



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA BEATRIZ GOES FERNANDES MONTEIRO

**“ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ESPÉCIES DE PEIXES  
DA FAMÍLIA CHARACIDAE”**

---

Londrina  
2017

ANA BEATRIZ GOES FERNANDES MONTEIRO

**“ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM 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 para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: *Dra. Lucia Giuliano Caetano*

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Monteiro, Ana Beatriz Goes Fernandes.

Análises Citogenéticas em Espécies de Peixes da Família Characidae / Ana Beatriz Goes Fernandes Monteiro. - Londrina, 2017.  
52 f. : il.

Orientador: Lucia Giuliano Caetano.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética - Tese. 2. Peixes - Tese. 3. Heterocromatina - Tese. 4. Rearranjos Cromossômicos - Tese. I. Giuliano Caetano, Lucia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

ANA BEATRIZ GOES FERNANDES MONTEIRO

**“ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM 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 para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa Dra Lucia Giuliano Caetano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dra Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dra Sandra Morelli  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Londrina, 20 de fevereiro de 2017

**Dedico esse trabalho as três mulheres da  
minha vida: minha mãe Rossana Fernandes, minha avó Maria Aparecida  
Fernandes e minha irmã Maria Helena Monteiro.**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

## **AGRADECIMENTOS**

“Nunca atribua unicamente a você o sucesso dessa ou daquela tarefa, compreendendo que em todo trabalho há que considerar o espírito de equipe”.

Francisco Cândido Xavier

À Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós Graduação e ao Laboratório de Citogenética Animal (LACA) pelo espaço e estrutura laboratorial para realização deste trabalho;

À CAPES, órgão de fomento à pesquisa científica, pelo apoio financeiro;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano, por ter me acolhido no laboratório, pela confiança e por todos os ensinamentos que aumentaram ainda mais meu carinho pela Citogenética. Obrigada por ter me ensinado o que eu sei de citogenética, e tenho certeza, que ainda tenho muito a aprender com você.

Às professoras Ana Lúcia Dias e Renata da Rosa pelo aprendizado e carinho de sempre e à todos os colegas de laboratório que estão ou que passaram pelo laboratório: Poliana, Fábio, Raquel, Rachel, Angélica Rossoti, Angélica Tiepo, Mariana, Juceli, Matheus, Thainá, Brenda, Mariana Terra e Joana por terem feito meus dias no laboratório mais felizes e por estarem sempre prontos a me ajudar.

Aos amigos de graduação, que permaneceram ao meu lado mesmo depois que o destino nós levou para caminhos e lados diferentes: Dani, Ana Paula, Fernando, Luane, Bruna Scapin e tantos outros que foram mais do que amigos, foram minha família durante todo esse tempo e estiveram comigo em todos os momentos de alegria, de festas e também de tensão;

Aos amigos de pós Graduação: Camila, Jaque e Thaíssa, que riram, choraram e me ajudaram sempre que precisei. Obrigada por todos os téris, combos e sucos de laranja nesses dois anos;

Ao meu amigo, parceiro, namorado e companheiro de todas as horas Allan, pela sua paciência, por ser meu porto seguro, pelo apoio de sempre e por ser um dos meus maiores incentivadores! Eu amo você!

À minha família, em especial à minha mãe Rossana, minha avó Cidinha e minha irmã Leninha pelo apoio, por todo esforço para que eu pudesse estudar e realizar meu sonho, mesmo sabendo que o caminho era longo e difícil. O empenho e dedicação é o mínimo que eu posso fazer para recompensar a confiança que vocês sempre depositaram em mim. Eu amo vocês mais do tudo!

À Deus por me fortalecer física e emocionalmente.

MONTEIRO, Ana Beatriz Goes Fernandes. “**Análises Citogenéticas em Espécies de Peixes da Família Characidae**”. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A família Characidae é composta por um grande número de peixes distribuídos por toda a região Neotropical. Devido a sua elevada diversidade esse grupo apresenta algumas incertezas referentes tanto a sua identificação quanto as suas relações filogenéticas, por isso ao longo do tempo muitos integrantes dessa família apresentaram modificações na sua classificação. Diante disso muitos gêneros taxonomicamente confusos foram alocados em *Incertae sedis*, porém estudos recentes sugerem um novo agrupamento de alguns gêneros como é o caso de *Astyanax* e *Markiana*. Ambos despertam interesse da citogenética, o primeiro gênero por possuir uma grande diversidade cariotípica e o segundo pela falta de dados citogenéticos. Sendo assim o presente trabalho analisou citogeneticamente exemplares de *Astyanax* aff. *fasciatus* de três diferentes localidades: Ribeirão Três Bocas/ PR, Rio Laranjinha/ PR e Ribeirão Jacú/ SP e *Markiana nigripinnis* do Rio Miranda/MS com o objetivo de fornecer dados sobre a estrutura e evolução cariotípica dessas espécies. A população do Ribeirão Três Bocas apresentou três fórmulas cariotípicas diferentes denominadas: A- 10m +16sm +20st-a; D- 10m+20sm+16st-a e H-8m+16sm+22st-a, enquanto que as populações do Rio Laranjinha e do Ribeirão Jacú apresentaram apenas um cariótipo cada: A-8m+22sm+16st-a e D-10m+16sm+20st-a, respectivamente. O bandamento C evidenciou padrões distintos de heterocromatina para cada localidade, onde cada fórmula cariotípica apresentou quantidade e distribuição diferenciada. A coloração com os fluorocromos base-específicos demonstrou a heterocromatina dos cariótipos A e D do Ribeirão Três Bocas exclusivamente CMA<sub>3</sub>, enquanto que o cariótipo H apresentou heterocromatina CMA<sub>3</sub> e DAPI positivos. As populações do Rio Laranjinha e do Ribeirão Jacú apresentaram heterocromatina tanto CMA<sub>3</sub> quanto DAPI positivos, com maior número de marcações ricas em pares de base AT. A grande diversidade genética observada em *Astyanax* aff. *fasciatus* corrobora com a hipótese da existência de um complexo de espécies. Os espécimes de *M. nigripinnis* analisados apresentaram número diploide 2n=52 e fórmula cariotípica: 32 sm + 20 st-a, com constrição secundária no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, coincidentes com a RON, com a sonda de DNAr 18S e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. O bandamento C revelou marcações na região pericentroméricas e intersticiais proximais em cromossomos st-a, sendo alguns desses cromossomos DAPI<sup>+</sup>. A FISH com sonda DNAr 5S apresentou um par com marcação intersticial. Os dados citogenéticos para *Markiana nigripinnis* se mostraram semelhantes ao observados para outras espécies da subfamília Stevardiinae geraram informações importantes que apoiam as hipóteses mais recentes que sugerem o posicionamento de *M. nigripinnis* dentro da subfamília Stevardiinae.

