Rio Piracicaba/SP	52	10m+6sm+18st+18a	86	1-3 (t. p sm, st)	-	t.,c., pc.	8
	Rio Piracicaba/SP	52	6m+10sm+20st+16a	88	1-3 (t. p sm, st)	-	t., pc., i.	9; 10
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Ribeirão Três Bocas/PR	52	6m+18sm+14st+14a	90	1-4 (t. p m, sm, a, q sm, st)	-	t., c., i.	9; 10
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Córrego Avoadeira/MT	52	8m+14sm+16st+14a	90	1-4 (t. p st, a)	-	t., c., i.	9; 10
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Córrego Avoadeira/MT	54	10m+16sm+22st+6a	102	-	-	t., c., i., pc.	9

1. Paintner-Marques *et al.* (2002); 2- Paintner-Marques *et al.* (2003); 3- Capistano *et al.* (2008); 4- Portela-Castro *et al.* (2008); 5- Eberhardt (2008); 6- Portela *et al.* (1988); 7- Santos *et al.* (2012); 8- Wasko *et al.* (1996); 9- Wasko & Galetti Jr. (1998); 10- Wasko & Galetti Jr. (1999).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente algumas espécies de peixes da família Characidae pertencentes ao grupo Incertae Sedis e comparar os resultados com outras espécies e/ou populações já estudadas, inferindo sobre as tendências evolutivas desse grupo de peixes.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o número diplóide e a fórmula cariotípica de *Astyanax asuncionensis*, *A. altiparanae* e *Bryconamericus* aff. *iheringii*;
- Determinar o número e a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo nas três espécies;
- Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de bases AT e GC, em todas as espécies;
- Analisar o padrão de bandamento C e identificar a composição da heterocromatina;
- Analisar o comportamento meiótico em *A. altiparanae* e *Bryconamericus* aff. *iheringii*;
- Comparar os dados obtidos com os da literatura, visando compreender melhor os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica dentro dos gêneros *Astyanax* e *Bryconamericus*.

3 LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS

As espécies aqui analisadas foram coletadas em rios e ribeirões pertencentes às Bacias do Rio Paraná e Rio Paraguai. A bacia do Rio Paraná é uma das grandes bacias hidrográficas do Brasil, cobrindo uma área de 891.309 Km² que equivale à 10,5% do território nacional. Está situada nas regiões sudeste, sul e centro-oeste, abrangendo principalmente os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Goiás, bem como o Distrito Federal. A confluência dos rios Paranaíba e Grande assinala o início do rio Paraná e deste ponto até sua foz estendem-se 2.739 km, com um desnível de 290m. O curso do Rio Paraná pode ser dividido nos seguintes trechos: Paraná Superior, que inclui desde a nascente do Rio Paranaíba até a confluência com o Rio Grande; Alto Paraná, estendendo-se desde a confluência até o Salto das Sete Quedas (reservatório da UHE de Itaipu); Médio Paraná, incluindo desde o Salto das Sete Quedas até o rápido de Apipé; Baixo Paraná, que inclui desde o rápido Apipé até a cidade argentina de Paraná e Paraná Inferior, estendendo-se desde a cidade de Paraná até a desembocadura no rio da Prata (Paiva *et al.*, 2002).

A bacia do Rio Paraguai, por sua vez, apresenta uma área de drenagem de 1.095.000 km² e compreende os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e parte dos territórios da Bolívia, Paraguai e Argentina. O Rio Paraguai tem suas nascentes no planalto dos Parecis, no Mato Grosso e flui de norte a sul, estendendo-se por 2.621 km, dos quais, 1.693 km estão em território brasileiro (Aguinaldo Silva *et al.*, 2008). Os principais afluentes deste rio, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, são os rios Jauru, Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Negro, Miranda e Apa. Durante as enchentes, o rio Paraguai se comporta como uma larga faixa de água que se vai escoando lentamente rumo ao sul, demorando até seis meses para sair do território brasileiro. Aparecem assim, dentro dessa grande planície deprimida, além dos leitos dos rios e de seus afluentes, as grandes lagoas, os corixos, as vazantes e as lagoas rasas regionais, conhecidas como baías (Britski *et al.*, 1999). O Rio Paraná, juntamente com o Rio Paraguai, formam a grande bacia Paraná-Paraguai, totalizando uma área de drenagem de 2.700.000 Km², incluindo a Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai (Paiva *et al.*, 2002). A confluência entre esses dois grandes rios ocorre na cidade de Corrientes, na Argentina (Aguinaldo Silva *et al.*, 2008).

3.1 *ASTYANAX ASUNCIONENSIS* GÉRY 1972

Foram analisados 3 exemplares de *A. asuncionensis* (1 fêmea, 2 indeterminados) do Rio Miranda (afluente da bacia do Rio Paraguai), município de Corumbá/MS (19°34'34.55''S / 57°01'01.23''W). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob os números MZUEL 5772. A localidade-tipo de *Astyanax asuncionensis* é o Rio Paraguai e alto rio Tocantins e essa espécie distribui-se pelas bacias do Rio Paraguai, do baixo Paraná e do alto Tocantins (Buckup *et al.*, 2007).

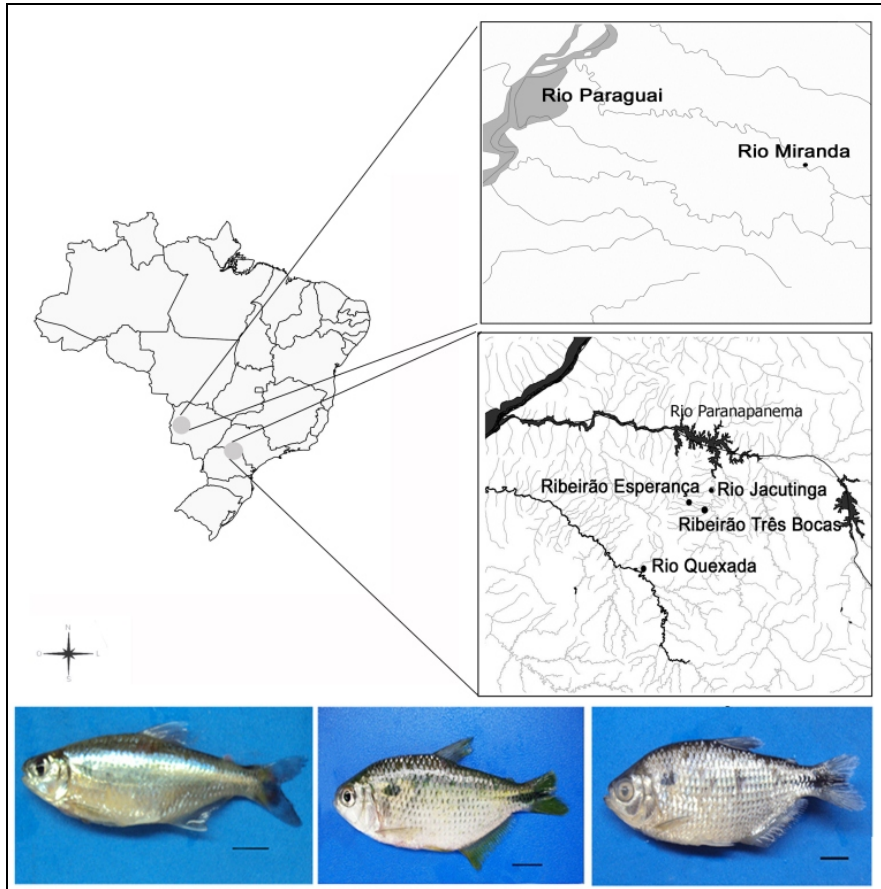
3.2 *ASTYANAX ALTIPARANAE* GARUTTI & BRITSKI 2000

Foram analisadas três populações de *A. altiparanae* da bacia do Rio Paraná: 6 exemplares (3 fêmeas, 1 macho, 2 indeterminados) foram coletados no Rio Quexada, município de Borrazópolis/PR (23°56'9.65''S / 51°39'26.08''W); 11 exemplares (4 fêmeas, 4 machos, 3 indeterminados) foram coletados no Ribeirão Esperança, município de Londrina/PR (23°20'8.76''S / 51°12'38.42''W) e 11 indivíduos (6 fêmeas, 3 machos, 2 indeterminados) no Rio Jacutinga, município de Ibiporã/PR (23°13'25.3''S / 50°58'47.37''W). Os espécimes das três populações foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob os números MZUEL 5771, MZUEL 5769 e MZUEL 5770, respectivamente. A localidade-tipo de *A. altiparanae* é no Rio Grande, represa de Volta Grande, Miguelópolis/SP e essa espécie distribui-se por toda bacia do Alto Paraná (Buckup *et al.*, 2007).

3.3 *BRYCONAMERICUS* AFF. *IHERINGII*

Foram analisados 16 exemplares (9 fêmeas, 7 machos) de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas (afluente da bacia do Rio Tibagi) município de Londrina/PR (23°23'06.6''S / 51°04'35.8''W). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob os números MZUEL 5775 e MZUEL 5776. *Bryconamericus iheringii* possui localidade-tipo em São Lourenço do Sul/RS e distribui-se pelas bacias da Laguna dos Patos e do Uruguai (Buckup *et al.*, 2007).

Figura 1 - Mapa do Brasil destacando os locais de coleta nas bacias do Rio Paraguai e Paraná. Os exemplares de cada espécie estão demonstrados da esquerda para a direita: *Bryconamericus* aff. *iheringii*, *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*. Escala da barra = 1 cm.



CAPÍTULO I:

Diferenciação e similaridade cromossômica de duas espécies de peixes do “Complexo bimaculatus”

*Este artigo será enviado para a revista “Review Fish Biology Fisheries”

Diferenciação e similaridade cromossômica de duas espécies de peixes do “Complexo bimaculatus”

Laura Lahr Lourenço da Silva; Ana Lúcia Dias

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone (43) 3371-4527 (e-mail: anadias@uel.br).

Resumo

Astyanax tem sido amplamente estudado citogeneticamente devido a sua grande diversidade cariotípica entre diferentes populações e/ou espécies. Neste gênero, ocorrem complexos de espécies, ou seja, grupos de peixes de difícil diferenciação morfológica, como o complexo bimaculatus, que inclui os caracídeos com mancha umeral arredondada. Assim sendo, o presente estudo visou uma caracterização citogenética de duas espécies deste complexo: *A.asuncionensis* e *A. altiparanae* para buscar marcadores cromossômicos que diferenciem estas espécies, bem como melhor compreender a evolução cariotípica no gênero. Esse é o primeiro estudo citogenético em *A.asuncionensis*, que apresentou $2n=50$, sendo $18m+22sm+6st+4a$ (NF=96) e RONS simples. As três populações de *A.altiparanae* também apresentaram $2n=50$, porém com diferentes fórmulas cariotípicas: a do Rio Quexada apresentou $16m+24sm+4st+6a$ (NF=94), enquanto as do Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga apresentaram $16m+20sm+4st+10a$ (NF=90). Todas as populações apresentaram variação interindividual no número e localização das RONS, sendo detectadas RONS simples e múltiplas, tanto pela impregnação pelo nitrato de prata quanto pela FISH com sonda de DNAr 18S. Após o bandamento C, as duas espécies diferiram em relação à composição e padrão de distribuição da heterocromatina. As células meióticas dos machos de *A.altiparanae* também foram analisadas, demonstrando que, apesar da alta variabilidade cariotípica, o pareamento cromossômico ocorre normalmente. Os dados mostram que *A.altiparanae* e *A.asuncionensis* compartilham algumas características com outras espécies do complexo bimaculatus, sugerindo uma estreita relação filogenética entre essas espécies. No entanto, algumas características podem ser utilizadas como marcadores cromossômicos de diferenciação dos morfotipos altiparanae/asuncionensis, que podem ser decorrentes de um processo natural de especiação.

Palavras-chave: *Astyanax*. Incertae sedis. Marcadores Cromossômicos. Polimorfismo.

Introdução

Segundo Eschmeyer (2012), o gênero *Astyanax* apresenta 149 espécies válidas distribuídas pelas bacias hidrográficas neotropicais, sendo considerado um gênero de *Incertae Sedis*. Esse gênero tem recebido atenção especial devido à grande variação das suas características morfológicas e citogenéticas entre diferentes populações e/ou espécies (Kantek et al. 2007). A ampla distribuição geográfica deste gênero, juntamente com sua diversidade morfológica, são fatores que dificultam a determinação das relações filogenéticas entre as espécies. Assim, a falta de caracteres morfológicos que assegurem o monofiletismo de *Astyanax* contribui para a ocorrência de complexos de espécies (Bertaco e Garutti 2007). Segundo Nelson et al. (1999), um complexo de espécies ocorre quando duas ou mais espécies são colocadas sob uma mesma nomenclatura, devido à falta de características morfológicas ou quando a caracterização morfológica é incipiente para diferenciá-las.

Garutti (1995) sugeriu o Complexo *bimaculatus* para agrupar um conjunto de espécies e subespécies descritas e não descritas que ocorrem nas bacias dos Rios Paraná, São Francisco e Amazonas. Esse grupo compartilha as seguintes características: uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até os raios caudais medianos. Contudo, Garutti e Britski (2000) verificaram que a denominação *Astyanax bimaculatus* correspondia somente àquelas populações do Suriname e descreveram uma nova espécie denominada *A. altiparanae*, da bacia do Alto Paraná.

Além disso, segundo Lima et al. (2003), as espécies das bacias do Baixo Paraná e Paraguai e do Rio São Francisco, previamente identificadas como *A. bimaculatus*, passaram a ser denominadas de *A. asuncionensis* Géry, 1972 e *A. lacustris* Lutken, 1875, respectivamente. No entanto, há controvérsias em relação à validade desta última espécie devido à sobreposição de características com *A. altiparanae*.

Peres et al. (2012) analisaram espécimes do complexo *bimaculatus* das bacias do Alto Paraná e São Francisco e de um canal de ligação entre essas duas bacias. Para esses autores, *A. altiparanae* e *A. lacustris* fazem parte da mesma unidade taxonômica, uma vez que observaram evidências de cruzamentos entre essas espécies na zona híbrida.

Todas as populações do complexo *bimaculatus* analisadas, até o momento, apresentaram $2n=50$, embora uma grande variabilidade cariotípica já tenha sido reportada, inclusive a presença de um cromossomo B em *A. altiparanae* do Rio Campo Novo/SP

(Hashimoto et al. 2008). A maioria das populações deste complexo apresenta padrão de RONS múltiplas (Almeida-Toledo et al. 2002; Fernandes e Martins-Santos 2004; 2006a; Domingues et al. 2007; Kavalco et al. 2011), no entanto, RONS simples já foram documentadas em algumas populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus*, *A.altiparanae*, *A.jacuhiensis* e *A.lacustris*. Variabilidade também ocorre em relação à distribuição da heterocromatina, que pode ser encontrada nas regiões pericentroméricas, terminais e intersticiais.

Tendo em vista a grande diversidade cariotípica destas espécies e as relações filogenéticas ainda incertas que envolvem esse grupo, o objetivo principal do presente foi fornecer marcadores cromossômicos específicos que auxiliem na diferenciação dos morfotipos *altiparanae/asuncionensis*.

Material e Métodos

Foram analisados 3 exemplares de *A. asuncionensis* (1 fêmea, 2 indeterminados) do Rio Miranda (afluente da bacia do Rio Paraguai), município de Corumbá/MS (19°34'34.55''S / 57°01'01.23''W) e três populações de *A. altiparanae* da bacia do Rio Paraná: 6 exemplares (3 fêmeas, 1 macho, 2 indeterminados) do Rio Quexada, município de Borrazópolis/PR (23°56'9.65''S / 51°39'26.08''W), 11 exemplares (4 fêmeas, 4 machos, 3 indeterminados) foram coletados no Ribeirão Esperança, município de Londrina/PR (23°20'8.76''S / 51°12'38.42''W) e 11 (6 fêmeas, 3 machos, 2 indeterminados) do Rio Jacutinga, município de Ibiporã/PR (23°13'25.3''S / 50°58'47.37''W) (Fig.1). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina com os vouchers MZUEL 5769, MZUEL 5770 MZUEL 5771 e MZUEL 5772. Os espécimes foram coletados com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), protocolo número 11399-1.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por preparação direta com a retirada do rim anterior segundo Bertollo et al. (1978) e da cultura de curto tempo de acordo com Fenocchio et al. (1991). A estimulação mitótica foi realizada pela injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico, descrita por Lee e Elder (1980). As fases meióticas foram obtidas a partir de gônadas dos machos de acordo com Kligerman e Bloom (1977), com modificações. Os cromossomos foram organizados segundo Levan et al. (1964) com modificações. Para determinação do número fundamental os cromossomos metacêntricos (m),

submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) foram considerados com dois braços e os acrocêntricos (a) com um braço.