**Palavras- chaves:** *Astyanax*. Diversidade Cariotípica. Rearranjos Cromossômicos. Heterocromatina. Stevardiinae.

MONTEIRO, Ana Beatriz Goes Fernandes. “**Cytogenetic Analyzes in Fish Species of the Characidae Family**”. 2017. 52 p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina , Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The Characidae family is composed of a large number of fish distributed throughout the Neotropical region. Due to their high diversity this group presents some uncertainties regarding both their identification and their phylogenetic relationships, so over time many members of this family presented modifications in their classification. Faced with this, many taxonomically confused genres were allocated to *Incertae sedis*, but recent studies suggest a new grouping of some genera such as *Astyanax* and *Markiana*. Both arouse interest in cytogenetics, the first genus because it has a great karyotype diversity and the second because of the lack of cytogenetic data. Thus the present work analyzed cytogenetically specimens of *Astyanax* aff. *fasciatus* from three different localities: Três Bocas Stream/PR, Laranjinha River/PR and Jacú Stream/SP and *Markiana nigripinnis* from the Miranda River/MS with the objective of providing data on the structure and karyotype evolution of these species. The population of Ribeirão Três Bocas presented three different karyotype formulas denominated A-10 metacentric (m) +16 submetacentric (sm) +20 subtelo-acrocentric (st-a); D-10m + 20sm + 16st-a and H-8m + 16sm + 22st-a, while the populations of the Laranjinha River and Jacú Stream presented only one karyotype each: A-8m + 22sm + 16st- A and D-10m + 16sm + 20st-a, respectively. C-banding showed distinct patterns of heterochromatin for each locality, where each karyotype formula had a different quantity and distribution. The staining with the base-specific fluorochromes demonstrated the heterochromatin of the Karyotypes A and D of the Três Bocas Stream exclusively CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, whereas the karyotype H presented CMA<sub>3</sub> heterochromatin and DAPI positive. The populations of Laranjinha River and Jacu Stream presented both CMA<sub>3</sub> and DAPI positive heterochromatin, with a higher number of markers rich in AT base pairs. The great genetic diversity observed in *Astyanax* aff. *fasciatus* corroborates the hypothesis of the existence of a species complex. The specimens of *M. nigripinnis* analyzed presented diploid number 2n = 52 and karyotype formula: 32 sm + 20 st-a, with secondary constriction in the long arm of a pair of submetacent chromosomes, coincident with NOR, with the 18S and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> rDNA probe. C-banding revealed placements in the proximal pericentromeric and interstitial regions on st-a chromosomes, some of these chromosomes being DAPI<sup>+</sup>. FISH with 5S rDNA probe showed a pair with interstitial labeling. The cytogenetic data for *Markiana nigripinnis* were similar to those observed for other species of the subfamily Stevardiinae and generated important information to support the more recent hypotheses that suggest the positioning of *M. nigripinnis* within the subfamily Stevardiinae.

**Keywords:** *Astyanax*. Karyotype Diversity. Chromosome Rearrangements. Heterochromatin. Stevardiinae.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

- Figura 1** - Mapa evidenciando os locais de coleta das espécies analisadas no presente estudo. 1- Ribeirão Três bocas- Londrina/PR; 2- Rio Laranjinha- Ribeirão do Pinhal/PR; 3- Ribeirão Jacú- Cândido Mota/SP e 4- Rio Miranda/MS .....12
- Figura 2** - Figura 2: Espécies analisadas no presente estudo: A- *Astyanax* aff. *fasciatus* e B- *Markiana nigripinnis*.....12

### Capítulo 1

- Figura 1** - Cariótipos encontrados em *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR. A- Cariótipo I; B- Cariótipo II e C- Cariótipo III.....28
- Figura 2** - Cariótipos encontrados em *Astyanax* aff. *fasciatus* do Rio Laranjinha (A) e do Ribeirão Jacú (B) .....29
- Figura 3** - Pares cromossômicos de *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas com blocos heterocromáticos obtidos após a técnica de banda C nos diferentes cariótipos.. A- Cariótipo I; B- Cariótipo II e C- Cariótipo III.....30
- Figura 4** - Pares cromossômicos de *Astyanax* aff. *fasciatus* com blocos heterocromáticos obtidos após realização da técnica de banda C. A- Ribeirão Laranjinha e B- Ribeirão Jacu. O asterisco indica o par de cromossomos com blocos intersticiais observado em único indivíduo da população do Ribeirão Jacú.....30
- Figura 5** - Metáfases somáticas de *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas, submetidas à coloração sequencial de CMA<sub>3</sub> (A, C e E) e DAPI (B,D e F). Cariótipo I (A e B); Cariótipo II (C e D); Cariótipo III (E e F) .....31
- Figura 6** - Metáfases somáticas de *Astyanax* aff. *fasciatus* submetidas à coloração sequencial de CMA<sub>3</sub> (A e C) e DAPI (B e D). Rio Laranjinha (A e B) e Ribeirão Jacu (C e D) .....32

## Capítulo 2

- Fig. 1 -** A- Cariótipo de *Markiana nigripinnis* com coloração convencional com Giemsa; B- Metáfase somática submetida à técnica de Banda C; C e D- Metáfases somáticas com coloração de CMA<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente. No Box par cromossômico AgNOR.....44
- Fig. 2 -** Metáfases somáticas de *Markiana nigripinnis* com hibridação fluorescente *in situ*: A- Sonda de DNAr 5S e B- Sonda de DNAr 18S.....46

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

- Tabela 1** - Citótipos encontrados em exemplares de *Astyanax* aff. *fasciatus* pertencentes ao Ribeirão Três Bocas- Londrina/ PR observados por Koguissi (1995) e Lacerda (2013). m-sm=meta-submetacêntrico, st-a=subtelo-acrocêntrico.....5
- Tabela 2** - Cariótipos de *Astyanax fasciatus* identificados por Pazza *et al.* (2006). m= metacêntrico, sm= submetacêntrico, st= subtlocêntrico e a= acrocêntrico .....6

### Capítulo 1

- Tabela 1** - Citótipos encontrados em *Astyanax* aff. *fasciatus* por Koguissi (1995), Lacerda (2013) e no presente trabalho. m-sm= meta-submetacêntrico, st-a= subtelo- acrocêntrico.....27

### Capítulo 2

- Tabela 1** - Número diploide e fórmula cariotípica disponível para algumas espécies pertencentes à subfamília Stevardiinae .....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

2n	Número Diplóide;
AgRON	Região Organizadora de Nucléolo impregnada com Nitrato de Prata;
AT	Adenina- Timina;
CMA <sub>3</sub>	Cromomicina A <sub>3</sub> ;
DAPI	Diamidino- 2- fenilindol;
DNAr	Ácido Desoxirribonucléico ribossômico;
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente;
GC	Guanina- Citosina;
m	Cromossomo metacêntrico;
RON	Região Organizadora de Nucléolo;
sm	Cromossomo submetacêntrico;
st-a	Cromossomo subteloicêntrico- acrocêntrico;

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1	Aspectos Citogenéticos Gerais de Characidae.....	2
2.2	Aspectos Gerais e Citogenéticos de <i>Astyanax</i> aff. <i>Fasciatus</i> .....	4
2.3	Aspectos Gerais de <i>Markiana nigripinnis</i> .....	7
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
3.1	Objetivo Geral.....	8
3.2	Objetivos Específicos.....	8
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
4.1	Materiais e Locais de Coleta.....	8
4.2	Metodologia.....	9
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1: Variabilidade Cariotípica em populações de <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (Characiformes)</b> .....		<b>18</b>
	<b>REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 2: Considerações Citogénéticas Sobre o Relacionamento de <i>Markiana nigripinnis</i> dentro da Família Characidae (Characiformes)</b> .....		<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes apresentam-se como um grupo de vertebrados bastante diversificado. Essa grande diversidade dificulta a organização de sua classificação ictiológica e o entendimento de sua história evolutiva (Nelson, 2006).

A região Neotropical caracteriza-se por possuir uma grande variedade de peixes dulcícolas (Lowe e McConnell, 1999). As duas ordens que apresentam maior número de representantes nesta região são os Characiformes e os Siluriformes. Devido a isso, essas ordens são de grande interesse para estudos citogenéticos, levantando informações como: número diplóide, fórmula cariotípica, presença de cromossomos sexuais diferenciados, cromossomos supranumerários, padrões de distribuição da heterocromatina e localização dos sítios de DNAr.

Entre os membros da ordem Characiformes, a família Characidae é uma das mais complexas, sendo composta de uma diversidade de formas que lhes permitiram ocupar diversos ambientes, com diferentes processos alimentares e estratégias reprodutivas (Graça e Pavanelli, 2007). Porém, essa mesma característica dificulta sua classificação e a relação de parentesco de seus integrantes (Lucena 1993).