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black 1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado pelo bandamento C com Giemsa após tratamento com HCl 0.2N, Ba(OH)₂ e 2xSSC, descrita por Sumner (1972). Para a determinação dos sítios ricos em pares de base GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,5-diamino-phenylindole (DAPI), respectivamente, segundo Schweizer (1980).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986), com algumas modificações, usando sonda de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr. 2004), marcada com biotina-14-dATP por nick translation.

Resultados

Astyanax asuncionensis

Todos os exemplares apresentaram 2n=50 cromossomos distribuídos em 18m+22sm+6st+4a (NF=96) (Fig. 2a). Após impregnação por nitrato de prata, *A.asuncionensis* apresentou as AgRONS no braço curto do par de cromossomos subtelocêntricos 21, região que também se mostrou CMA₃⁺ e DAPI⁺ (Fig. 3). A FISH com sonda de DNAr 18S confirmou o padrão de RONS simples.

Após bandamento C, foi possível observar que a heterocromatina distribuiu-se fracamente nas regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos de *A.asuncionensis* (Fig.4). Após coloração sequencial com fluorocromos base-específicos, foram observados sítios CMA₃⁺ terminais relacionados às RONS e sítios DAPI⁺ nas demais regiões heterocromáticas. O par 21 apresentou um bloco heterocromático pericentromérico DAPI⁺ adjacente ao bloco terminal CMA₃⁺ que corresponde à RON (Fig.4).

Astyanax altiparanae

As três populações apresentaram 2n=50 porém, com diferentes fórmulas cariotípicas: a população do Rio Quexada apresentou 16m+24sm+4st+6a (NF=94) (Fig. 2b),

enquanto as populações do Ribeirão Esperança e do Rio Jacutinga apresentaram 16m+20sm+4st+10a (NF=90) (Fig. 2c).

As três populações apresentaram variações intra e interindividuais no número e localização das AgRONS, sendo a maioria dos sítios também coincidente com sinais CMA₃⁺ e DAPI (Fig. 3). A população do Rio Quexada apresentou variação interindividual de 2-3 sítios AgRONS na região terminal do braço curto, de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntrico, sendo que em um indivíduo foram observados até 8 tipos de cromossomos nucleolares, com marcações terminais no braço curto de cromossomos metacêntrico, subtelocêntricos e acrocêntrico e no braço longo de metacêntricos grande e pequeno e submetacêntricos, além de marcações biteloméricas em três submetacêntricos (Fig. 3)

A população do Ribeirão Esperança apresentou variação interindividual de 2-5 sítios e variabilidade na localização e nos tipos cromossômicos das RONS, sendo constatados 5 tipos diferentes de cromossomos nucleolares: com sítios terminais no braço longo de um par de submetacêntricos e um acrocêntrico grande, e no braço curto de um metacêntrico, um par de subtelocêntrico grande e um par de acrocêntrico (Fig.3)

A população do Rio Jacutinga apresentou variação interindividual de 2-6 sítios de RONS, sendo observados 6 tipos de cromossomos AgRONS com marcações no braço curto de cromossomos metacêntrico, subtelocêntrico, acrocêntricos médio e pequeno e no braço longo de um par de submetacêntricos e de um acrocêntrico (Fig.3).

A FISH também mostrou uma variabilidade interindividual em relação aos sítios de DNAr 18S nas três populações de *A.altiparanae*. Foram observados cromossomos marcados pela prata, mas sem sítios ribossômicos em todas as localidades, bem como dois cromossomos na população do Rio Jacutinga com sinais fluorescentes, mas sem impregnação por prata (Fig. 3).

O resumo dos dados de AgRONS e FISH para *A.altiparanae* está representado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Resumo dos dados de AgRONS e FISH com sonda de DNAr 18S em *Astyanax altiparanae*, mostrando a variação interindividual e o número de tipos de cromossomos nucleolares em cada população.

	AgRON		FISH DNAr 18S	
	Varição Interindividual	Número de tipos de cromossomos nucleolares	Varição Interindividual	Número de tipos de cromossomos nucleolares
Rio Quexada	2-8	8	2-6	7
Ribeirão Esperança	2-5	5	2-5	4
Rio Jacutinga	2-6	6	2-5	6

Após bandamento C, as três populações de *A.altiparanae* apresentaram pouca heterocromatina distribuída em regiões pericentromérica e intersticial (Fig. 4). Após coloração sequencial com fluorocromos base-específicos, apresentaram sítios CMA₃⁺ terminais, sendo a maioria relacionada às RONS, e sítios DAPI⁺ nas demais regiões heterocromáticas (Fig. 4).

Células meióticas também foram analisadas em todos os machos das três populações de *A.altiparanae*. Foram detectadas as seguintes fases: espermatogonial, com 50 cromossomos, paquíteno e metáfase I, com 25 bivalentes e metáfase II, com 25 cromossomos (Fig.5).

Discussão

Pouco se conhece sobre a citogenética de *A.asuncionensis*, pois a única bibliografia disponível consiste em poucos resumos de congressos e monografias. Em contrapartida, *A. altiparanae* é uma das espécies do gênero mais estudadas cariotipicamente. Todas as espécies do complexo bimaculatus analisadas até o momento, inclusive as do presente estudo, apresentam 2n=50, embora ocorra grande variabilidade na macroestrutura cariotípica. As fórmulas cariotípicas de *A.asuncionensis* e das três populações de *A.altiparanae* ainda não foram reportadas para o grupo, no entanto, notam-se similaridades com outras populações (tabela 2).

As populações do Ribeirão Esperança e do Rio Jacutinga apresentam o mesmo número diplóide, NF e número de cromossomos do tipo subteloentríco e acrocêntrico que as populações do Rio Claro (Pacheco et al. 2001), Rio dos Índios (Fernandes e Martins-Santos 2004) e Lago Igapó (Pacheco et al. 2011). Com exceção da população do Rio dos Índios, as demais populações pertencem à bacia do Rio Tibagi, portanto, essas similaridades podem ser devidas à proximidade das localidades, indicando uma diferenciação recente. A grande diversidade cariotípica desse complexo de espécies pode ter surgido devido a rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos, como inversões pericêntricas, que mantém o número diplóide constante, mas alteram a estrutura cariotípica. No entanto, diferentes níveis de condensação cromossômica e/ou classificação morfológica errônea não devem ser excluídos.

A diversidade cariotípica de *A.altiparanae* também inclui variabilidade no número e localização de RONS, diferente de *A.asuncionensis*, que apresentou padrão de

RONs simples. Polimorfismo de sítios AgRONs já foi documentado para *A. altiparanae* do Rio Claro por Pacheco et al. (2001) onde foram observados 7 tipos de cromossomos nucleolares com variação de 1-4 sítios, com marcações terminais no braço curto e longo de diferentes cromossomos, além de sítios biteloméricos em um grande submetacêntrico, que foram considerados marcadores para essa população.

As variações intra e interindividual de sítios AgRONs são comumente reportadas no gênero *Astyanax* (tabela 2) e podem ser decorrentes da regulação da atividade gênica dos sítios de DNAr, visto que o nitrato de prata localiza apenas os sítios que estavam ativos na intérfase anterior. Para confirmar se a variação é estrutural ou apenas fenotípica é necessário localizar o gene diretamente, independente de sua atividade, por meio da FISH.

A hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S confirmou a presença de apenas um par de cromossomos portadores da RON em *A. asuncionensis*, bem como a variabilidade interindividual de *A. altiparanae*, sendo evidenciados tanto indivíduos com RONs simples como indivíduos com RONs múltiplas para as três populações. A presença de mais de um par portador desses sítios é comum no gênero *Astyanax* e é considerado uma característica derivada para peixes. No entanto, em *A. altiparanae* a presença de um único par já foi documentado para as populações do Rio Iguazu (Domingues et al. 2007), Rio Monjolinho (Peres et al. 2008), Ribeirão Pântano (Ferreira Neto et al. 2009) e Lago Igapó (Pacheco et al. 2011), onde as marcações foram terminais no braço curto de cromossomos subteloalocêntricos, exceto na primeira população. Sendo assim, a presença de RONs simples em *A. asuncionensis* e em alguns indivíduos de *A. altiparanae*, pode indicar uma estreita relação filogenética com outras espécies do complexo *bimaculatus* que também apresentam esse padrão, como *A. lacustris* (Peres et al. 2008; 2012), *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Kavalco et al. 2011) e *A. jacuhiensis* (Pacheco et al. 2010; Silva et al. 2012).

A presença de cístrons ribossômicos 18S terminais em um par de cromossomos acrocêntricos já foi reportada para algumas populações de *A. altiparanae* (Almeida-Toledo et al. 2002; Fernandes e Martins-Santos 2006a), sendo considerada por Fernandes e Martins-Santos (2006a) como um marcador para a espécie. Os outros sítios por sua vez, variam em número, posição e tipo cromossômico entre as populações, não sendo tão conservados. No entanto, as populações de *A. altiparanae* do Ribeirão Pântano (Ferreira Neto et al. 2009), Rio Monjolinho (Peres et al. 2008), Lago Igapó (Pacheco et al. 2011) e as três populações do presente estudo apresentaram RONs terminais em um par de subteloalocêntricos, sugerindo que este par também possa ser um marcador para estas populações.

Interessante notar que, na população do Rio Jacutinga, foi identificado um sítio de DNAr 18S em um dos homólogos do primeiro par de metacêntricos. Esse resultado é semelhante ao encontrado para uma população de *A. altiparanae* do Rio Paranapanema (Kavalco et al. 2011) e para *A. scabripinnis* do Rio Carpas (Ferro et al. 2001) e do Ribeirão Tatupeba (Fernandes e Martins-Santos 2006b) sendo que, nesse último caso, este sítio também mostrou-se AgRON⁺ e CMA₃⁺. Para os autores citados, a presença desse sítio em apenas um dos cromossomos pode ser resultado de um evento de translocação. Rosa et al. (2009), ao documentarem a presença de três sítios ribossômicos em *A. laticeps*, sugeriram que um evento de transposição tenha ocorrido entre os homólogos, justificando a ausência deste sítio em um dos cromossomos do par, em detrimento do aumento do sítio no outro. Sendo assim, tanto pode ter ocorrido um evento de transposição como de translocação na população de *A. altiparanae* do Rio Jacutinga.

Variação no número e/ou posição dos sítios de DNAr 18S já foi observada em *A. altiparanae* do Ribeirão Keçaba (Fernandes e Martins-Santos 2006a), bem como em outras espécies de *Astyanax*, como *A. eigemanni* (Mendes et al. 2011) *A. intermedius*, *A. giton* e *A. parahybae* (Kavalco e Moreira-Filho 2003) e algumas populações de *A. scabripinnis* (Mantovani et al. 2005; Fernandes e Martins-Santos, 2006b). A variação interindividual de sítios DNAr 18S caracteriza a ocorrência de polimorfismo destes sítios e tem sido explicada pelo modelo Rabl proposto por Schweizer e Loidl (1987). Segundo esse modelo, a proximidade das regiões teloméricas no núcleo interfásico facilitaria a transferência de material genético e os sítios de RONS terminais poderiam sofrer dispersão mais facilmente, causando a variabilidade no número e posição dentro da mesma população. O polimorfismo de genes ribossômicos das três populações de *A. altiparanae* aqui analisadas também pode estar relacionado a esse mecanismo de dispersão.

Vicari et al. (2008b) reportaram 22 sítios de DNAr 18S em *A. janeiroensis*, dos quais 14 estavam associados a sítios de As51. Sabendo-se que o DNA satélite As51 tem notável similaridade com elementos transponíveis, os autores propuseram que esses sítios estariam dispersos nos espaçadores de DNAr e, através de eventos de translocação, causariam um aumento no número destes sítios ribossômicos. Não se pode descartar o fato que esse mesmo mecanismo pode estar envolvido na variabilidade dos sítios de DNAr 18S de *A. altiparanae* do Rio Quexada, Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga, no entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

As RONS de *A.asuncionensis* e a maioria delas em *A.altiparanae* apresentaram associação com sítios CMA₃⁺, indicando que regiões ricas em GC estão intercaladas aos sítios ribossômicos. Essa associação já foi reportada para o complexo bimaculatus (Domingues et al. 2007; Pacheco et al. 2010; Silva et al. 2012), no entanto, sítios CMA₃⁺ não podem ser considerados sinônimos de RONS, uma vez que as três populações de *A.altiparanae* analisadas também apresentaram sítios fluorescentes não relacionados ao DNAr 18S, sendo que alguns deles sofreram impregnação pelo nitrato de prata. Esses resultados demonstram que as RONS podem ou não estar relacionadas a regiões ricas em GC, além disso, existem regiões que impregnam pelo nitrato de prata, mas não contém sítios de RONS e estas podem ou não ser CMA₃⁺. Esses dados evidenciam a importância de se combinar diversas técnicas de coloração diferencial nos cromossomos, a fim de realizar uma maior caracterização do cariótipo e obter uma melhor estimativa da diversidade genética das espécies.

Além de apresentarem diferentes padrões de RONS, *A.altiparanae* e *A.asuncionensis* também diferiram na distribuição da heterocromatina, uma vez que a primeira possui heterocromatina intersticial, além da pericentromérica. A distribuição da heterocromatina em regiões pericentromérica e intersticial é considerada um caráter conservado para *A. altiparanae* (Daniel-Silva e Almeida-Toledo 2001; Fernandes e Martins-Santos 2004; Domingues et al. 2007) no entanto, heterocromatina terminal já foi evidenciada (Ferreira Neto et al. 2009).

A coloração sequencial com fluorocromos base-específicos revelou sinais CMA₃⁺ terminais relacionados às RONS e DAPI⁺ para as demais regiões heterocromáticas em ambas espécies. Além disso, *A.asuncionensis* apresentou um bloco heterocromático pericentromérico DAPI⁺ adjacente à heterocromatina terminal CMA₃⁺ correspondente à RON (par 21), que poderia ser considerado um marcador para esta espécie. Portanto, a presença de RONS múltiplas em *A.altiparanae*, o par 21 de *A.asuncionensis* e o padrão de distribuição da heterocromatina podem auxiliar na diferenciação destas espécies, uma vez que caracteres morfológicos geralmente não são suficientes.

As três populações de *A.altiparanae* apresentaram diferenças sutis em relação à heterocromatina DAPI⁺. A do Rio Quexada e Ribeirão Esperança apresentaram blocos DAPI⁺ mais conspícuos, enquanto que, a população do Rio Jacutinga apresentou poucos sítios e mais discretos. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas à

diferenciação natural dessas populações, uma vez que *A. altiparanae* não é considerada uma espécie migratória.

Tendo em vista a alta diversidade cariotípica reportada para as três populações de *A. altiparanae*, o estudo de células meióticas torna-se interessante para investigar se tamanha variação interfere no pareamento cromossômico. Por meio da análise meiótica foi possível confirmar que a segregação cromossômica ocorre sem alterações, uma vez que foram observados bivalentes e univalentes como previsto em uma meiose regular. Portanto, a formação de gametas viáveis permite a manutenção dessa diversidade nas populações analisadas.

Além de possuir uma segregação meiótica regular, *A. altiparanae* apresenta características ecológicas que também permitem a manutenção dessa variabilidade nas populações, uma vez que sua ampla versatilidade alimentar e capacidade de reprodução em muitos ambientes favorecem a colonização de novos habitats. Essa alta habilidade adaptativa poderia facilitar a manutenção de variações regionais na fórmula cariotípica e número fundamental (Domingues et al. 2007), visto que os processos estocásticos e seletivos são a principal força de diferenciação genética entre as populações de espécies do complexo *bimaculatus* (Kavalco et al. 2011). Por outro lado, o número diplóide e a presença de RONS simples em *A. asuncionensis* e em alguns indivíduos de *A. altiparanae* foram caracteres compartilhados com outras espécies do complexo, indicando que estas ainda mantêm uma estreita relação filogenética, devido a uma divergência recente.