Nos últimos anos, uma melhor definição das relações entre as principais linhagens dentro de Characidae está surgindo, baseada principalmente em evidências fornecidas por características moleculares e osteológicas buscando contribuir com o conhecimento das relações filogenéticas dentro deste grupo.

Em análises osteológicas, Mirande (2010) propõe que alguns integrantes do gênero *Incertae sedis* seriam parte de um ramo de Characidae, chamado "clado *Astyanax*". Nessa mesma hipótese, *Markiana nigripinnis* que, até o momento, tinha uma posição indefinida na família, faria parte do "clado *Astyanax*" juntamente com algumas espécies deste gênero, indicando uma suposta relação de *Markiana* com o gênero *Astyanax*.

Outra reestruturação proposta por Mirande (2010) foi tornar Stevardiinae um grupo mais abrangente, composto por algumas espécies dos gêneros: *Bryconamericus*, *Hemibrycon*, *Cyanocharax*, *Knodus*, *Aulixidens*, *Attonitus*,

*Acobrycon*, *Pseudocorynopoma*, *Mimagoniatus*, *Diapoma*, *Odontostoechus*, *Nantis*, *Piabina* e *Creagrutus*.

Dentro da família Characidae a grande quantidade de dados citogenéticos relatada para algumas espécies, como *Astyanax fasciatus*, contrasta com a escassez de estudos em alguns gêneros como em *Markiana nigripinnis*, por isso mais estudos citogenéticos neste grupo, além do aumento da documentação cariótica, podem contribuir com dados que auxiliem a classificação das espécies e, também, para o esclarecimento das relações evolutivas entre os integrantes da família Characidae.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS CITOGENÉTICOS GERAIS DE CHARACIDAE

A ordem Characiformes é composta por 23 famílias com mais de 2000 espécies, atingindo maior representatividade na região Neotropical sendo um dos maiores grupos de peixes de água doce (Eschmeyer e Fong, 2015).

Entre as famílias mais representativas de Characiformes, Characidae comporta espécies com portes variados e encontrados nas principais bacias hidrográficas, compondo também populações isoladas em riachos (Buckup *et al.* 2007). Seus representantes geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas conhecidos popularmente como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, entre outros. São um dos maiores grupos de peixes dulcícolas, distribuídos nos continentes americanos, desde a fronteira México-Estados Unidos até o Sul da Argentina (Reis *et al.* 2003).

Os estudos cromossômicos na família Characidae mostram uma grande variabilidade numérica, de  $2n=28$  em *Hemigrammus sp.* (Characidae) a  $2n=52$  em *Cheirodon stenodon* (Cheirodontinae) com predominância de  $2n=48$  e  $2n=50$  (Oliveira *et al.* 2009). Também são observadas variações estruturais tanto em espécies de um mesmo gênero (Morelli *et al.* 1983), como entre populações da mesma espécie (Moreira-Filho e Bertollo, 1991), sendo atribuído aos rearranjos robertsonianos e inversões pericêntricas as variações cariotípicas observada em muitos Characidae.

Mesmo apresentando uma ampla variabilidade cariotípica, os integrantes da família Characidae apresentam em comum a presença de dois grandes cromossomos metacêntricos, que correspondem ao primeiro par do complemento A, sendo esta característica presente na maioria dos integrantes deste grupo (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2005).

As análises das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) são de grande importância na caracterização cariotípica da família Characidae, podendo ser caracterizados pela presença de RONs simples como em Bryconinae (Travanzoli *et al.* 2015), múltiplas como em Serrasalminae (Nakayama, *et al.* 2012) e outros grupos apresentando tanto RONs múltiplas e simples como o observado em *Astyanax* (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007). Com relação a coloração com fluorocromos base-específicos, é observado, em grande maioria, uma coincidência de localização entre as AgRONs e as marcações CMA<sub>3</sub> positivas, porém alguns sítios de heterocromatina detectados por banda C e positivos para coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> podem não estar relacionados com as AgRONs (Souza *et al.* 2001).

Junto com as RONs, a heterocromatina é de grande importância para a diversificação cariotípica dentro dessa família, como para o gênero *Astyanax*, onde os blocos heterocromáticos foram utilizados na caracterização populacional, polimorfismo e evolução (Pazza, 2006; Kavalco e Almeida-Toledo, 2007; Vicari *et al.* 2008)

Também podem ser observados para a família Characidae a ocorrência de poliploidia e diferentes tipos de heteromorfismo ligado ao sexo (Cavallaro, 2000) e também a presença de cromossomos supranumerários (Moreira-Filho *et al.* 2001)

As análises citogenéticas na família Characidae fornecem dados que contribuem para o conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos (Nirchio e Oliveira, 2006), auxiliando na caracterização das espécies de forma mais completa ou contribuindo com informações para espécies taxonomicamente problemáticas (Medrado, 2015), além de possibilitar o entendimento da ocorrência de casos de polimorfismos cromossômicos e diferentes cariótipos em algumas espécies (Kasahara, 2009).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS E CITOGENÉTICOS EM *Astyanax aff. fasciatus*

O gênero *Astyanax* compreende os peixes conhecidos popularmente com lambaris ou piabas, sendo encontrados na região Neotropical, desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina (Eigenmann, 1921). Vivem em cardumes podendo ser encontrados desde cabeceiras a cursos principais de rios, próximos a manguezais e também no interior de cavernas (Parry *et al.* 2003).

Este gênero desperta o interesse dos estudos citogenéticos, pelo fato de ser constituído por espécies com diferentes tendências evolutivas e por uma elevada variabilidade cromossômica, numérica e estrutural. (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007).

Dentre as espécies deste gênero destaca-se *Astyanax fasciatus*, que foi descrita pela primeira vez por Cuvier, sendo a espécie tipo referente ao Rio São Francisco. É considerada como pertencente a um complexo de espécies, proposto pela primeira vez por Justi (1993) e afirmado posteriormente por Garuti e Bristki (2000), pelo fato de ser possível diferenciar diversas formas morfológicas e cariotípicas, indicando a existência de populações bem diferenciadas ao longo dos sistemas hidrográficos brasileiros.

Melo (2005), em seu trabalho baseado na análise das espécies tipo e material adicional comparativo proveniente do Rio São Francisco e de outras bacias hidrográficas incluindo a América Central, recomendou que o nome *Astyanax fasciatus* deve ser aplicado somente a exemplares do Rio São Francisco. Outras formas de *Astyanax* de modo geral que são assinaladas como *A. fasciatus*, pertencentes à outras bacias hidrográficas devem representar espécies novas deste gênero.

O extenso trabalho realizado por Melo (2005) foi a primeira revisão consistente para as espécies do complexo *A. fasciatus* devido a meticulosidade de suas análises, sendo que os dados citogenéticos corroboram para a hipótese de um complexo de espécies, evidenciando uma elevada variação quanto ao número diploide de  $2n=45$  (Daniel-Silva, 1996; Pazza *et al.* 2006) até  $2n=50$  cromossomos (Artoni *et al.* 2006), e também quanto a sua estrutura, resultando em diferentes cariótipos.

Koguissi (1995 apud Dias e Giuliano-Caetano, 2003), citam que estudos realizados por Koguissi (1995) numa população de *Astyanax* sp. (revisto como *A. aff. fasciatus*) do Ribeirão Três Bocas/PR, identificando cinco citótipos diferentes (Tabela 1). Estes citótipos mantinham o número diplóide constante igual a 46, no entanto, possuíam diferentes fórmulas cariotípicas com diferentes padrões de distribuição de heterocromatina.

Lacerda (2013) analisou exemplares de *A. aff. fasciatus* do Ribeirão Três Bocas e Jacutinga, que apresentaram  $2n=46$  e a caracterização de quatro fórmulas cariotípicas sendo duas diferentes de Koguissi (1995), sendo que a população do Ribeirão Jacutinga apresentou somente uma das fórmulas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Citótipos encontrados em exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* pertencentes ao Ribeirão Três Bocas- Londrina/ PR observados por Koguissi (1995) e Lacerda (2013). m-sm=meta-submetacêntrico, st-a=subtelo-acrocêntrico.

Cariótipos	Koguissi (1995)		Lacerda (2013)	
	m-sm	st-a	m-sm	st-a
<b>A</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>20</b>
B	27	19	-	-
C	28	18	-	-
D	30	16	-	-
<b>E</b>	<b>34</b>	<b>12</b>	<b>34</b>	<b>12</b>
F	-	-	31	15
G	-	-	35	11
H	-	-	-	-

Pazza *et al.* (2006) analisaram exemplares de *Astyanax fasciatus* de diferentes localidades pertencentes ao Rio Mogi-Guaçu/SP tendo observado dois citótipos com  $2n=48$  e  $2n=46$  e complemento normal com todos cromossomos pareados, além de outras seis variantes. Os cariótipos variantes diferem tanto na fórmula cariotípica

quanto no número diploide, como se pode observar na Tabela 2. Os autores acima citados propuseram que o surgimento das variantes devem ter se originado a partir de cruzamentos entre esses cariótipos principais e seus descendentes.

**Tabela 2:** Cariótipos de *Astyanax fasciatus* identificados por Pazza *et al.* (2006). m=metacêntrico, sm=submetacêntrico, st=subtelocêntrico e a=acrocêntrico.

<b>Locais de Coleta</b>	<b>2n</b>	<b>m</b>	<b>sm</b>	<b>st</b>	<b>a</b>
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	45	12	20	10	3
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	46	12	20	10	4
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	47	12	19	10	6
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	47	12	21	10	4
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	47	12	20	10	5
Cachoeira das Emas (Pirassununga) SP	48	8	22	12	6
Rio Mogi-Guaçu (Ouro fino) - MG	47	12	20	10	5

Artoni *et al.* (2006), analisando quatro populações do Alto Rio Tibagi evidenciaram três citótipos diferentes em simpatia: Citótipo A com  $2n=48$  e fórmula cariotípica  $8m+ 18sm+ 14st+ 10a$  e Citotipo B e C  $2n= 50$  com  $8m+ 18sm+ 14st+10a$ . Quanto à distribuição de heterocromatina, os citótipos A e B se mostraram muito semelhantes, com marcações localizadas nas regiões terminais do braço longo dos cromossomos acrocêntricos, enquanto que no citótipo C os blocos heterocromáticos estavam presentes na região intersticial. Dados morfológicos também foram empregados nesse estudo, que somados com os dados citogenéticos, reforçam a proposta de Justi (1993) de que *Astyanax fasciatus* compõem um complexo de espécies.

### 2.3 ASPECTOS GERAIS DE *Markiana nigripinnis*

A espécie *Markiana nigripinnis*, popularmente conhecida como lambari do campo, foi descrito originalmente como *Tetragonopterus nigripinnis* Perugia 1891, baseado em caracteres morfológicos. Caracteriza-se por ser um peixe de pequeno porte, atingindo cerca de 10 centímetros de comprimento, com escamas crenuladas cobrindo parcialmente os lobos caudais e a nadadeira anal, e listras em forma de ziguezague ao longo do corpo (Britski *et al.* 1999). É considerada uma espécie bentopelágica, com hábito alimentar onívoro, comumente encontrado no sistema do Pantanal de Mato Grosso do Sul, sendo nativa das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Mamoré, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Lima *et al.* 2003).

O gênero *Markiana* foi inicialmente reconhecido como *Incertae sedis* na família Characidae. Mirande (2010) propôs uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertae Sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado “clado *Astyanax*”, indicando uma suposta relação de *Markiana* com o gênero *Astyanax*.

A partir da análise estrutural de espermatozoides, Baicere-Silva *et al.* (2011), evidenciaram que *M. nigripinnis* compartilha o mesmo padrão de espermiogênese e morfologia espermática encontrados para os membros não inseminadores da subfamília Stevardiinae, além da presença de quatro dentes na série interna do pré-maxilar e ectopterigóide triangular curto, demonstrando uma relação próxima entre *Markiana nigripinnis* e membros de Stevardiinae. Essa hipótese foi confirmada por Oliveira *et al.* (2011) através de estudos com base na análise filogenética de sequências de DNA de dois genes mitocondriais e três genes nucleares, e também por Thomaz *et al.* (2015) a partir da análise molecular utilizando dados de sequências de DNA a partir de sete fragmentos de genes, onde é proposta uma nova filogenia para Stevardiinae, com *M. nigripinnis* fazendo parte desta subfamília.

Devido a imprecisão em relação a sua posição filogenética, *M. nigripinnis* torna-se uma excelente espécie para estudos citogenéticos, os quais são inexistentes, e que, juntamente com dados morfológicos e taxonômicos podem fornecer

informações que vão servir de auxílio na definição da relação dessa espécie com os demais membros da família Characidae.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, por meio de diferentes técnicas citogenéticas, exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* de diferentes localidades, a fim de ampliar o conhecimento sobre a sua organização cariotípica, devido à elevada variabilidade estrutural relatada para essa espécie, contribuindo para o entendimento de sua evolução cariotípica e também analisar exemplares de *Markiana nigripinnis*, da bacia do Rio Paraguai, auxiliando na incorporação de novos dados a fim de melhor relacionar esta espécie dentro da família Characidae.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o número diplóide e fórmula cariotípica;
- Evidenciar o padrão de distribuição das regiões heterocromáticas;
- Verificar a atividade das regiões organizadoras de nucléolos por meio da impregnação por nitrato de prata;
- Coloração com fluorocromos base específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI para determinar sítios cromossômicos ricos em pares de bases GC e AT;
- Determinar a localização dos sítios de DNAr 18S e 5S por meio da Hibridação fluorescente *in situ* (FISH);

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 MATERIAIS E LOCAIS DE COLETA

Os exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* foram coletados em três localidades: Ribeirão Três Bocas, Londrina-PR, no Parque Ecológico Dr. Daisaku Ikeda, na antiga Usina Três Bocas; Rio Laranjinha, no município de Ribeirão do Pinhal – PR, coletados logo abaixo da barragem e Ribeirão Jacu, no município de Cândido Mota- SP (Figura 1 e 2). Os indivíduos de *Markiana nigripinnis* foram coletados no rio Miranda, município

de Corumbá, Mato Grosso do Sul (Figuras 1 e 2). As coletas foram realizadas com autorização 11399-1 (IBAMA-SISBIO), com auxílio de tarrafas e peneiras.

## 4.2 METODOLOGIA

### **Obtenção de cromossomos mitóticos**

A técnica utilizada foi adaptada para peixes por Bertollo *et al.* (1978) que consiste em:

Foi injetada nos peixes, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de colchicina 0,0125%, na proporção de 1ml/100g de peso animal. Após 30 minutos em aquário aerado, os exemplares foram anestesiados com óleo de cravo, por aproximadamente 15 minutos e após sacrificados para a retirada do rim anterior, que foi colocado em placas de petri contendo cerca de 6-10ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e fragmentado com pinças de dissecação. Esta solução foi então homogeneizada com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha para que ocorresse a separação das células.