As diferenças cariotípicas observadas entre *Astyanax asuncionensis* e *A. altiparanae* podem ser decorrentes do processo natural de especiação, ao longo do tempo evolutivo e podem ser utilizadas como marcadores específicos na caracterização dessas espécies, tão similares morfologicamente. Esses resultados corroboram com a grande variabilidade cariotípica reportada para o complexo *bimaculatus* (tabela 2). Por se tratar de um grupo amplamente distribuído, a diversidade genética reflete a fixação de variações regionais que culminaram no processo de especiação. Entretanto, as diferenças cariotípicas e/ou morfológicas podem ser apenas variações interpopulacionais de uma mesma unidade biológica, como sugerido por Peres et al. (2012) para *A. altiparanae* do Rio Grande e *A. lacustris* do Rio São Francisco. Até mesmo Garutti e Britski (2000) constataram que as populações de *A. altiparanae* não são homogêneas quanto à morfologia, uma vez que ocorrem numa diversidade de microambientes. Portanto, a denominação de novas espécies para o complexo *bimaculatus* deve ser cautelosa e não apenas considerar os caracteres morfológicos

tradicionais, mas também as características citogenéticas, ecológicas e reprodutivas, para construir um grupo com espécies válidas e relações filogenéticas consistentes.

Anexos

Figura 1 - Locais de coleta e espécies analisadas. Os exemplares de *A.asuncionensis* e *A.altiparanae* estão demonstrados à direita e à esquerda, respectivamente. Escala de barra = 1cm.

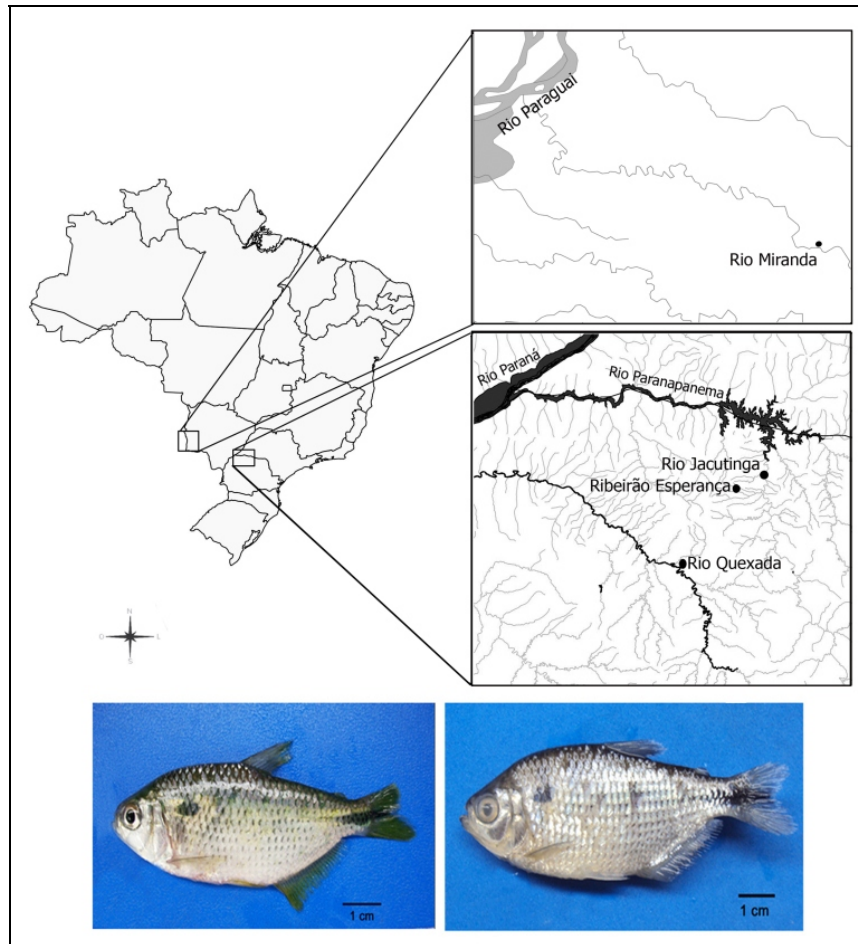


Figura 2 - Cariogramas de: *Astyanax asuncionensis* do Rio Miranda (a), *A.altiparanae* do Rio Quexada (b), do Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga (c). Escala da barra = 5µm.

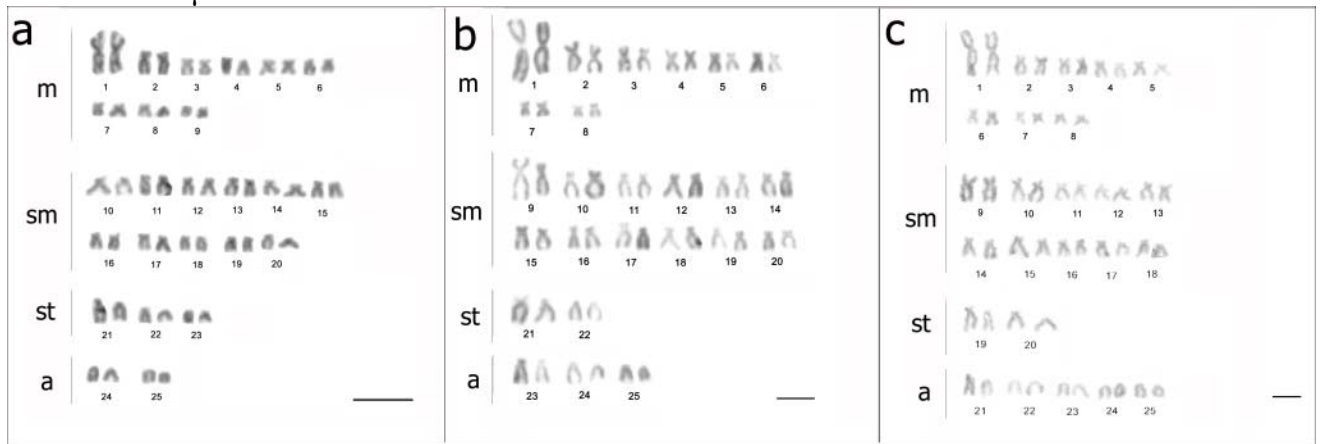


Figura 3 - Cromossomos de *A.asuncionensis* e *A.altiparanae* submetidos ao tratamento com nitrato de prata, hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S e fluorocromo cromomicina A₃. m= metacêntricos, sm= submetacêntricos, st= subtelo-cêntricos, a= acrocêntricos.

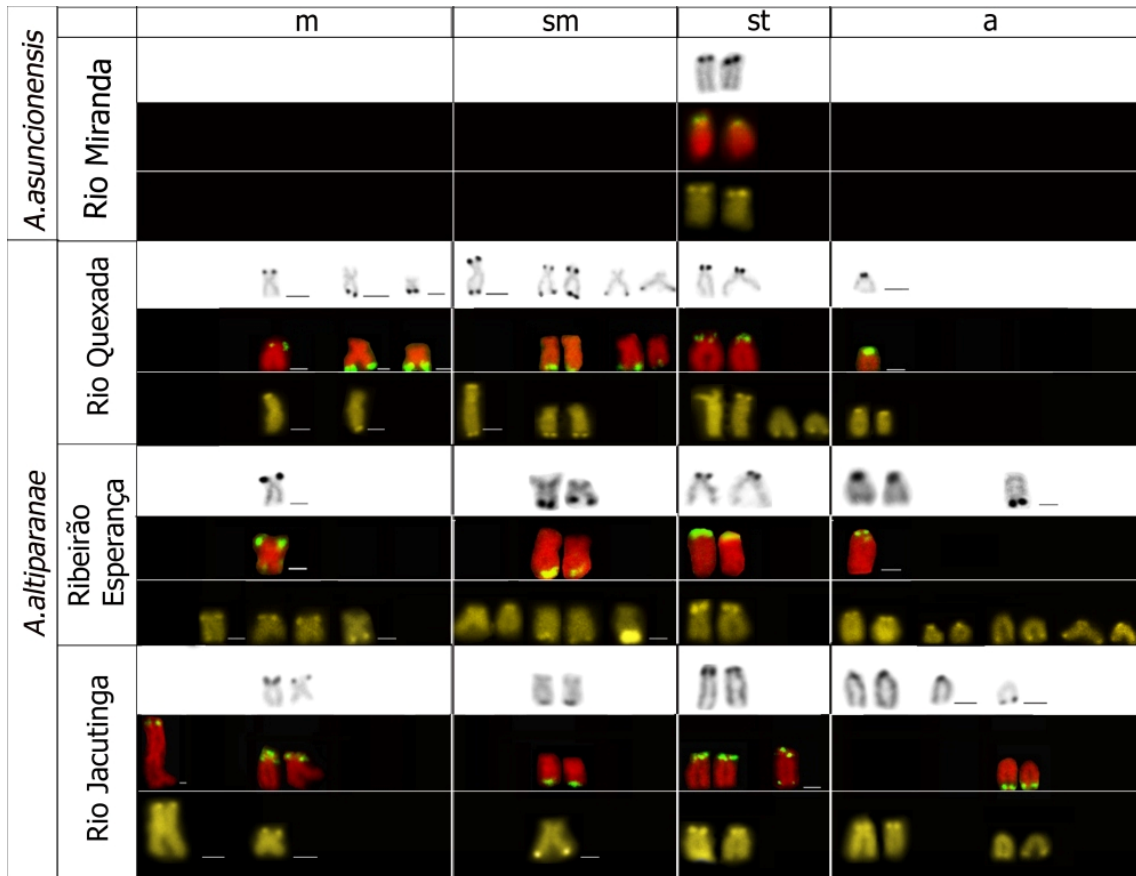


Figura 4 - Metáfases somáticas de *A. asuncionensis* e *A. altiparanae* submetidas ao bandamento C. Coloração seqüencial com Giemsa, CMA₃ e DAPI. Note que a heterocromatina associada às RONS é CMA₃⁺ (cabecãs de setas), enquanto as demais são DAPI⁺. Em *A. asuncionensis* existe um bloco de heterocromatina DAPI⁺ adjacente à heterocromatina CMA₃⁺ (setas, box). A heterocromatina DAPI⁺ é mais conspícua nas populações do Rio Quexada e Ribeirão Esperança e mais discreta no Rio Jacutinga.

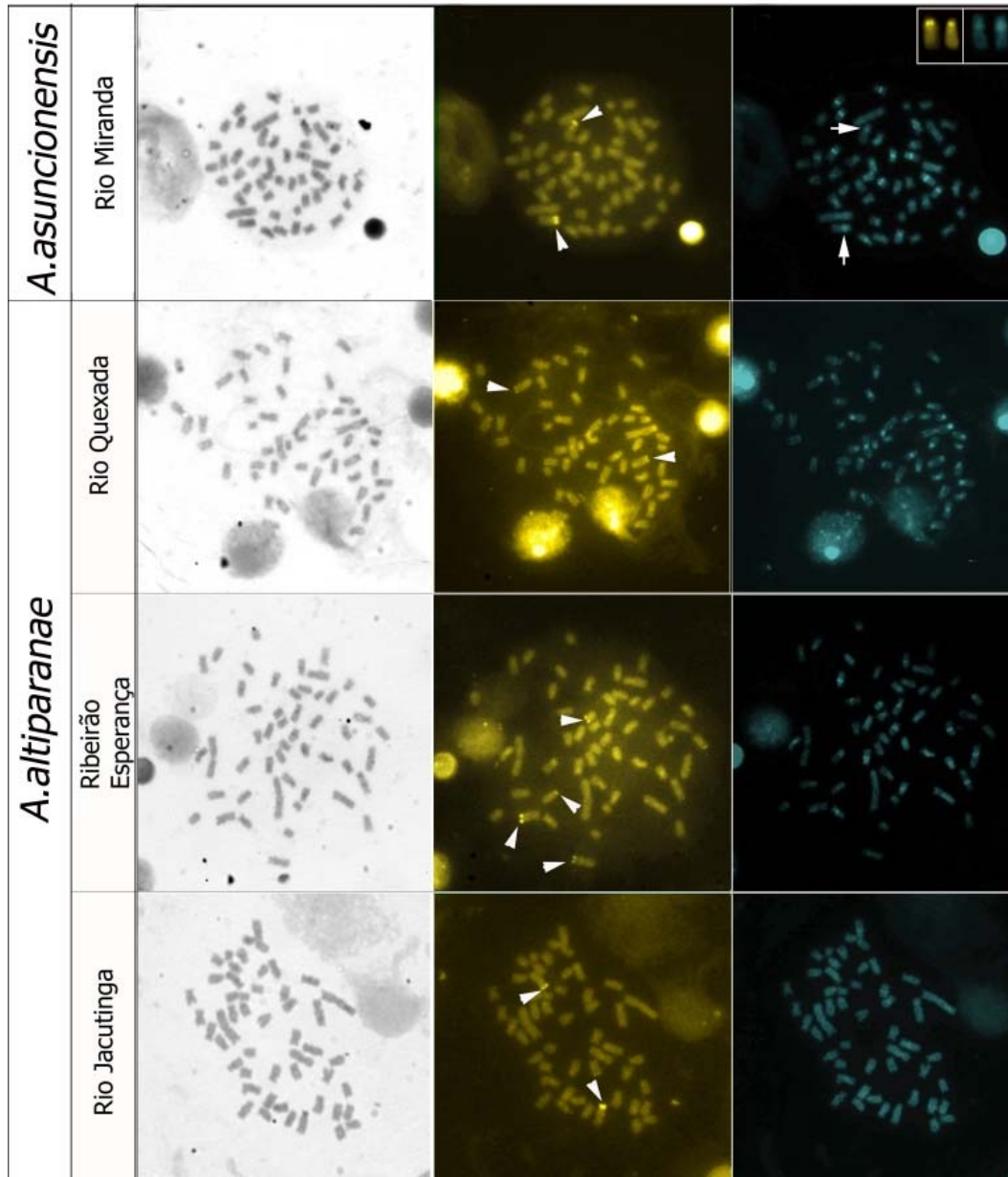


Figura 5 - Fases meióticas em *Astyanax altiparanae* do Rio Quexada, Ribeirão Esperança e Rio Jacutinga. Espermatogonial (a), Paquíteno inicial (b), Paquíteno mediano (c), Paquíteno final (d), Metáfase I (e) e Metáfase II (f).