Posteriormente, a suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37°C, durante 30 minutos. Decorrido este tempo, o material foi pré-fixado com 10 gotas de fixador (metanol: ácido acético – 3:1) e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado com pipeta Pasteur. Então, foram adicionados de 5-7ml de fixador, o material foi novamente homogeneizado com a pipeta Pasteur e em seguida novamente centrifugado. Este procedimento de retirada do sobrenadante e centrifugação foi repetido de 2-3 vezes.

Após a última centrifugação e retirada do sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador. O material foi armazenado em microtubos de 1,5 ml e acondicionado em freezer. De 2-3 gotas da suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina, que foi corada com Giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5-8 minutos; e em seguida lavada com água destilada. A secagem ocorreu ao ar e na sequência, as lâminas foram analisadas ao microscópio.

## **Classificação cromossômica**

Os cromossomos foram analisados em microscópio Leica DM 2000 e as imagens capturadas por meio do software Motic Images Plus 2.0. Para a montagem dos cariótipos a classificação dos cromossomos teve por base a relação entre os braços (RB) maior/menor proposta por Levan *et al.* (1964), que considera:

- RB= 1,00 - 1,70 / metacêntrico (m);
- RB= 1,71 - 3,00 / submetacêntrico (sm);
- RB= 3,01 - 7,00 / subtlocêntrico (st);
- RB= > 7,00 / acrocêntrico (a).

## **Caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs)**

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos foi feita conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980):

Sobre a lâmina preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, foi colocada 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (1 g de gelatina em 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada mais 0,5 mL de ácido fórmico). Em cima da gota anterior, foram colocadas 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% (0,5 g AgNO<sub>3</sub> em 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada) e cobertas com lamínula. Logo após, a lâmina foi incubada em estufa a 60 °C, por um período de aproximadamente 5 minutos, para que adquirisse uma coloração marrom dourada. Após esse tempo, a lâmina foi retirada da estufa e a lamínula foi removida com a ajuda de um jato de água destilada e posteriormente deixada secar ao ar.

## **Detecção das regiões de heterocromatina (Banda C)**

Para o estudo da heterocromatina foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico (HCl 0,2N) a 42°C durante 15 minutos. Após esse tempo foram lavadas em água destilada e na sequência, incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 37°C por 45 segundos. Terminado este tratamento, as lâminas foram lavadas rapidamente em HCl 0,2N e água destilada. Depois de secarem ao ar, foram incubadas em solução salina 2XSSC

a 60°C por 25-30 minutos. Para finalizar, foram lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 2%.

### **Coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub>/ DAPI**

A técnica utilizada foi descrita por Schmid (1980) com algumas modificações:

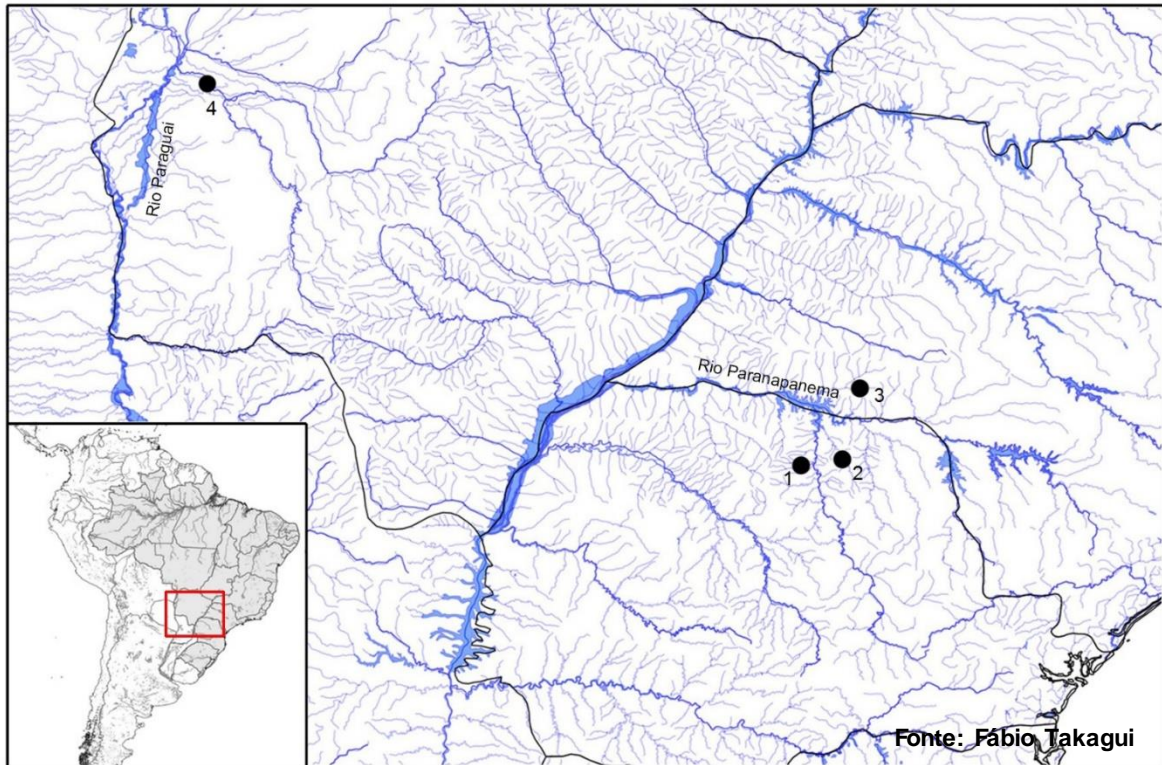
Sobre uma lâmina previamente preparada foram colocados 40 µL de Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) 0,5 mg/ml. Após uma hora no escuro esta lâmina foi lavada. Após a secagem foram adicionados 40 µL de DAPI (4'-6'diamidino - 2' - fenilindol) 0,2 µg/mL. A lâmina ficou no escuro por 15 minutos. Na sequência, após a lavagem e secagem foi adicionado o meio de montagem glicerol/Mcllvaine. A análise foi feita depois de 7 dias.

### **Hibridação *in situ* por fluorescência – FISH**

O protocolo descrito a seguir foi baseado nos procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com modificações:

As lâminas foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação para FISH consistiu em 12 µL de sonda (7,5 µL de 18S e 2 µL de 5S), 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridização foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridização as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 45°C por 5 minutos cada; uma vez em 1xPBS por 10 minutos a 45°C; e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 µL 20xSSC, 6 ml Triton 100, 10g leite desnatado em pó, 800ml de água destilada). Para detecção do sinal foi utilizada uma solução contendo 0,5 µL de anti-Digoxigenina + 5 µL de FITC (1:100) + 44 µL de BSA 5%, por lâmina, durante 60 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada, os cromossomos foram corados com DAPI (50µg/ml). As lâminas

foram analisadas em microscópio de epifluorescência com câmera Leica DFC 300FX. Para captura das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite V 3.1.0.