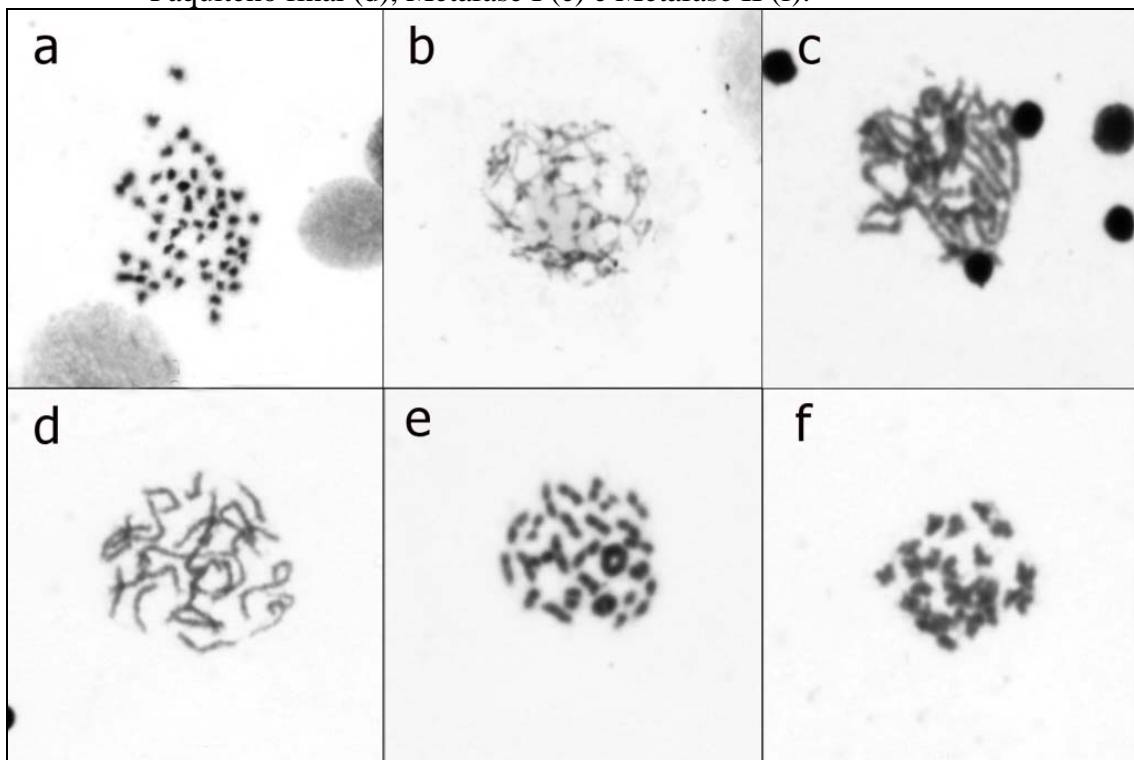


Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do complexo bimaculatus. 2n = número diplóide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloentríco, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérica, c.= centromérica, i.= intersticial, subter.= subterminal, bitel. = bitelomérica, p = braço curto, q = braço longo, BC = bandamento C, RF= referência.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Número de AgRONS	Nº de cístrons DNAr 18S, 28S ou 45S	BC	RF
<i>Astyanax altiparanae</i> Garutti e Britski 2000	Rio Meia Ponte/GO	50	26sm+24a	76	-	-	-	1
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	10m+24sm+4st+12a	88	-	-	-	2
	Rio Claro/PR	50	10m+26sm+4st+10a	90	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Claro/PR	50	10m+24sm+4st+12a	88	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Claro/PR	50	10m+22sm+4st+14a	86	1-4 (t. p e/ou q sm,st,a)	-	-	3
	Rio Paranapanema/SP	50	10m+22sm+6st+12a	88	-	-	-	4
	Rio Mogi-Guaçu/SP	50	32m/sm+18st/a	82	2-3 (t. p a; q sm)	4 (t. p a; p. m)	-	5
	Rio dos Índios/PR	50	6m+30sm+4st+10a	90	10 (t. p m,sm,st; q sm)	-	c., i.	6
	Rio Paraná/PR	50	6m+26sm+6st+12a	88	2 (t. p a)	4 (t.)	c., i.	6; 7
	Ribeirão Tatupeba/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	4 (t.)	-	7
	Ribeirão Keçaba/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	7 (t.)	-	7
	Ribeirão Maringá/PR	50	6m+ 26sm+6st+12a	88	-	4 (t.)	-	7
	Rio Tibagi/PR	50	6m+28sm+8st+8a	92	4 (t. p sm, st; q sm)	7 (t.)	c., i., p	8
	Rio Iguaçu/PR	50	6m+30sm+8st+6a	94	2 (t. p st)	2 (t. p sm)	c., i.	8
	Rio Campo Novo/SP	50	12m+18sm+12st+8a	92	-	-	c., pc., i., p	9
	Ribeirão Monjolinho/SP	50	8m+20sm+12st+10a	90	2 (t. p st)	2 (t. p st)	-	10
	Ribeirão Pântano/SP	50	6m+28sm+4st+12a	88	2 (t.)	2 (t.)	c., pc., t.	11
	Ribeirão Feijão/SP	50	6m+30sm+8st+6a	94	4 (t.)	4 (t.)	c., pc., t.	11
	Rio Jordão/PR	50	6m+28sm+8st+8a	92	6 (t.)	6 (t.)	c., pc., t.	11
	Rio Tietê/SP	50	8m+20sm+10st+12a	88	2 (t. p ou q st/a)	3	t., i.	12
	Rio Paranapanema/SP	50	8m+22sm+14st+6a	94	2 (t. p ou q st/a)	4	t., i.	12
	Rio Água dos Patos/SP	50	8m+24sm+6st+12a	88	2-4 (t. p st)	4 (t. p st)	-	13
	Lago Igapó/PR	50	8m+ 28sm+4st+10a	90	1-3 (t. p st; q sm)	2 (t. p st)	-	13
Rio Tietê/SP	50	6m+12sm+20st+12a	88	2 (t.p st)	-	-	14	
Rio Mogi-Guaçu/SP	50	6m+12sm+20st+12a	88	2 (t.p st)	-	-	14	
Rio Grande/MG	50	8m+32sm+2st+8a	92	2 (p.t st)	2 (p.t st)	-	23	
Rio Quexada/PR	50	16m+24sm+4st+6a	94	2-8 (t.p m, st, a; q m, sm; bitel. sm)	2-6 (t.p m, st, a; q m, sm)	pc., i.	15	
Ribeirão Esperança/PR	50	16m+20sm+4st+10a	90	2-5 (t.p m, st, a; q sm,	2-5 (t.p m, st, a; q sm)	pc., i.	15	

	Rio Jacutinga/PR	50	16m+20sm+4st+10a	90	a) 2-6 (t.p m, st, a; q sm,a)	2-5 (t.p m, st; q sm, a; bitel st)	pc., i.	15
<i>Astyanax asuncionensis</i> Géry 1972	Rio Miranda/MS	50	18m+22sm+6st+4a	96	2 (t. p st)	2 (t. p st)	pc.	15
<i>Astyanax bimaculatus</i> Linnaeus 1758	Rio Paraná/Argentina	50	10m+18sm+12st+10a	90	1-6 (t. p st/a, bitel.)	-	c., t., p	16
	Rio Aguapey/Argentina	50	10m+18sm+12st+10a	90	1-6 (t. p st/a, bitel.)	-	c., t., p	16
	Rio Paraná/Argentina	50	6m+24sm+12st+8a	92	4 (t. p st, sm; q a)	-	-	17
<i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	Rio Preto do Costa/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t.)	-	-	18
	Rio Oricó/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t.)	-	-	18
	Rio Contas/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t. p sm/st)	-	-	18; 19
	Ribeirão Mineiro/BA	50	6m+28sm+12st+4a	96	1-4 (t. p sm/st)	-	-	19
	Rio Ribeira de Iguape/SP	50	8m+24sm+12st+6a	94	2	3	pc.	12
	Rio Guapimirim/RJ	50	8m+24sm+12st+6a	94	2	2	pc.	12
<i>Astyanax jacuhiensis</i> Cope 1894	Lagoa Guaíba/RS	50	8m+30sm+4st+8a	92	2-4 (t. p sm,st; q m)	2 (t. p sm)	pc., t., i.	20
	Rio Maquiné	50	10m+26sm+6st+8a	92	2 (t. p a)	2 (t. p a)	pc., t	21
	Lagoa dos Quadros	50	12m+20sm+6st+12a	88	2 (t. p a)	2 (t. p a)	pc., t	21
<i>Astyanax lacustris</i> Lutken 1875	Rio São Francisco/MG	50	32m/sm+18st/a	82	2 (t. p a)	4 (t. p a; p. m)	-	5
	Rio São Francisco/MG	50	8m+20sm+16st+6a	94	2 (t. p st)	2 (t. p st)	-	10
	Rio São Francisco/MG	50	8m+34sm+2st+6a	94	2 (t.p st)	2 (t.p st)	-	24
<i>Astyanax janeiroensis</i> Eigenmann 1908	Rio Betari/SP	50	6m+14sm+14st+16a	84	6 (t. p sm, st, q st)	-	pc., t., i.	22
	Rio Sacovão/PR	50	6m+14sm+14st+16a	84	3-7	22 (t. p ou q; bitel.)	bl., c., t., i.	23
	Rio Açungui/PR	50	6m+14sm+14st+16a	84	3-7	22 (t. p ou q; bitel.)	bl., c., t., i.	23

1- Jim e Toledo (1975); 2- Morelli et al. (1983); 3- Pacheco et al. (2001); 4- Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2001); 5- Almeida-Toledo et al. (2002); 6- Fernandes e Martins-Santos (2004); 7- Fernandes e Martins-Santos (2006a); 8- Domingues et al.(2007); 9- Hashimoto et al. (2008); 10- Peres et al. (2008); 11- Ferreira Neto et al. (2009); 12- Kavalco et al. (2011); 13- Pacheco et al. (2011); 14- Martinez et al. (2012); **15- Presente estudo**; 16- Alberdi e Fenocchio (1997); 17- Jorge e Moreira-Filho (2001); 18- Affonso et al. (2007); 19- Pamponet et al. (2008); 20- Pacheco et al. (2010); 21- Silva et al. (2012); 22-Carvalho et al. (2002); 23- Vicari et al. (2008b); 24- Peres et al. (2012).

REFERÊNCIAS

- Affonso PRAM, Miranda VS, Medrado AS, Jacobina UP, Bitencourt JA, Almeida JS, Carneiro PLS (2007) Chromosomes in Focus: Basic Cytogenetics, Light Microscopy and the Case of Neotropical Fish Modern Res Educat Topics Microsc
- Alberdi AJ, Fenocchio AS (1997) Karyotypes of five Tetragonopterinae Species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia* 62: 171-176
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonilo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 97: 229-233
- Bertaco VA, Garutti V (2007) New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes, Characidae). *Neotrop Ichthyol* 5: 25-30
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 103-120
- Daniel-Silva MFZ, Almeida Toledo LF (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* 54: 209-215
- Domingues MS, Vicari MV, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Artoni RF (2007) Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotrop Ichthyol* 5: 37-44
- Eschmeyer WN (2012) Catalog of fishes. <<http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog>>. Accessed 10 nov 2012
- Fenocchio AS, Venere PC, Cesar ACG, Dias AL, Bertollo LAC (1991) Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 44: 161-166
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141: 328-332
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2006a) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genet Mol Biol* 29: 464-468
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2006b) Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. *Caryologia* 59: 253-259
- Ferreira Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O (2009) Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genet Mol Biol* 32: 792-796

- Ferro DAM, Neo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55-62
- Garutti V (1995) Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae) com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. Tesis, Universidade Estadual Paulista
- Garutti V, Britski HA (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS Série Zoologia* 13: 65-88
- Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2008) First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol* 31: 275-278
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015
- Jim SN, Toledo V (1975) Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae) *Ciênc Cult* 27: 1122-1124
- Jorge LC, Moreira-Filho O (2001) Estudos citogenéticos em *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) del Río Paraná, Argentina. *Revista de Ictiologia* 9: 21-24
- Kantek DLZ, Noletto RB, Fenochio AS, Cestari MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin. *Braz Arch Biol Technol* 50: 67-74
- Kavalco KF, Moreira-Filho O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia* 56: 453-461
- Kavalco KF, Pazza R, Brandão KO, Garcia C, Almeida-Toledo LF (2011) Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 134: 108–119. doi: 10.1159/000325539
- Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J Fisheries Res Board Can* 34: 266-269
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF (2003) Genera *Incertae sedis* in

- Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ (eds) Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, pp106-113
- Lee M R, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenet Cell Genet* 52: 36-40
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O (2005) Conserved 5S and variable 45S DNAr chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211-216
- Martinez ERM, Alves AL, Silveira SM, Foresti F, Oliveira C (2012) Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comp Cytogenet* 6: 41–51. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1873
- Mendes MM, Rosa R, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA₃ and 18S rDNA. *Genet Mol Res.* doi <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.22.5>
- Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo S (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I – Karyotypic variability. *Caryologia* 36: 235-244
- Nelson JS (1999) Editorial and introduction: the species concept in fish biology. *Reviews Fish Biol Fisheries* 9: 277–280
- Pacheco RB, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2001) Cytotypes and multiple NORs in a *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *The Society Chrom Res* 5: 109-114
- Pacheco RB, Giuliano-Caetano L, Julio Jr HF, Dias AL (2010) Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 8: 667-671
- Pacheco RB, Da Rosa R, Giuliano-Caetano L, Júlio Jr HF, Dias AL (2011) Cytogenetic comparison among two different populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S rDNA and 5S. *Comp Cytogenet* 5: 237-246
- Pamponet VCC, Carneiro PLS, Affonso PRAM, Miranda VS, Silva Júnior JC, Oliveira CG, Gaiotto FA (2008) A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus 1978 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 6: 621-630
- Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 31: 222-226
- Peres WAM, Bertollo LAC, Buckup PA, Blanco DR, Kantek DLZ, Moreira-Filho O (2012) Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Rev Fish Biol Fisheries* 22:519–526. doi 10.1007/s11160-011-9246-2

- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sciences USA* 83:2934-2938
- Rosa R, Rubert M, Malabarba LR, Giuliano-Caetano L (2009) Cytogenetic analyses of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) (Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotrop Ichthyol* 7: 601-605
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27: 190-193
- Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band pattern. Stahl A, Luciani JM and Vagner-Capodano AM (eds) *Chromosome Today*. 1st edition, v. 9. Allen & Unwin, New York, pp 61-74
- Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2012) Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, using in situ hybridization with 18S rDNA probe, DAPI and CMA₃ staining. *Folia Biol (Kraków)* 60: 3-4
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exper Cell Res* 75: 304-306
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008a) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genet Mol Biol* 31: 173-179
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008b) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenet Genome Res* 122: 67-72

CAPÍTULO II:

Diversidade cariotípica em uma população de *Bryconamericus aff. iheringii*

*Este artigo será enviado para a revista Genetica

Diversidade cariotípica em uma população de *Bryconamericus aff. iheringii*

Laura Lahr Lourenço da Silva; Ana Lúcia Dias

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, CCB, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil, fone (43) 3371-4527 (e-mail: anadias@uel.br).

RESUMO

Bryconamericus possui 56 espécies distribuídas em três grandes grupos, com base na posição e forma dos dentes maxilares: o grupo *B. exodon*, *B. microcephalus* e *B. iheringii*. Poucos dados citogenéticos estão disponíveis para o gênero, mas o número diplóide igual a 52 cromossomos é bastante comum, embora seja ampla a variabilidade cariotípica. Este estudo visou caracterizar uma população de *Bryconamericus aff. iheringii* e, assim, contribuir com mais informações citogenéticas e melhor compreender a estrutura e evolução cariotípica desse gênero. Foram observados 6 citótipos, com diferentes padrões de RONS: citótipo I apresentou 12m+10sm+16st+14a (NF=90) e RONS simples; citótipo II com 18m+14sm+10st+10a (NF=94) e citótipo III com 20m+18sm+4st+10a (NF=94), ambos apresentando RONS simples e múltiplas; citótipo IV com 20m+14sm+12st+6a (NF=98), citótipo V com 22m+18sm+8st+4a (NF=100) e citótipo VI com 18m+24sm+6st+4a (NF=100), todos com RONS múltiplas.. O citótipo I é o que mais difere em relação ao NF e ao padrão das RONS, podendo ser considerado como pertencente a uma outra espécie do gênero *Bryconamericus*, vivendo em simpatria no Ribeirão Três Bocas. Os demais citótipos podem ter sido gerados por cruzamentos entre eles e por inversões pericêntricas. Por meio do bandamento C, foi possível identificar pouca heterocromatina pericentromérica que, mostrou-se DAPI⁺ entretanto, variável quanto a proporção de bases AT entre os citótipos. A heterocromatina terminal mostrou-se CMA₃⁺ e provavelmente correspondente aos sítios de RONS. As células meióticas dos machos também foram analisadas e demonstraram que, apesar da alta variabilidade cariotípica, o pareamento cromossômico ocorre normalmente. A grande variabilidade encontrada em *Bryconamericus aff. iheringii* pode estar relacionada a um alto grau de polimorfismo, no entanto, não é descartada a possibilidade de ocorrer mais de uma espécie nesta localidade.

Palavras-chave: Bandamento cromossômico. Citótipos. Polimorfismo. Rearranjos cromossômicos.

Introdução

O gênero *Bryconamericus* ainda não está bem definido taxonomicamente e muitos autores acreditam que não seja monofilético, visto que não há sinapomorfias que agrupem as espécies. Esse gênero inclui 56 espécies válidas, que habitam uma variedade de ecossistemas de água doce em toda América Central e do Sul e sendo dividido em três grandes grupos, com base na posição e forma dos dentes maxilares: o grupo *B. iheringii* Boulenger, 1887, *B. exodon* Eigenmann, 1907 e *B. microcephalus* Miranda Ribeiro, 1908 (Silva 2004).

Apesar da grande diversidade cariotípica reportada para o gênero, o número diplóide igual a 52 é bastante conservado (Capistano et al. 2008; Portela-Castro et al. 2008), exceto *Bryconamericus* sp. E do córrego Avoadeira/MT, que apresentou 54 cromossomos (Wasko e Galetti Jr 1998). Além disso, o padrão de RONS múltiplas é o mais comum dentro do gênero (Capistano et al. 2008), assim como a associação desses sítios com sinais positivos para cromomicina A₃ (CMA₃⁺) ou mitramicina (MM⁺) (Paintner-Marques et al. 2002; Santos et al. 2012), indicando que é comum a associação das RONS com sequências ricas em pares de bases GC.

Em contrapartida, o padrão de RONS simples já foi documentado para um dos citótipos de *Bryconamericus ecai* (Santos et al. 2012) e para *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Tatupeba (Capistano et al. 2008) e Rio Água da Floresta (Paintner-Marques et al. 2003), sendo este último o primeiro relato de RONS simples no gênero.

No gênero *Bryconamericus*, a heterocromatina se distribui principalmente em regiões terminais e pericentroméricas (Paintner-Marques et al. 2003; Portela-Castro et al. 2008), sendo que a heterocromatina terminal em cromossomos subtelocêntricos foi considerada por Paintner-Marques et al. (2003) um marcador cromossômico para *Bryconamericus iheringii*. Além disso, a composição da heterocromatina pode variar, sendo utilizada para diferenciar citótipos, após coloração com fluorocromos base específicos (Santos et al. 2012) e para distinguir tipos heterocromáticos no mesmo cariótipo, por meio de digestão com enzima de restrição *AluI* (Paintner-Marques et al. 2003).

Ruiz (2007) realizou uma análise taxonômica das espécies de *Bryconamericus* que ocorrem na bacia do Rio Tibagi/PR e identificou uma espécie que não se enquadra em nenhuma das espécies já descritas, denominando-a de *Bryconamericus* sp e incluindo-a no grupo *B. iheringii*. Sua distribuição inclui a região do médio rio Taquara e

Ribeirão Três Bocas, ambos afluentes do rio Tibagi, do município de Londrina. Por essa razão, a espécie do presente estudo foi denominada *Bryconamericus* aff. *iheringii*, sendo analisada citogeneticamente por meio de diferentes técnicas de bandamento cromossômico, contribuindo assim, com mais dados no gênero a fim de se obter uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos e das relações filogenéticas no grupo.

Material e Métodos

Foram analisados 16 exemplares (9 fêmeas, 7 machos) de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas (afluente da bacia do Rio Tibagi) município de Londrina/PR (23°23'06.6''S / 51°04'35.8''W) (Fig.1). Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob o voucher MZUEL 5775 e MZUEL 5776. As coletas foram realizadas com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com protocolo número: 11399-1.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por preparação direta com a retirada do rim anterior segundo Bertollo et al. (1978) e da cultura de curto tempo de acordo com Fenocchio et al. (1991). A estimulação mitótica foi realizada pela injeção prévia nos animais de solução de fermento biológico, descrita por Lee e Elder (1980). As fases meióticas foram obtidas a partir de gônadas dos machos de acordo com Kligerman & Bloom (1977), com alterações. Os cromossomos foram organizados segundo Levan et al. (1964), com modificações e para determinação do número fundamental os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) foram considerados com dois braços e os acrocêntricos (a) com um braço.

As regiões organizadoras de nucléolos ativas (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata (Howell e Black, 1980). O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado pelo bandamento C com Giemsa após tratamento com HCl 0.2N, Ba(OH)₂ e 2xSSC, descrita por Sumner (1972). Para a determinação dos sítios ricos em pares de base GC e AT foram utilizados os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,5-diamino-phenylindole (DAPI), respectivamente, segundo Schweizer (1980).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986), com algumas modificações, usando sonda de DNAr 18S isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) marcada com biotin-14-dATP por nick translation.

Resultados

Coloração convencional

Todos os exemplares de *Bryconamericus aff. iheringii* apresentaram $2n=52$ cromossomos, porém diferentes fórmulas cariotípicas, sendo observados seis citótipos (Fig.2), como relacionados na tabela 1, juntamente com suas respectivas frequências.

Tabela 1 - Citótipos de *Bryconamericus aff. iheringii* do Ribeirão Três Bocas. NF=número fundamental.

	Citótipos	NF	Número de indivíduos	Frequência
I	12m+10sm+16st+14a	90	2	12,5%
II	18m+14sm+10st+10a	94	3	18,75%
III	20m+18sm+4st+10a	94	2	12,5%
IV	20m+14sm+12st+6a	98	2	12,5%
V	22m+18sm+8st+4a	100	3	18,75%
VI	18m+24sm+6st+4a	100	4	25%

Regiões Organizadoras de Nucléolo e Fluorocromos

Foram observados padrões distintos de RONS dentro e entre os diferentes citótipos após a impregnação por nitrato de prata e FISH com sonda de DNAr 18S (Figs. 2 e 3, respectivamente).

Na figura 2, cada box representa um padrão de RONS. Os dois indivíduos do citótipo I apresentaram RONS simples exclusivamente, com marcações no braço curto do par 15 (st) (Fig. 2a).

Os citótipos II e III apresentaram tanto o padrão de RONS simples como múltipla. Um indivíduo do citótipo II apresentou RONS terminais no braço curto do par 5 (m), sendo que em um dos homólogos a RON é dupla e coincidente com uma constrição secundária. Os outros dois indivíduos do citótipo II apresentaram marcações terminais no

braço longo dos pares 4 (m) e 12 (sm) e no braço curto do par 5 (m) (Fig. 2b). Um indivíduo do citótipo III apresentou RONS terminais no braço curto do par 5 (m), e outro indivíduo mostrou marcações terminais no braço longo dos pares 4 (m) e 14 (sm) e no braço curto do par 5 (m) (Fig. 2c).

Os citótipos IV, V e VI apresentaram padrão de RONS múltiplas, com variação no número e posição desses sítios. Um indivíduo do citótipo IV apresentou RONS terminais no braço curto do par 5 (m) e no braço longo do par 19 (st); outro indivíduo mostrou marcações terminais no braço longo do par 12 (sm) e do par 19 (st) (Fig. 2d).

O citótipo V apresentou três padrões: um indivíduo com RONS terminais no braço longo dos pares 15 (sm) e 22 (st); um outro com RONS terminais no braço curto do par 5 (m) e no braço longo dos pares 4 (m) e 17 (sm) e um terceiro com RONS terminais no braço curto do par 5 (m) e braço longo do par 4 (m) (Fig. 2e).

E o citótipo VI também apresentou três padrões de RONS múltiplas: dois indivíduos com RONS terminais no braço longo do par 4 (m) e no braço curto do par 5 (m); um indivíduo com RONS terminais no braço curto dos pares 5 (m) e 13 (sm) e no braço longo do par 19 (sm); e um terceiro indivíduo com RONS terminais no braço curto do par 5 (m) e no braço longo do par 19 (sm) (Fig. 2f).

A coloração com fluorocromos revelou sinais CMA_3^+ coincidente com as RONS enquanto o DAPI mostrou-se homogêneo (Fig. 3). Apenas 2 cromossomos mostraram-se CMA_3^+ sem associação com as RONS (um no citótipo II e outro no citótipo VI).

Bandamento C corado com Giemsa e fluorocromos

Após o bandamento C, a heterocromatina mostrou-se fracamente distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos em todos os citótipos (Figs. 4 e 5). A coloração sequencial com fluorocromos revelou que a heterocromatina pericentromérica é $DAPI^+$, enquanto que os sinais CMA_3^+ terminais provavelmente coincidem com as RONS. Foi possível visualizar uma diferenciação entre os citótipos: I e V apresentam sinais $DAPI^+$ muito sutis; III, IV e VI apresentam sinais discretos; e o citótipo II apresentou blocos $DAPI^+$ conspícuos (Figs. 4 e 5).

Células meióticas

As células meióticas dos indivíduos machos também foram analisadas, sendo detectadas as seguintes fases: espermatogonial com 52 cromossomos; zigóteno; paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I com 26 bivalentes e metáfase II com 26 cromossomos (Fig.6).

Discussão

O número diplóide igual a 52 é bastante conservado no gênero *Bryconamericus*, como foi observado em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas e em outras espécies e populações (Capistano et al. 2008; Portela-Castro et al. 2008; Santos et al. 2012), exceto *Bryconamericus* sp. E do córrego Avoadeira/MT, que apresentou 54 cromossomos (Wasko e Galetti Jr 1998). No entanto, uma grande variabilidade na macroestrutura cariotípica tem sido característica neste gênero (tabela 2). A ocorrência de citótipos nesta espécie já foi documentada por Portela-Castro et al. (2008), que observaram dois citótipos na população do Rio Keller: I - 12m+18sm+8st+14a (NF=90) e II - 8m+28sm+6st+10a (NF=94). Distintas fórmulas cariotípicas também já foram documentadas para *Bryconamericus* sp B do Rio Piracicaba (Wasko et al. 1996; Wasko e Galetti Jr 1998; 1999), *Bryconamericus* aff. *exodon* do Ribeirão Três Bocas (Painter-Marques et al. 2002) e *B. ecai* do rio Forquetinha/RS (Santos et al. 2012).

Anteriormente, Eberhardt (2008), reportou quatro citótipos para a população do Ribeirão Três Bocas: citótipo I: 12m+16sm+10st+14a (NF=90), citótipo II: 14m+18sm+10st+10a (NF=94), citótipo III: 10m+24sm+6st+12a (NF=92) e citótipo IV: 10m+14sm+8st+20a (NF=84). É interessante ressaltar que, esses quatro citótipos são diferentes dos encontrados neste estudo, confirmando a grande variação cariotípica nesta população. Esses resultados e aqueles observados na literatura demonstram que rearranjos cromossômicos não Robertsonianos, como inversões pericêntricas, que alteram a fórmula cariotípica, mas não o número diplóide, provavelmente são os mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica no gênero *Bryconamericus*.

Dentre os seis citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii*, o citótipo I é o que mais difere em relação ao NF e, além disso, possui presença exclusiva de RONS simples, podendo ser considerado como pertencente a uma outra espécie do gênero *Bryconamericus*,

vivendo em simpatria no Ribeirão Três Bocas. Os demais citótipos podem ter sido gerados por cruzamentos entre eles e por inversões pericêntricas. Para facilitar o entendimento dessa hipótese, os citótipos foram reorganizados em grupos de m/sm e st/a: citótipo II 32m/sm+20st/a, citótipo III 38m/sm+14st/a, citótipo IV 34m/sm+18st/a, citótipo V 40m/sm+12st/a e o citótipo VI 42m/sm+10st/a. Como demonstrado na Fig. 7 o cruzamento entre o citótipo IV e VI originou o citótipo III que, por sua vez, através de um cruzamento com o citótipo VI originou o citótipo V. Assim sendo, os citótipos III e V seriam os mais recentes na população e os citótipos II, IV e VI seriam os mais antigos e, provavelmente, foram originados a partir de inversões pericêntricas. No entanto, não foi possível determinar a linha evolutiva na qual os citótipos II, IV e VI foram originados, pois não houve uma hipótese mais parcimoniosa, uma vez que todas as ordens possíveis tem probabilidade igual ou muito similar de ter ocorrido.

Com exceção do citótipo I, que possui RONS simples, foi observada uma variabilidade de sítios AgRONS, DNAr 18S e CMA₃⁺ entre e dentro dos demais citótipos. Todos os sítios de DNAr 18S estão associados aos sinais CMA₃⁺, significando que ocorre associação das RONS com sequências ricas em pares de bases CG. Entretanto, foram observados dois cromossomos com sinais fluorescentes, sem relação com os sítios ribossômicos, indicando a existência de outro tipo de DNA repetitivo rico em CG não relacionado à RON. A coincidência entre sinais CMA₃⁺ ou MM⁺ e sítios de RONS já foi observada em *Bryconamericus* sp. A, B, C e D (Wasko e Galetti Jr 1999), *Bryconamericus* aff. *exodon* (Paintner-Marques et al. 2002) e *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Paintner-Marques et al. 2003).

Embora tenha sido evidenciado padrão de RONS múltiplas em cinco citótipos, diferenças na localização e no número das RONS foram observadas, exceto pelo par 5, que foi conservado nestes citótipos. A variabilidade de sítios de RONS pode ser resultado da dispersão desses genes no cariótipo que, provavelmente, ocorreu devido a rearranjos cromossômicos como transposição e/ou translocação e, além disso, a existência de distintas fórmulas cariotípicas, sugere a fixação evolutiva de uma extensiva diversificação cromossômica na espécie como já sugerido por Paintner-Marques et al. (2003) e Capistano et al. (2008).

O padrão de RONS múltiplas é o mais comum dentro do gênero, sendo observado em *Bryconamericus* aff. *exodon*, *Bryconamericus* aff. *iheringii* e *B. ecai*, como indicado na tabela 2. O primeiro relato de RONS simples foi feito por Paintner-Marques et al.

(2003) para *Bryconamericus aff. iheringii* do rio Água da Floresta/PR, onde foi observada marcação terminal do braço curto de um par submetacêntrico grande. Posteriormente, esse mesmo resultado foi encontrado por Capistano et al. (2008) em *Bryconamericus aff. iheringii* do Ribeirão Tatupeba. Santos et al. (2012) também reportaram RONS simples para o citótipo II de *B. ecai* do Rio Forquetinha, onde foram evidenciadas marcações no braço curto de um par de subtelocêntricos, mesmo dado encontrado para o citótipo I de *Bryconamericus aff. iheringii* aqui analisado.

A diversidade genética no gênero *Bryconamericus* também inclui variação na composição da heterocromatina e, neste estudo pôde diferenciar os citótipos de *Bryconamericus aff. iheringii*, uma vez que os citótipos I e V apresentaram sinais DAPI⁺ muito sutis nas regiões heterocromáticas; os citótipos III, IV e VI apresentaram sinais discretos e o citótipo II apresentou blocos DAPI⁺ conspícuos, indicando uma diferenciação em relação à proporção de pares de bases AT.

Paintner-Marques et al. (2003), analisando *Bryconamericus aff. iheringii*, do rio Água da Floresta pode detectar diferentes tipos de heterocromatina no mesmo cariótipo, após o tratamento com enzima de restrição *AluI*. Santos et al. (2012) verificaram diferenças na composição da heterocromatina entre os citótipos de *Bryconamericus ecai*, após coloração com fluorocromos base específicos.

Neste gênero, a heterocromatina se encontra distribuída, principalmente, em regiões pericentromérica e terminal sendo que, segundo Paintner-Marques et al. (2003), marcações terminais em cromossomos subtelocêntricos, podem ser consideradas marcadores cromossômicos para *Bryconamericus iheringii*. No entanto, essa localização não foi detectada em *B. aff. iheringii* do Ribeirão Três Bocas, podendo indicar um marcador de diferenciação entre essas espécies, uma vez que são tão similares morfológicamente.

A alta diversidade cariotípica encontrada neste estudo pode estar relacionada às características ambientais do Ribeirão Três Bocas. Winkaler et al. (2001) analisaram parâmetros fisiológicos e patológicos de *A. altiparanae* e *A. fasciatus* desse ribeirão e observaram alterações na estrutura branquial das duas espécies. Para esses autores, as lesões histopatológicas ocorreram em resposta ao efeito de agentes tóxicos presentes na água e sedimento. Próximo a essa localidade existem algumas propriedades rurais e trechos com mata ciliar pouco preservada, permitindo assim o influxo de agrotóxicos e outros efluentes agrícolas. Essas características tornam o Ribeirão Três Bocas um ambiente com intensa pressão seletiva sobre as populações que nele vivem. Assim sendo, a alta variabilidade

genética encontrada pode ser a razão pela qual essa população de *Bryconamericus* se manteve ao longo do tempo nessa região.

Desde Eberhardt (2008) até o presente estudo, as coletas no Ribeirão Três Bocas ocorreram em épocas distintas ao longo de, aproximadamente, cinco anos e durante esse período o número de citótipos aumentou. É interessante notar que, ao invés de documentar indivíduos com citótipos já descritos, os novos exemplares representaram outros citótipos, sugerindo que esse ponto do Ribeirão Três Bocas seja transitório para *Bryconamericus* aff. *iheringii*. Esse fato indica que, indivíduos provenientes de outras localidades próximas, como de pequenos afluentes ou até mesmo do Rio Tibagi, possam estar temporariamente no Ribeirão Três Bocas, seja para reprodução ou alimentação. Portanto, durante alguma etapa do seu ciclo de vida, estes peixes permanecem nesta área, revelando a necessidade de preservar este ribeirão em toda sua extensão, e conseqüentemente, conservar as populações de outras localidades.