**Figura 1:** Mapa evidenciando os locais de coleta das espécies analisadas no presente estudo. 1- Ribeirão Três bocas- Londrina/PR; 2- Rio Laranjinha- Ribeirão do Pinhal/PR; 3- Ribeirão Jacú- Cândido Mota/SP e 4- Rio Miranda/MS



**Figura 2:** Espécies analisadas no presente estudo: A- *Astyanax* aff. *fasciatus* e B- *Markiana nigripinnis*.

## Referências Bibliográficas

- ARTONI, R.F., SHIBATTA, O.A.; GROSS, M.C., SCHNEIDER, C.H., ALMEIDA, M.C., VICARI, M.R., BERTOLLO, L.A.C. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4(2), p. 197-202.
- BAICERE-SILVA, C.M., BENINE, R.C., QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2011. *Markiana nigripinnis* (Perugia, 1891). 2011. As a putative member of the subfamily Stevardiinae (Characiformes: Characidae): spermatic evidence. **Neotrop. Ichthyol**, vol.9, N.2, pp.371-376. ISSN 1679-6225.
- BERTOLLO L.A.C.; TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil. Genet.**, 1: 103-120.
- BRITSKI, H.A., SILIMON, K.Z.S., LOPES, B.S. 1999. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília. **Embrapa**, 184 pp.
- BUCKUP, P. A., MENEZES, N. A., GUAZZI, M. S. 2007. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. 195p.
- CAVALLARO, Z.I, BERTOLLO, L.A.C., PERFECTTI, F., CAMACHO, J.P.M. 2000. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Res**, 8:627-634.
- DANIEL-SILVA, M.F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2005. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 497-501.
- DANIEL-SILVA, M. F. Z. 1996. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, IB/USP, São Paulo, 176p.
- DIAS, A. L., GIULIANO-CAETANO, L. 2003. Citogenética de alguns grupos de peixes do rio Tibagi, pp. 473-529. In: M. E. Medri, E. Bianchini, O. Shibatta, J. Pimenta (Org.) **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina.

EIGENMANN, C. H. 1921. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, 43(3): 209-310.

ESCHMEYER, W.N., FONG, J.D. 2015. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. California Academy of Sciences (15 Feb 2015).

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia, Porto Alegre**, 13: 65-88.

GRAÇA, W.J., PAVANELLI, C.S. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. **EDUEM**. Maringá. 241p.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015.

Kasahara, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. 1<sup>a</sup> ed. - Ribeirão Preto, SP. Sociedade Brasileira de Genética 160p.

KAVALCO, K.F., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2007. Molecular cytogenetics of blind Mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 4(2), p. 103-111.

KOGUISSI, N.A. 1995. **Estudo citogenético da espécie *Astyanax sp* provenientes do Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR**. Monografia do Curso de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

JUSTI, A.J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

LACERDA, L.G. 2013. **Variabilidade Cromossômica Estrutural em *Astyanax aff fasciatus***. Tese Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.

LIMA, F.C.T., MALABARBA, L.R., BUCKUP, P.A., PEZZI DA SILVA J.F., VARI, R.P., HAROLD, A., BENINE, R., OYAKAWA, O.T., PAVANELLI, C.S., MENEZES, N.A., LUCENA, C.A.S., MALABARBA, M.C.S.L., LUCENA, Z.M.S., REIS, R. E., LANGEANI, F., CASSATI, L., BERTACO, V.A. GENERA INCERTAE SEDIS IN CHARACIDAE. IN: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C.J. (Eds.). 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, **Edipucrs**, 729p.

LOWE-MCCONNELL, R. 1999. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Editora da USP, São Paulo. 553 p.

LUCENA, C.A.S. 1993. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, 59 Ostariophysii, Characiformes)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 125p.

MEDRADO, A.S. 2015. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2015. **Diversidade genética em pequenos caracídeos do grupo Incertae sedis (Teleostei, Characiformes): Uma abordagem citogenética e molecular com ênfase no complexo de espécies *Astyanax fasciatus***. Tese de Doutorado, Universidade estadual de santa cruz. Ilhéus – BA.

MELO, F.A.G. 2005. **Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819)** (Teleostei: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado, Museu Nacional, UFRJ.

MIRANDE, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotrop. Ichthyol**, [online]., vol.8, n.3, pp.385-568. ISSN 1679-6225.

MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.331-357.

MOREIRA-FILHO, O., FENOCCHIO, A.S., PASTORI, M.C., BERTOLLO, L.A.C. 2001. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, 66: 59-64.

MORELLI, S., BERTOLLO, L.A.C., FORESTI, F., MOREIRA-FILHO, O., TOLEDO-FILHO, A.S. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae), I Karyotypic variability. **Caryologia**, 36: 235-244.

NAKAYAMA, C.M., FELDBERG, E., BERTOLLO, L.A.C. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin. **Neotrop. Ichthyol**, [online] vol.10, n.1, pp.53-58. ISSN 1679-6225.

NELSON, J.S. 2006. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 4<sup>o</sup> Ed.

NIRCHIO, M., OLIVEIRA, C. 2006. **Citogenética de Peces**. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 216 p.

OLIVEIRA, C., FORESTI, F., HILSDORF, A.W.S. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. 2009. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35, p. 81-100.

OLIVEIRA, C., AVELINO, G.S., ABE, K.T., MARIGUELA, T.C., BENINE, R.C., ORTÍ, G., VARI R.P., CORRÊA E CASTRO, R. M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11:275.

PARRY, J.W.L., PEIRSON, S.N., WILKENS, H., BOWMAKER, J.K. 2003. Multiple photopigments from the Mexican blind cavefish, *Astyanax fasciatus*: a microspectrophotometric study - **Vision Res**, 43: 31-41.

PAZZA, R., KAVALCO, K.F., BERTOLLO, L.A.C. 2006. Chromosomo Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I. Karyotype Analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in Sympatric Karyotypes and their Possible Hybrid Forms. **Cytogenetic and Genome Research**, 112: 313-319.

PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS JR, C.J. 2003. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.

SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, 77, 83–103.

SOUZA, I.L., GALIÁN, J., DE LA RÚA, P., BERTOLLO L.A.C., MOREIRA-FILHO, O. 2001. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, 66:85–91.

SUMNER, A.M.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res**, 75: 304-306.

TRAVENZOLI, N.M., SILVA, P.C., SANTOS, U., ZANUNCIO, J.C., OLIVEIRA, C., DERGAM, J.A. 2015. Cytogenetic and Molecular Data Demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) Species from Southeastern Brazil Form a Phylogenetic and Phylogeographic Unit. **PLoS ONE**, 10(9), e0137843.

THOMAZ A.T., ARCILA D., ORTÍ G., MALABARBA, L.R. 2015. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **Evolutionary Biology**, 15 (146): 1-25.

VICARI, M.R., NOLETO, R.B., ARTONI, R.F., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. 2008. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genet. Mol. Biol.**, 31: 173–179.

CAPÍTULO 1:

**Variabilidade cariotípica em diferentes populações de *Astyanax* aff. *fasciatus*  
(Characiformes)**

Este artigo será submetido a revista **Journal of Zoology**.

## Variabilidade cariotípica em diferentes populações de *Astyanax aff. fasciatus* (Characiformes)

Monteiro, A. B. G. F.<sup>1</sup>; Giuliano-Caetano, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Cep 86057-970, Londrina-PR

E-mail: abmonteiro91@gmail.com

### RESUMO

O gênero *Astyanax* constitui um grupo bastante complexo do ponto de vista taxonômico compreendendo uma grande variedade de espécies. *Astyanax fasciatus* é considerado um complexo de espécies baseado na diversidade morfológica e cariotípica encontrada entre as bacias hidrográficas. Apresentam uma ampla variação no número diploide, de  $2n=45$  a  $2n=50$ , e variabilidade estrutural inter e intrapopulacional. No presente trabalho foram analisados exemplares de *A. aff. fasciatus* de três localidades, por meio de análise convencional com Giemsa, do padrão de distribuição da heterocromatina e pela coloração com fluorocromos base-específicos, com a finalidade de melhor compreender os mecanismos de evolução cariotípica desta espécie. Todos os indivíduos apresentaram número diploide constante igual 46 e diferentes fórmulas cariotípicas. A população do Ribeirão Três Bocas apresentou três fórmulas cariotípicas diferentes A-  $10m + 16sm + 20 st-a$ ; D-  $10m + 20sm + 16st-a$  e H-  $8m + 16sm + 22st-a$ , enquanto que as populações do Rio Laranjinha e do Ribeirão Jacú apresentaram apenas um cariótipo cada: A-  $10m + 16sm + 20st-a$  e D-  $8m + 22sm + 16st-a$ , respectivamente. O bandamento C evidenciou padrões distintos de heterocromatina para cada localidade, onde cada fórmula cariotípica apresentou quantidade e distribuição diferenciadas. A coloração com os fluorocromos base-específicos demonstrou a heterocromatina dos cariótipos A e D do Ribeirão Três Bocas exclusivamente CMA<sub>3</sub>, ou seja, rica em pares de bases GC, enquanto que o cariótipo H apresentou heterocromatina CMA<sub>3</sub> e DAPI positivos. As populações do Rio Laranjinha e Ribeirão Jacú mostraram heterocromatina tanto CMA<sub>3</sub> quanto DAPI positivos, com maior número de marcações ricas em pares de base AT. Os resultados comprovam uma grande variabilidade cromossômica em *Astyanax aff. fasciatus* corroborando com a proposta de que pertence a um complexo de espécies.