Os dados aqui reportados para *Bryconamericus* aff. *iheringii* corroboram com a conservação do número diplóide no gênero, bem como sua alta diversidade cariotípica, sugerindo que rearranjos cromossômicos, principalmente inversões pericêntricas e/ou translocações, sejam importantes mecanismos na evolução cromossômica deste grupo de peixes. Além disso, o cruzamento entre os citótipos também é fonte de variabilidade cariotípica, aumentando ainda mais o polimorfismo na população. A análise meiótica provou que esses indivíduos suportam tamanha variação, visto que a formação de gametas ocorre regularmente, razão pela qual os diferentes citótipos foram mantidos. No entanto, não é descartada a ocorrência de mais de uma espécie no Ribeirão Três Bocas e a necessidade de uma revisão taxonômica do grupo, visto que as relações filogenéticas entre as espécies de *Bryconamericus* ainda não estão bem definidas.

Anexos

Figura 1 - Mapa do Brasil destacando o local de coleta no Ribeirão Três Bocas, pertencente à bacia do Paranapanema, estado do Paraná. Em destaque, a foto de um exemplar de *Bryconamericus aff. iheringii*

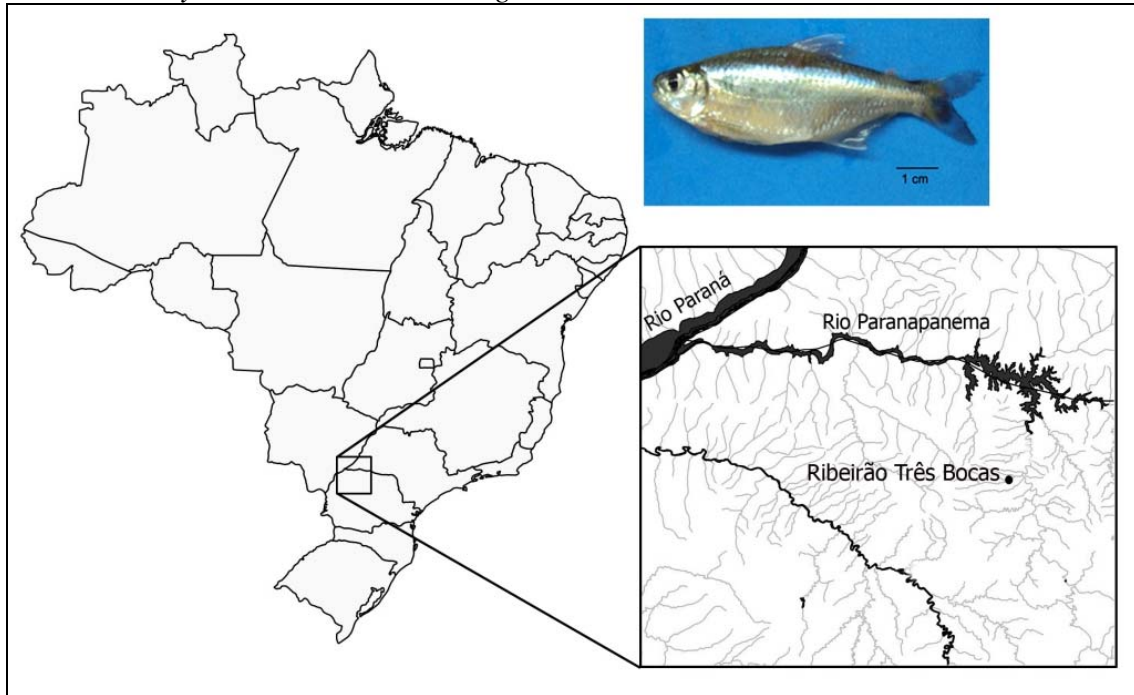


Figura 2 - Citótipos de *Bryconamericus aff. iheringii* do Ribeirão Três Bocas: CitI (a), CitII (b), CitIII (c), CitIV (d), CitV (e), CitVI (f). Nos boxes estão representados os diferentes padrões de AgRONS encontrados em cada citótipo. No citótipo II, o par 5 também está evidenciado com coloração convencional para demonstrar a constrição secundária em um dos homólogos. Escala da barra = 5 μ m.

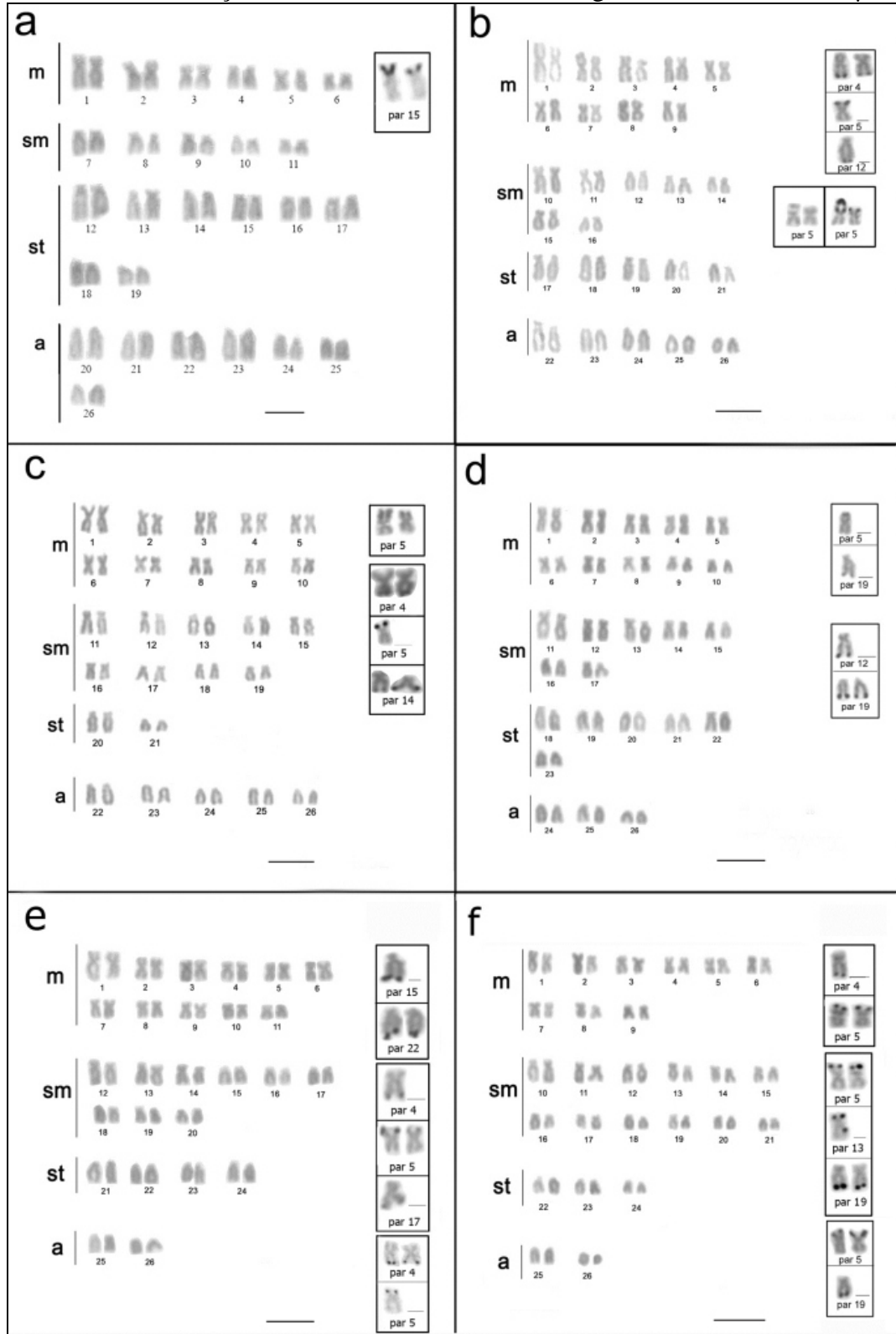


Figura 3 - Cromossomos de *Bryconamericus aff. iheringii* submetidos à impregnação pelo nitrato de prata, fluorocromo CMA₃ e hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S nos diferentes citótipos. Note que existem cromossomos nos citótipos II e VI que são CMA₃⁺ mas não tem associação com as RONS. No citótipo II está representado o par 5 com RON dupla em um dos homólogos que só ocorre no padrão de RONS simples e o par 5 sem este heteromorfismo que ocorre no padrão de RONS múltiplas.

		m	sm	st	a
Citótipo I	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
				par 15	
Citótipo II	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
		par 4 par 5 par 5	par 12	par 17	
Citótipo III	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
		par 4 par 5	par 14		
Citótipo IV	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
		par 5	par 12	par 19	
Citótipo V	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
		par 4 par 5	par 15 ou 17	par 22	
Citótipo VI	AgRONS				
	CMA ₃				
	DNAr 18S				
		par 4 par 5	par 13 par 19		par 25

Figura 4 - Metáfases somáticas dos citótipos I, II e III de *Bryconamericus aff. iheringii* submetidas ao bandamento C, com coloração por Giemsa, CMA₃ e DAPI. O citótipo III mostra coloração seqüencial. Note que a heterocromatina pericentromérica é DAPI⁺, enquanto os sítios CMA₃⁺ terminais provavelmente correspondem às RONS.

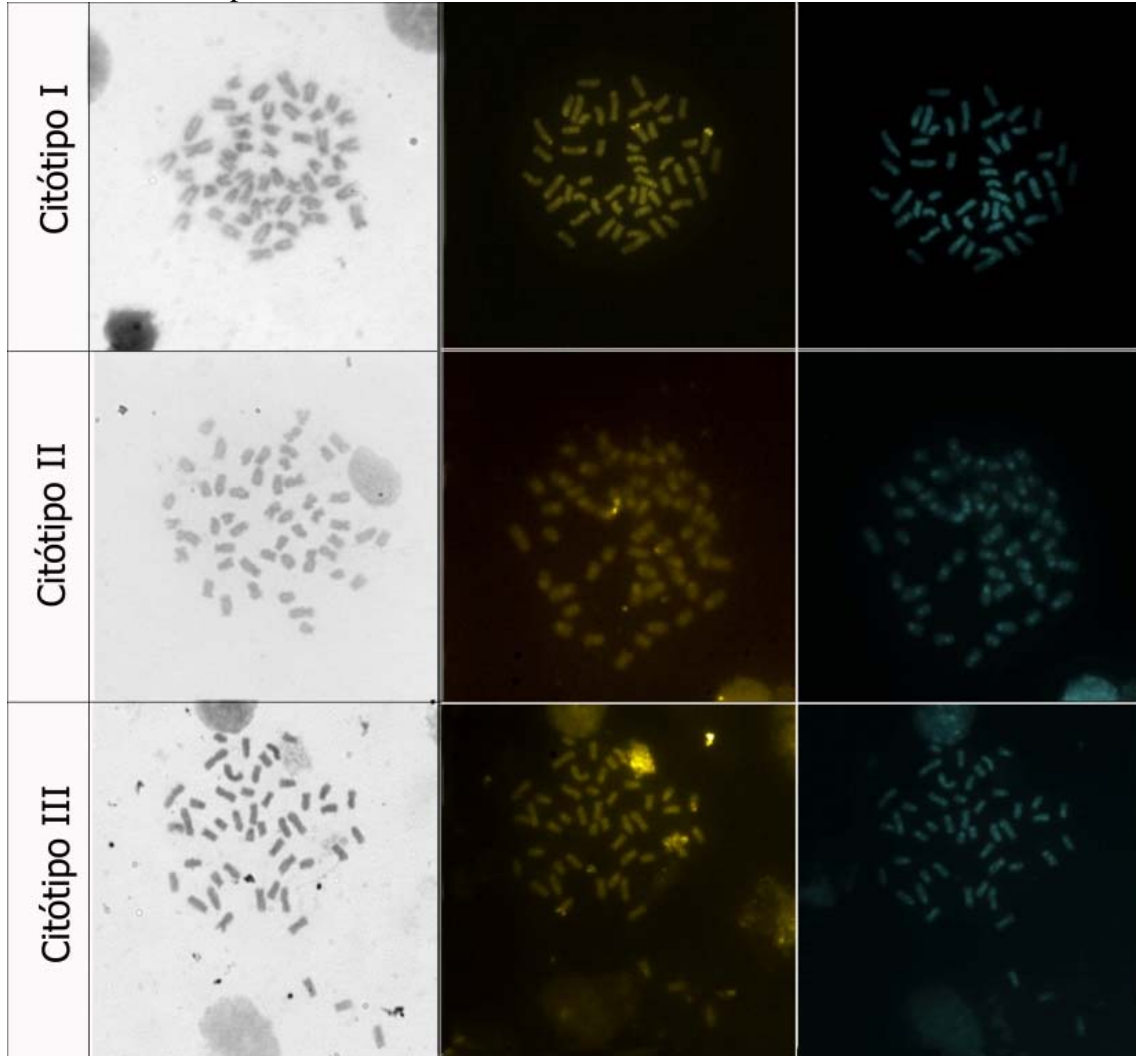


Figura 5 - Metáfases somáticas dos citótipos IV, V e VI de *Bryconamericus aff. iheringii* submetidas ao bandamento C, com coloração seqüencial por Giemsa, CMA₃ e DAPI. Note que a heterocromatina pericentromérica é DAPI⁺, enquanto os sítios CMA₃⁺ terminais provavelmente correspondem às RONS.

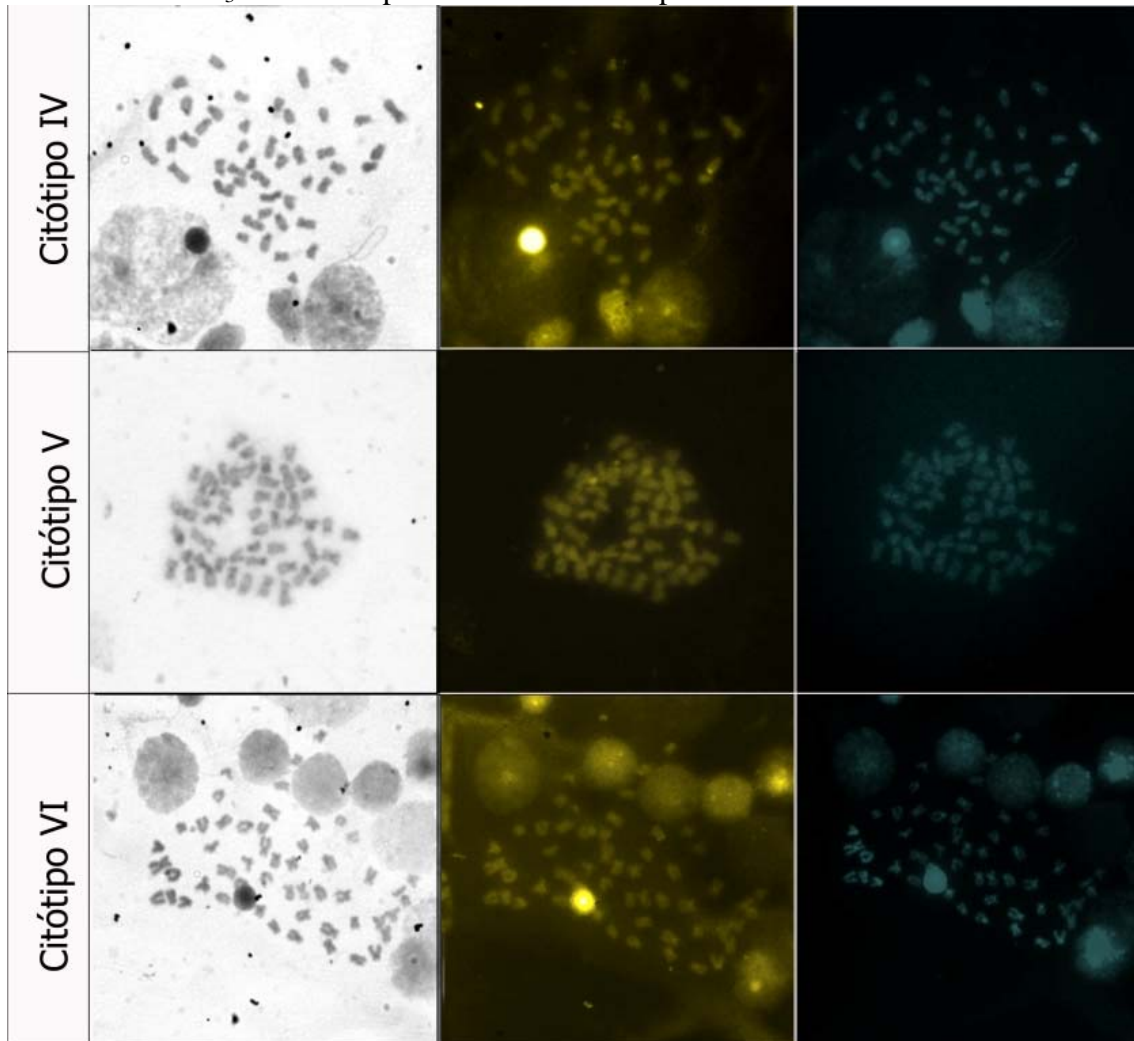


Figura 6 - Fases meióticas de células gonadais de machos de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas: Espermatogonial (a), Zigóteno (b), Paquíteno inicial (c), Paquíteno mediano (d), Paquíteno final (e), Diplóteno (f), Diacinese (g), Metáfase I (h), Metáfase II (i).

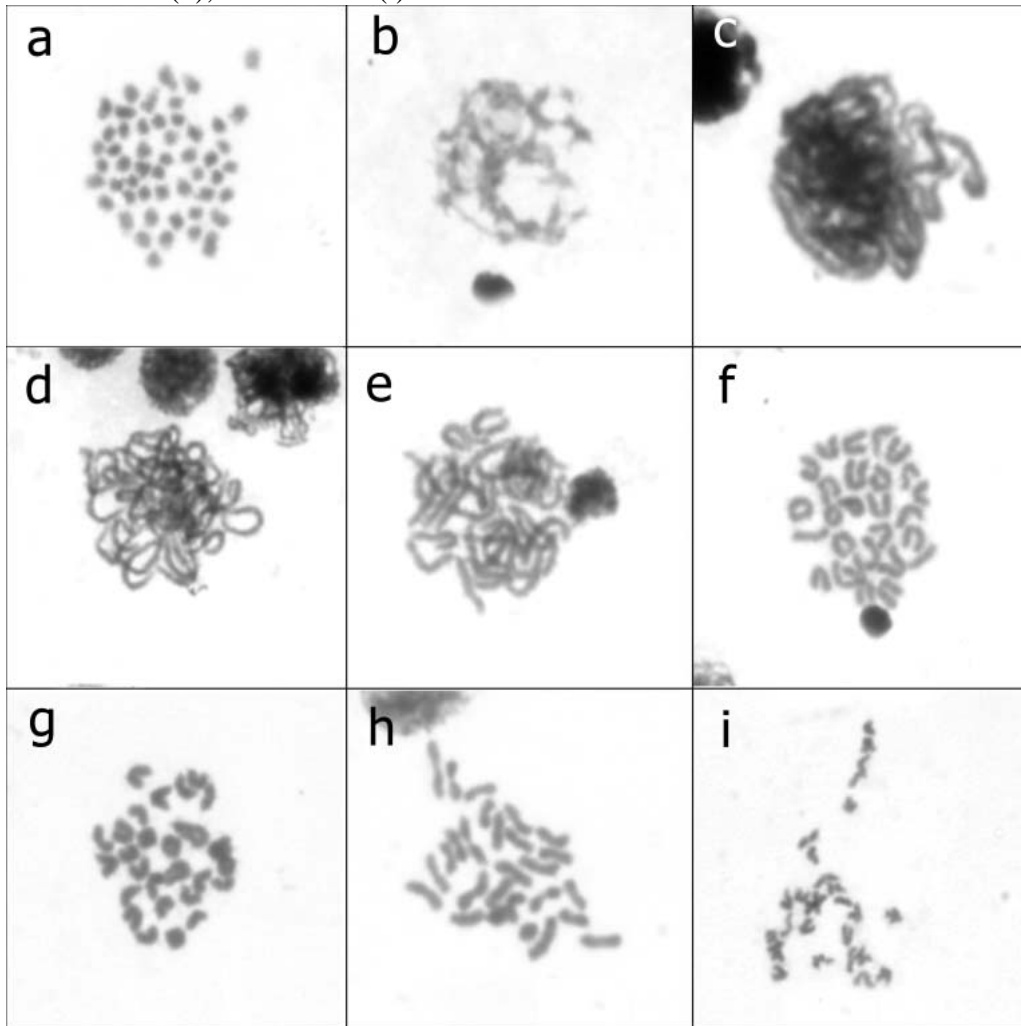


Figura 7 - Esquema representativo para a possível origem dos citótipos III e V de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas, através de cruzamentos entre os citótipos IV x VI e III x VI, respectivamente.

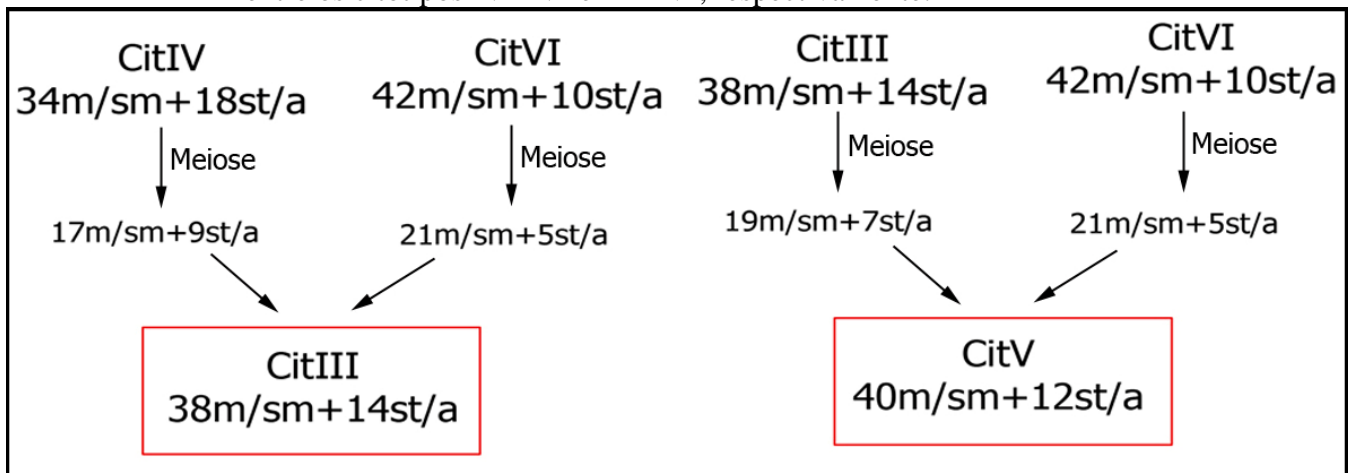


Tabela 2 - Dados citogenéticos em espécies do gênero *Bryconamericus*. 2n = número diplóide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérica, c.= centromérica, i.= intersticial, p = braço curto, q = braço longo, RF= Referência.

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Nº de sítios AgRONS	Nº de cístrons de DNAr 18S, 28S ou 45S	RF
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>exodon</i>	Ribeirão Três Bocas/PR	52	16m+12sm+6st+18a	86	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	1
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	1
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Rio Água da Floresta/PR	52	8m+22sm+10st+12a	92	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	2
	Ribeirão Maringá/PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	2-4 (t. p sm)	6 (t. p sm)	3
	Rio Keller/PR	52	8m+28sm+6st+10a	94	2-4 (t. p st)	10 (t. p sm, st)	3; 4
	Ribeirão Tatupeba/PR	52	8m+20sm+8st+16a	88	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	3
	Rio Keller/PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	-	4
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	12m+16sm+10st+14a	90	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	14m+18sm+10st+10a	94	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	10m+14sm+8st+20a	84	-	-	5
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	12m+10sm+16st+14a	90	2 (t.p st)	2 (t.p st)	6
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	18m+14sm+10st+10a	94	2-4 (t.p m, q. m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	6
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	20m+18sm+4st+10a	94	2-5 (t.p m, q m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	6
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	20m+14sm+12st+6a	98	2-3 (t.p m, q sm, st)	4 (t.p m, q sm, st)	6
	Ribeirão Três Bocas/PR	52	22m+18sm+8st+4a	100	3-4 (t.p m, q sm, st)	4-6 (t.p m, q sm, st)	6

	Ribeirão Três Bocas/PR	52	18m+24sm+6st+4a	100	3-5 (t.p m, q m,sm)	4-6 (t.p m, q m,sm)	6
<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann 1908	Rio Mogi-Guaçu/SP	52	26m/sm+26st/a	78	-	-	7
<i>Bryconamericus ecai</i> Silva 2004	Rio Forquetinha/RS	52	10m+10sm+8st+24a	80	2-4 (t. p m, sm, st, a; q sm)	4 (t. p m, a; q sm)	8
	Rio Forquetinha/RS	52	10m+14sm+12st+16a	88	2 (t. p st)	2 (t. p st)	8
	Rio Forquetinha/RS	52	14m+12sm+8st+18a	86	2-3 (t. p sm, a)	6 (t. p m, sm, st, a; q sm)	8
	Rio Forquetinha/RS	52	10m+24sm+14st+4a	100	2-3 (t. p sm, st)	2 (t. p m, st)	8
<i>Bryconamericus</i> sp. A	Rio Piracicaba/SP	52	6m+30sm+6st+10a	94	2-3 (t. p sm, st)	-	9; 10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Rio Piracicaba/SP	52	10m+6sm+18st+18a	86	1-3 (t. p sm, st)	-	9
	Rio Piracicaba/SP	52	6m+10sm+20st+16a	88	1-3 (t. p sm, st)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Ribeirão Três Bocas/PR	52	6m+18sm+14st+14a	90	1-4 (t. p m, sm, a, q sm, st)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Córrego Avoadeira/MT	52	8m+14sm+16st+14a	90	1-4 (t. p st, a)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Córrego Avoadeira/MT	54	10m+16sm+22st+6a	102	-	-	10

1. Paintner-Marques et al. (2002); 2- Paintner-Marques et al. (2003); 3- Capistano et al. (2008); 4- Portela-Castro et al. (2008); 5- Eberhardt (2008); **6- Presente estudo**; 7- Portela et al. (1988); 8- Santos et al. (2012); 9- Wasko et al. (1996); 10- Wasko e Galetti Jr. (1998); 11- Wasko e Galetti Jr. (1999).

REFERÊNCIAS

- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1:103-120
- Capistano TG, Castro ALBP, Julio-Junior HF (2008) Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 31: 203-207
- Eberhardt GN (2008) Estudos cromossômicos em *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae) do Ribeirão Três Bocas, PR. Monografia, Universidade Estadual de Londrina
- Fenocchio AS, Venere PC, Cesar ACG, Dias AL, Bertollo LAC (1991) Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 44: 161-166
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015
- Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 266-269
- Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenet. Cell Genet.* 52:36-40
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Paintner-Marques TG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2002) Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas* 137:107-112
- Paintner-Marques TG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2003) Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genet. Mol. Biol.* 26: 145-149
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2934-2938
- Portela ALBS, Galetti Jr PM, Bertollo ALC (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Braz. J. Genet.* 11:307-316
- Portela-Castro ALB, Julio Jr HF, Santos ICM, Pavanelli CS (2008) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* 133:113-118. doi: 10.1007/s10709-007-9188-8
- Ruiz RLT (2007) Análise de populações de *Bryconamericus iheringii* (Characiformes: Characidae) da bacia do Rio Tibagi, Paraná. Monografia, Universidade Estadual de Londrina

Santos AR, Rubert M, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2012) Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas*. doi: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x

Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27:190-193

Silva JFP (2004) Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Southern Brazil. *Neotrop. Ichth.* 2:55-60

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304-306

Wasko AP, Venere PC, Galetti Jr PM (1996) Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. *Braz. J. Genet.* 19:225-230

Wasko AP, Galetti Jr PM (1998) Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios* 94:185–193

Wasko AP, Galetti Jr PM (1999) Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). *Cytologia* 64:63-67

Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR (2001) Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, Paraná State. *Acta Sci.* 23:507-514

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados cariotípicos para as três espécies deste estudo corroboram com os disponíveis na literatura para os gêneros, no entanto, foram encontradas algumas peculiaridades para as populações analisadas. Além disso, os resultados poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica dos gêneros *Astyanax* e *Bryconamericus*. Em geral, destacam-se as seguintes contribuições:

1. Os dados para *Astyanax altiparanae* e *A.asuncionensis* confirmaram a conservação do número diplóide e a diversidade da macroestrutura cariotípica do complexo bimaculatus, sugerindo que inversões pericêntricas sejam eventos importantes para a evolução cariotípica do grupo.
2. A presença de RONS simples em *A.asuncionensis* e em alguns indivíduos de *A.altiparanae*, demonstraram uma estreita relação filogenética entre essas espécies, bem como com outras do complexo bimaculatus, que também apresentam esse padrão.
3. O polimorfismo no número e posição das RONS em *A.altiparanae* indica que eventos de transposição e/ou translocação são mecanismos que influenciam a evolução cariotípica desta espécie.
4. O padrão de distribuição da heterocromatina em ambas espécies, bem como as bandas heterocromáticas CMA₃⁺ e DAPI⁺ do par da RON em *A.asuncionensis* e o padrão de RONS múltiplas em alguns indivíduos de *A.altiparanae*, podem atuar como marcadores cromossômicos específicos para a diferenciação dos morfotipos altiparanae/ asuncionensis e são, provavelmente, decorrentes do processo natural de especiação.
5. A manutenção da alta diversidade cariotípica nas três populações de *A.altiparanae* ocorre devido, provavelmente, à segregação meiótica regular, juntamente com a alta habilidade adaptativa da espécie em colonizar novos habitats, favorecendo a estruturação genética nas diferentes localidades.

6. Os dados de *Bryconamericus* aff. *iheringii* corroboram com um número diplóide conservado e com a variabilidade de fórmulas cariotípicas do gênero, incluindo a ocorrência de citótipos em uma mesma população, como já reportado para outras espécies.
7. Os citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii* diferiram em relação ao número e posição dos sítios de RONS e CMA₃⁺, bem como na composição de bases AT e GC da heterocromatina, indicando um alto grau de polimorfismo para a população. No entanto, o citótipo I, por ser o que mais difere em relação ao número fundamental, aos sítios de RONS e CMA₃⁺, foi considerado, neste estudo, como pertencente a outra espécie.
8. Esta população de *Bryconamericus* aff. *iheringii* não apresenta heterocromatina terminal em cromossomos subtelocêntricos, que foi considerado um marcador cromossômico para *B.iheringii*, segundo alguns autores. Assim, a banda C pode ser uma ferramenta de distinção dessas duas espécies, uma vez que os caracteres morfológicos não são suficientes.
9. A origem dos citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do Ribeirão Três Bocas, pode estar relacionada a rearranjos cromossômicos, do tipo inversão pericêntrica, sendo importantes mecanismos na evolução cromossômica do grupo. Além disso, o cruzamento entre os citótipos também é fonte de variabilidade cariotípica, aumentando ainda mais o polimorfismo na população.
10. A análise meiótica permitiu a confirmação de que a segregação meiótica ocorre regularmente, embora muitos rearranjos cromossômicos tenham ocorrido nesta população. Essa diversidade genética pode ter sido a responsável pela sobrevivência de *Bryconamericus* aff. *iheringii* nesta localidade, visto que a atividade antrópica exerce no Ribeirão Três Bocas uma alta pressão seletiva.