**Palavras Chaves:** *Astyanax*, Diversidade Cariotípica, Inversão Pericêntrica Heterocromatina, Rearranjos Cromossômicos.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Astyanax* pertencente à família Characidae constitui um grupo bastante complexo do ponto de vista taxonômico, compreendendo uma grande variedade de espécies. Está amplamente distribuído pela região Neotropical, que se estende do território argentino até a fronteira México – Estados Unidos, estando presente nas mais diversas bacias hidrográficas brasileiras (Reis *et al.* 2003).

Neste grupo de peixes são observados alguns complexos de espécies, dentre eles o complexo *Astyanax fasciatus* (Justi, 1993; Pazza *et al.* 2006) apresentando espécies morfológicamente muito semelhantes, mas com grande variabilidade citogenética, envolvendo número diploide, estrutura cariotípica e polimorfismo de blocos heterocromáticos (Pazza e Kavalco, 2007).

Artoni *et al.* (2006), analisando algumas populações de *Astyanax fasciatus*, da bacia do rio Tibagi/PR observaram uma variação no número diplóide de  $2n= 48$  e  $50$ , e um indivíduo com  $49$  cromossomos além de diferentes formas cariotípicas e diferentes padrões de heterocromatina.

Os exemplares do rio Mogi Guaçu (cachoeira de Ema/SP) foram analisados por Pazza *et al.* (2008) revelaram a existência de diferentes citótipos com fórmulas cariotípicas variáveis, sendo encontrados exemplares com  $46$  e  $48$  cromossomos.

Koguissi (1995 apud Dias e Giuliano-Caetano, 2003) analisou a população de *Astyanax aff. fasciatus* do Ribeirão Três Bocas, Londrina-PR, evidenciando a presença de cinco fórmulas cariotípicas diferentes, com um número de cromossomos constante ( $2n=46$ ), além de variação na quantidade e posição de blocos heterocromáticos.

Diante disso, este estudo busca analisar citogeneticamente populações de *A. aff. fasciatus* de diferentes localidades com ênfase na análise da variabilidade cariotípica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 40 exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* coletados em três diferentes localidades: 25 exemplares do Ribeirão Três Bocas, Londrina-PR, coletados no Parque Ecológico Dr. Daisaku Ikeda, antiga Usina Três Bocas; 5 indivíduos do Rio Laranjinha, Ribeirão do Pinhal – PR, coletados logo abaixo da barragem e 10 exemplares Rio Jacú, localizado no município Cândido Mota- SP.

Os procedimentos para obtenção de cromossomos mitóticos foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA nº 9238.2014.84.

Para obtenção de um maior número de células mitóticas, foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular segundo Molina *et al.* (2010), sendo injetado nos indivíduos solução de lisado bacteriano. A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978). Para montagem dos cariótipos foi adotada a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados em: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos e acrocêntricos agrupados (st-a). A técnica de bandeamento C seguiu o protocolo proposto por Sumner (1972), com alterações, sendo corada com Giemsa e com fluorocromos base- específicos Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4' - 6' diamidino - 2' - fenilindol (DAPI) que seguiu o protocolo proposto por Schmid (1980).

## RESULTADOS

Todos os exemplares analisados apresentaram número diplóide 46, porém com variações nas fórmulas cariotípicas. A análise dos cariótipos da população do Ribeirão Três Bocas apresentou três fórmulas cariotípicas distintas: I-10m+16sm+20st-a, II- 10m+20sm+16st-a e III- 8m+16 sm+22 st-a (Figura 1A, B e C). A população do Rio Laranjinha e do Ribeirão Jacú apresentaram somente uma fórmula cariotípica cada: 10m+16sm+20st-a e 8m+22sm+16st-a, respectivamente (Figura 2A e B).

O bandamento C nos indivíduos de *Astyanax aff. fasciatus* do Ribeirão Três Bocas evidenciou padrões distintos de heterocromatina, onde cada fórmula cariotípica apresentou quantidade e localização diferenciadas. O cariótipo I apresentou blocos

de heterocromatina terminais no braço longo em 10 pares de cromossomos sm e st-a (Figura 3A). Já no cariótipo II, foram observados blocos heterocromáticos na região terminal de nove pares de cromossomos sm e st-a, além do par 19, que apresentou blocos de heterocromatina localizados na região intersticial (Figura 3B). O cariótipo III evidenciou seis pares de cromossomos sm e st-a com heterocromatina localizada na região terminal do braço longo (Figura 3C). A população do Rio Laranjinha apresentou blocos heterocromáticos localizados nas regiões terminais de seis cromossomos sm e st-a (Figura 4A). Nos exemplares do Ribeirão Jacú a distribuição da heterocromatina foi observada preferencialmente na região terminal de nove cromossomos sm e st-a, sendo que apenas um indivíduo apresentou um par com blocos heterocromáticos na região intersticial do par 16 (Figura 4B).

A coloração com fluorocromos base-específicos demonstrou que heterocromatina dos cariótipos I e II dos indivíduos pertencentes ao Ribeirão Três Bocas foram exclusivamente CMA<sub>3</sub>, ou seja, ricos em pares de base GC (Figura 5 A,B,C e D), enquanto que o cariótipo III apresentou heterocromatinas CMA<sub>3</sub> e DAPI positivos (Figura 5 E e F).

A população do Rio Laranjinha apresentou alguns blocos de heterocromatina CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, sendo alguns deles também DAPI<sup>+</sup>, porém com um maior número de blocos heterocromáticos DAPI<sup>+</sup> observado, ou seja, regiões ricas em AT (Figura 6A e B). Já os espécimes do Rio Jacú apresentaram blocos CMA<sub>3</sub> positivos localizados na região terminal do braço longo de poucos cromossomos e um predomínio de blocos DAPI positivos localizados na região terminal de alguns cromossomos (Figura 6D e E).

## DISCUSSÃO

A variabilidade cariotípica estrutural já foi observada em *Astyanax fasciatus*, além da maioria das populações estudadas apresentarem variação numérica de  $2n=45, 46, 48$  e  $50$  (Ferreira-Neto *et al.* 2012). O número diplóide de  $2n=46$  é observado em várias populações da bacia do alto rio Paraná, especialmente no rio Araguari (Torres-Mariano e Morelli; 2006), no trecho médio do rio Tietê (Abel *et al.* 2006), na bacia do rio Paranapanema (Pazza *et al.* 2008) e no rio Mogi-Guaçu (Pazza *et al.* 2006).

Em estudo anterior, Koguissi (1995) analisou exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* (citado como *Astyanax sp.*) do Ribeirão Três Bocas/PR e revelou a presença de fórmulas cariotípicas distintas, onde todos indivíduos apresentaram  $2n=46$  e uma variação estrutural, sendo caracterizados cinco diferentes citótipos nomeados por A, B, C, D e E (Tabela 1).