REFERÊNCIAS

- Abel, L.D.S.; Mantovani, M.; Moreira-Filho, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.3, p.448-452, 2006.
- Affonso, P.R.A.M.; Miranda, V.S.; Medrado, A.S.; Jacobina, U.P.; Bitencourt, J.A.; Almeida, J.S.; Carneiro, P.L.S. Chromosomes in Focus: Basic Cytogenetics, Light Microscopy and the Case of Neotropical Fish. **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**. 2007.
- Aguinaldo Silva; Souza Filho, E.E; Cunha, S.B. Padrões de canal do rio Paraguai na região de Cáceres (MT). **Revista Brasileira de Geociências**. v.38, n.1, p. 167-177, 2008.
- Alberdi, A.J.; Fenocchio, A.S. Karyotypes of five Tetragonopterinae Species (Pisces, Characidae) from Argentina. **Cytologia**, v.62, p. 171-176, 1997.
- Almeida-Toledo, L.F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonilo, C.; Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M.F.Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 97, p.229-233, 2002.
- Alves, A.L.; Martins-Santos, I.C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.
- Araújo, A.C.S.; Morelli, S. Estudo cariotípico da população de *Astyanax scabripinnis* (Pisces – Characidae) da nascente do córrego Jataí, Uberlândia – MG. **Horizonte científico**, v.1, p. 1-16, 2002.
- Artoni, R.F; Shibatta, O.A.; Gross, M.C.; Schneider, C.H., Almeida, M.C.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C. *Astyanax aff fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil) **Neotropical Ichthyology**, v.4, n.2, p. 197-202, 2006.
- Bertaco, V.A.; Garutti, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes, Characidae). **Neotropical Ichthyology**. v.5, n.1, p.25-30. 2007.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi C.S.; Moreira-Filho, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, p.103-120, 1978.
- Biavati, S.H.; Maistro, E.L. Cytogenetical analyses in three *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae) from Minas Gerais state, Brazil. **Cytologia**, v.72, n. 3, p.357-361, 2007.
- Britski, H.A; Silimon, K.Z.S.; Lopes, B. S. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília: EMBRAPA. 1ª edição. 1999. 184 p.
- Britski, H.A; Silimon, K.Z.S.; Lopes, B. S. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília: EMBRAPA. 2ª edição. 2007. 230 p.

Buckup, P.A.; Menezes N.A.; Ghazzi M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 2007. 195 p.

Capistano, T.G.; Castro, A.L.B.P.; Julio-Junior, H.F. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.203-207, 2008.

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

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

Daniel-Silva, M.F.Z.; Almeida Toledo, L.F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v.54, p. 209-215. 2001.

Domingues, M.S.; Vicari, M.V.; Abilhoa, V.; Wamser, J.P.; Cestari, M.M., Bertollo, L.A.C., Almeida, M.C.; Artoni, R.F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.1, p.37-44, 2007.

Eberhardt, G.N. **Estudos cromossômicos em *Bryconamericus aff iheringii* (Characidae) do Ribeirão Três Bocas, PR**. 2008. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Eschmeyer, W.N. **Catalog of fishes**. 2012. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

Fauaz, G.; Vicente, V.E; Moreira-Filho, O. Natural triploidy and B chromosome in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.2, p.157-163, 1994.

Fazoli, L.C.; Silva, V.A.B.; Portela-Castro, A.L.B.; Júlio Jr. H.F. Chromosome characterization of *Astyanax* sp. B (Characidae, Tetragonopterinae), an endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v.68, p. 289-293, 2003.

Fenocchio, A.S.; Venere, P.C.; Cesar, A.C.G.; Dias, A.L.; Bertollo, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, n.2, p. 161-166, 1991.

Fernandes, C.A.; Martins-Santos, I.C. Cytogenetic characterizatón of two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí Basin PR Brazil. **Cytologia**, v. 68, p. 289-293, 2003.

Fernandes, C.A; Martins-Santos, I.C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v.141, p.328-332, 2004.

- Fernandes, C.A; Martins-Santos, I.C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, v.124, p.301–306, 2005.
- Fernandes, C.A; Martins-Santos, I.C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.3, p.464-468, 2006a.
- Fernandes, C.A., Martins-Santos, I.C. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 253-259, 2006b.
- Ferreira Neto, M.; Vicari, M.R.; Camargo, E.F.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.4, p.792-796, 2009.
- Ferro, D.A.M.; Neo, D.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v.110, p. 55-62. 2001.
- Ferro, D.A.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, v.119, p.147-153, 2003.
- Garutti, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae) com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. 1995. Tese - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, 286p.
- Garutti, V. Descrição de *Astyanax argyrimarginatus* sp. n. (Characiformes, Characidae) procedente da bacia do Rio Araguaia, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**.v. 59, n.4, p.585-591. 1999.
- Garutti, V.; Britski, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS Ser. Zool.** 13, p.65-88. 2000.
- Garutti, V. Revalidação de *Astyanax rupununi* Fowler, 1914 (Teleostei, Characidae) e descrição de duas espécies novas para o gênero. **Papéis Avulsos de Zoologia**. v. 43, n.1, p.1-9. 2003
- Garutti, V.; Langeani, F. Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**. v.7, n.3, p.371-376, 2009.
- Graça, W.J.; Pavanelli, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007. 241p.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Matiello, M.C.A.;Leite, M.L.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae), **Genet Mol Biol**, v. 27, p. 529-535, 2004.

- Guerra, M. Variação e evolução cromossômica: variação numérica. In: _____. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 82-100.
- Hashimoto, D.T.; Gonçalves, V.R.; Bortolozzi, J.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.275-278, 2008.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr, P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p.239-244, 2004.
- Howell, W.M.; Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.
- Jim, S.N.; Toledo, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae) **Ciência e Cultura**, v.27, p. 1122-1124, 1975.
- Jorge, L.C.; Moreira-Filho, O. Estudos citogenéticos en *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) del Río Paraná, Argentina. **Revista de Ictiología**, v.9, n.1/2, p. 21-24. 2001.
- Kantek, D.L.Z.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M. Cytogenetic characterization and NOR polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from the First Plateau of the Iguazu River (Paraná State, Brazil). **Cytologia**, v. 68, p. 19-24, 2003.
- Kantek, D.L.Z.; Noleto, R.B.; Fenocchio, A.S.; Cestari, M.M. Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguazu river basin. **Brazilian Arch Biol Technol**, v. 50, p. 67-74, 2007.
- Kantek, D.L.Z.; Cipriano, R.R.; Noleto, R.B.; Fenocchio, A.S.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M. Population analysis of a chromosome polymorphism in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguazu River. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p. 239-242. 2008a.
- Kantek, D.L.Z.; Noleto, R.B.; Maurutto, F.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Cestari, M.M. Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the upper Iguazu river basin: conformation of the occurrence of distinct evolutionary units. **Journal of Fish Biology**, v.73, p.2012-2020, 2008b.
- Kasahara, S. Análise dos cromossomos com coloração sequencial. In: Kasahara, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**. 2009. p39-52.
- Kavalco, K.F.; Moreira-Filho, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v.56, n.4, p.453-461, 2003.
- Kavalco, K.F.; Almeida-Toledo, L.F. Molecular cytogenetics of blind mexican Tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v.4, n.2, 2007.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R., Almeida-Toledo, L.F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, v.136, p.135-139, 2009a.

- Kavalco, K.F.; Brandão, K.O.; Pazza, R.; Almeida-Toledo, L.F. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*?. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.3, p.477-483, 2009b.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Almeida-Toledo, L.F. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), na endemic characin of the Atlantic rainforest. **Nucleus**, v.53, n.1-2, p.51-54, 2010. doi: 10.1007/s13237-010-0006-9.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Brandão, K.O.; Garcia, C.; Almeida-Toledo, L.F. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v.134, p.108–119, 2011. doi: 10.1159/000325539.
- Kirby, R.F.; Thompson, K.W.; Hubbs C.L. Karyotypic similarities between the mexican and blind tetras. **Copeia**, v. 3, p. 578-580, 1977.
- Kligerman, A.D.; Bloom, S.E. Rapid chromosome preparations from solide tissues of fishes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 34, p. 266-269, 1977.
- Langeani, F.; Lucena, Z.M.S.; Pedrini, J.L.; Tarelho-Pereira, F.J. *Bryconamericus turiuba*, a new species from the Upper Rio Paraná system (Ostariophysi: Characiformes). **Copeia**, v.2, p.386–392, 2005.
- Lee, M. R.; Elder, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.52, p 36-40, 1980.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.
- Lima, F.C.T. Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F. Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: Reis, R.E; Kullander, S.O. & Ferraris Jr, C.J. **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.106-113.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genética**, v.87, p. 101-106, 1992.
- Maistro, E. L.; Dias, A. L.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro Bchromosomes. **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p.233-239, 1994.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 2, 1998. doi 10.1590/S1415-47571998000200005.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) **Genet Mol Biol**, v.23, p. 365-369, 2000.

- Malacrida, A.C.P.; A. L. Dias; L. Giuliano-Caetano. Natural triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi River bay – PR. **Cytologia**, v.68, p.267-270, 2003.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.
- Mantovani M.; Abel L.D.S.; Moreira-Filho O. Conserved 5S and variable 45S DNAr chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.123, p.211-216, 2005.
- Martinez, E.R.M.; Alves, A. L.; Silveira, S. M.; Foresti, F.; Oliveira, C. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetic**, v. 6, n.1, p. 41–51, 2012. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1873
- Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Shibatta, O.A.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. Karyotypic studies in the Characidae fish, genus *Astyanax*. An endemic and highly isolated population of *Astyanax* sp. **Cytologia**, v.67, p.123-128, 2002.
- Medrado, A.S.; Figueiredo, A.V.A.; Waldschmidt, A.M.; Affonso, P.R.A.M.; Carneiro, P.L.S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.208-214, 2008.
- Mendes, M.M. Rosa, R.; Giuliano-Caetano L.; Dias, A.L. Karyotype diversity of four species of the *incertae sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA₃ and 18S rDNA. **Genetics and Molecular Research**. 2011. doi <http://dx.doi.org/10.4238/2011.November.22.5>
- Menezes, N.A.; Weitznam, S.H.; Oyakawa, O.T.; Lima, F.C.T., Castro, RMC; Weitzman, M.J. **Peixes de água doce da mata Atlântica**. São Paulo: Corprint Gráfica e Editora. 2007. 408p.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr, P.M., Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M.. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v.85, p.1-9, 2000.
- Mizoguchi, S.M.H.N.; Martins-Santos, I.C. Activation patterns of the nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). **Cytologia**, v.63, p.259-265, 1998a.
- Mizoguchi, S.M.H.N; Martins-Santos, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genet Mol Biol**, v. 21, p 55-61, 1998b.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian J Genet**, v. 14, p. 331-357, 1991.

- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Bertollo, L.A.C. Occurrence of a metacentric macrochromosome-B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v.66, p. 59-64, 2001.
- Morelli, S.; Bertollo L.A.C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Almeida-Toledo, S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I – Karyotypic variability. **Caryologia**, v.36, p. 235-244, 1983a.
- Morelli, S.; Bertollo L.A.C.; Moreira-Filho, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II – Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983b.
- Nelson, J.S. Editorial and introduction: the species concept in fish biology. **Reviews Fish Biol Fisheries** v.9, p. 277–280, 1999.
- Neo, D.M., Moreira-Filho O., Camacho J.P. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p.136-141, 2000.
- Pacheco, R.B.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. Cytotypes and multiple NORs in a *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **The Society of Chromosome Research**, v.5, p.109-114, 2001.
- Pacheco, R.B; Giuliano-Caetano, L.; Julio Junior, H.F.; Dias, A.L. Cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) in the lago Guaíba and tributaries, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n.3, p.667-671, 2010.
- Pacheco, R.B. ; Da Rosa, R. ; Giuliano-Caetano, L. ; Júlio Jr, H.F.; Dias, A. L. Cytogenetic comparison among two different populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S rDNA and 5S.. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, p. 237-246, 2011.
- Pamponet, V.C.C.; Carneiro, P.L.S.; Affonso, P.R.A.M.; Miranda, V.S.; Silva Júnior, J.C.; Oliveira, C.G.; Gaiotto, F.A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.4, p.621-630, 2008.
- Paintner-Marques, T.G.; Giuliano-Caetano,L.; Dias, A.L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**, v.137, p.107-112, 2002.
- Paintner-Marques, T. G.; Giuliano-Caetano,L.; Dias, A.L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae,Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, n. 2, p.145-149. 2003.
- Paiva, M.P.; Andrade-Tubino, M.F.; Godoy, M.P. **As represas e os peixes nativos do Rio Grande: Bacia do Paraná, Brasil**. Rio de Janeiro: Interciência. 2002.
- Pazza, R.; Kavalco, S.A.F.; Penteado, P.R.; Kavalco, K.F.; Almeida-Toledo, L.F.. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary Approach. **Journal of Fish Biology**, v.72, p. 2002–2010, 2008a.

- Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 – Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenet and Genome Research**, v.122, p.61–66, 2008b.
- Peres, W.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira Filho, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.222-226, 2008.
- Peres, W.A.M.; Bertollo, L.A.C.; Buckup, P.A.; Blanco, D.R.; Kantek, D.L.Z.; Moreira-Filho, O. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “bimaculatus group” (Characiformes: Characidae). **Rev Fish Biol Fisheries** v.22, p 519–526. 2012. doi 10.1007/s11160-011-9246-2
- Peres, W.A.M.; Buckup, P.A.; Kantek, D.L.Z.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v.137, p.305–311, 2009.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.
- Portela, A.L.B.S; Galetti Jr, P.M.; Bertollo, A.L.C Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, n.2, p.307-316, 1988.
- Portela-Castro, A.L.B.; Julio Jr, H.F., Santos, I.C.M.; Pavanelli, C.S. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica**, v.133, p. 113-118, 2008. doi: 10.1007/s10709-007-9188-8.
- Prioli, A.J.; Carlo, V.A.; Soria, T.V.; Prioli, S.M.A.P.; Pavanelli, C.S.; Prioli, R.A.; Gomes, V.N.; Júlio Jr, H.F.; Prioli, L.M. Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. **Genetic and Molecular Research** v.11, n.2, p.1064-1074. 2012.
- Rocon-Stange, E.A.; Almeida-Toledo, L.F. Supernumerary B-Chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian J Genet**, 16: 601-615. 1993.
- Román-Valencia, C.; Taphorn, B.D.C; Ruiz-C., R.I. Two new *Bryconamericus*: *B. cinarucoense* n. sp. and *B. singularis* n. sp. (Characiformes, Characidae) from the Cinaruco River, Orinoco Basin, with keys to all Venezuelan species. **Animal Biodiversity and Conservation**, v.31, n.1, p.15–27, 2008.
- Rosa, R.; Rubert, M., Malabarba, L.R.; Giuliano-Caetano, L. Cytogenetic analyses of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894) Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p.601-605, 2009.
- Ruiz, R.L.T. **Análise de populações de *Bryconamericus iheringii* (Characiformes: Characidae) da bacia do Rio Tibagi, Paraná**. 2007. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Santos, A.C.; Morelli, S. Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do triângulo mineiro. **Biosci J**, v.22, n.1, p.145-150. 2006.

Santos, A.R.; Rubert, M.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**. 2012. 000: 001–010. 2012. doi: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x

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

Schweizer, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet Cell Genetics**, v.27, p.190-193, 1980.

Schweizer, D.; Loidl, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band pattern. Stahl A, Luciani JM and Vagner-Capodano AM (eds) *Chromosome Today*. 1st edition, v. 9. Allen & Unwin, New York, pp 61-74. 1987.

Silva, J.F.P. Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.2, n.2, p.55-60, 2004.

Silva, L.L.L.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, using in situ hybridization with 18S rDNA probe, DAPI and CMA₃ staining. **Folia Biologica (Kraków)** 60: 3-4. 2012.

Souza I.L.; Moreira-Filho, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae) I – Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia** 60: 1-11. 1995.

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

Torres-Mariano, A.R.; Morelli, S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v.66, n.1, p.161-165, 2006.

Torres-Mariano, A.R.; Morelli, S. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.246-249, 2008.

Vicari, M.R.; Noleto, R.B.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.173-179, 2008a.

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

Vicente, V.E.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet**, 74: 70-75. 1996.

Wasko, A.P.; Venere, P.C.; Galetti Júnior, P.M. Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.2, p.225-230, 1996.

Wasko, A.P.; Galetti Jr, P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**, v.94, p.185–193, 1998.

Wasko, A.P.; Galetti Jr, P.M. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). **Cytologia**, v.64, p.63-67, 1999.

Winkaler, E.U.; Silva, A.G.; Galindo, H.C.; Martinez, C.B.R. Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, Paraná State. **Acta Scientiarum**. v.23, n.2, p 507-514, 2001.