Lacerda (2013), também analisou exemplares de *A. aff. fasciatus* do Ribeirão Três Bocas, no período de 2009 a 2012, aproximadamente 14 anos depois da análise realizada por Koguissi, observando quatro fórmulas cariotípicas distintas: Cariótipos A e E, além dos novos cariótipos F e G (Tabela 1) em comparação com os resultados de Koguissi (1995). Lacerda (2013) também analisou exemplares de *A. aff. fasciatus* da população do Ribeirão Jacutinga, que apresentou somente o cariótipo E.

Comparando os dados do presente estudo com as análises realizadas por Koguissi (1995) e Lacerda (2013), pode-se observar que a fórmula cariotípica I corresponde ao cariótipo A, a fórmula II ao cariótipo D e a fórmula III a uma estrutura nova correspondendo ao cariótipo H (Tabela 1). As populações do Rio Laranjinha e do Rio Jacú apresentaram apenas uma fórmula cariotípica cada, correspondendo respectivamente aos cariótipos A e D.

Pode-se observar que apenas o cariótipo A de *Astyanax aff. fasciatus* se manteve de 2013 até o presente estudo realizado no Ribeirão Três Bocas. No presente trabalho o cariótipo A foi observado em 44% dos indivíduos coletados contra 25% e 20% nas populações analisadas por Koguissi (1995) e Lacerda (2013), respectivamente. O cariótipo E não era muito frequente nas análises de Koguissi (1995), mas se manteve na população analisada por Lacerda (2013), com uma frequência de cerca de 30%, porém, não foi observada na análise atual. O cariótipo D era o mais frequente em 1995, não foi encontrada na população de Lacerda (2013), reaparecendo nas coletas atuais.

Lacerda (2013) sugere que o cariótipo F corresponda a um cariótipo intermediário sendo resultado de um cruzamento entre indivíduos do cariótipo B e E ou surgido por uma inversão pericêntrica em um cromossomo subtelo-acrocêntrico do cariótipo D. Segundo Lacerda (2013) o cariótipo G, provavelmente, originou-se a partir de uma inversão pericêntrica de um cromossomo subtelo-acrocêntrico do cariótipo E originando um cromossomo metacêntrico. Quanto ao cariótipo H

observado no presente estudo, provavelmente originou-se a partir de uma inversão pericêntrica de um cromossomo subtelo-acrocêntrico do cariótipo A originando um cromossomo metacêntrico.

A variabilidade observada na população do Ribeirão Três Bocas é apenas estrutural, não numérica como observado por Pazzo *et al.* (2006) em estudos realizados em uma população pertencente ao Rio Mogi- Guaçu, onde observaram uma variabilidade numérica e estrutural com indivíduos de  $2n= 45, 46, 47$  e  $48$  com cariótipos diferentes. Artoni *et al.* (2006) analisaram a população de *A. aff. fasciatus* nas proximidades do Parque Estadual de Vila Velha – PR e também obtiveram dados que apresentaram variabilidade tanto numérica quanto estrutural, onde a população do alto Rio Tibagi apresentou três cariótipos, dois com  $2n=50$  e um de  $2n= 48$  cromossomos. A população do Rio Cara- cará possui três cariótipos:  $2n= 48, 49$  e  $50$ , diferindo dos resultados encontrados para o baixo Rio Tibagi que apresenta atualmente indivíduos com  $46$  cromossomos.

A presença de um número diplóide constante com variação nas fórmulas cariotípicas indicam a ocorrência de rearranjos estruturais do tipo inversões pericêntricas, sendo considerado o principal mecanismo de diversificação cariotípica observado no gênero *Astyanax* (Kavalco e Almeida-Toledo 2007).

O padrão de distribuição e composição da heterocromatina também apresentaram-se diferenciados entre as três localidades analisadas. No rio laranjinha e no ribeirão Jacú o padrão heterocromático foi constante. Apenas um indivíduo do ribeirão Jacú apresentou blocos intersticiais, diferindo do restante. Entretanto, a população de *A. aff. fasciatus* do ribeirão Três Bocas mostrou um padrão distinto de distribuição e composição de heterocromatina para cada fórmula cariotípica, caracterizando novamente uma variação intrapopulacional.

Comparando os dados referentes à quantidade de blocos heterocromáticos nos diferentes períodos de estudo de *A. aff. fasciatus* pertencentes ao Ribeirão Três Bocas, Koguissi (1995) encontrou uma variação de  $10$  a  $16$  cromossomos portadores de heterocromatina em sua análise. Por sua vez, Lacerda (2013) constatou de  $16$  a  $22$  blocos, enquanto que no presente trabalho foram encontrados entre  $12$  a  $20$  blocos heterocromáticos, quantidade intermediária as encontrados nos estudos anteriores.

A população do Ribeirão Laranjinha apresenta a mesma fórmula cariotípica do cariótipo A de *Astyanax* aff. *fasciatus* do ribeirão Três Bocas entretanto os blocos heterocromáticos foram observados em menor número, apenas seis pares cromossômicos, além de apresentarem blocos DAPI positivos, não apresentando coincidência quanto comparado com o também cariótipo A do Ribeirão Três Bocas. A distribuição dos blocos de heterocromatina no cariótipo D na população do Ribeirão Jacú diferiu do observado para o cariótipo D do Ribeirão Três Bocas, sendo que a população do ribeirão Jacú apresentou um par de cromossomos subteloacrocêntricos com blocos intersticiais e também por não se apresentaram exclusivamente CMA<sub>3</sub> positivos, sendo observados grande número de blocos ricos em sequências A-T.

O padrão de marcas gerado pelo tratamento com fluorocromos base-específicos entre os diferentes cariótipos analisados na população do Ribeirão Três Bocas, reflete diretamente a natureza molecular das regiões de heterocromatina (Sanchez *et al.* 1991). É importante ressaltar a diferença na composição da heterocromatina entre os cariótipos A e D (Citados como I e II), ricos em pares de base GC e o cariótipo H (citado como III), rico em pares de bases tanto AT quanto GC, indicando a existência de uma variação das famílias de DNA repetitivos intrapopulacionalmente.

A estabilidade cariotípica das populações do Ribeirão Laranjinha e Jacú contrasta com a variabilidade encontrada no Ribeirão Três Bocas, que não é exclusiva dessa localidade, ocorrendo na mesma intensidade no Rio Mogi-Guaçu – SP (Morelli *et al.* 1983; Pazza *et al.* 2006) e no Parque Estadual de Vila Velha – PR (Artoni *et al.* 2006), também pertencentes a Bacia do Rio Tibagi, indicando que *A. fasciatus* suporta rearranjos cromossômicos, o que não impede o fluxo gênico entre os indivíduos, o que leva a um aumento da diversidade cariotípica.

As características citogenéticas observadas para *Astyanax* aff. *fasciatus*, reforçam o trabalho de Garutti e Britski (2000) baseadas em características morfológicas, que sugerem alguns pequenos caracídeos não formam um grupo uniforme, com variações interpopulacionais significativas, o que parece estar ocorrendo com as populações de *A. aff. fasciatus* em relação à estrutura cromossômica (Medrado, 2015).

A elevada variabilidade presente na população do Ribeirão Três Bocas provavelmente estaria relacionada ao fato deste ser um local de reprodução para várias espécies de peixes (Lacerda, 2013). As espécies do gênero *Astyanax* realizam migrações durante a piracema, a procura de lugares com maior oxigenação para reprodução, portanto os indivíduos não são residentes, o que justificaria o fato de que alguns cariótipos não terem sido encontrados nos diferentes períodos de estudo, caracterizando um sistema dinâmico.

Desta forma, a morfologia cariotípica, o padrão de distribuição da heterocromatina e composição química destas regiões, apresentou um papel importante, sendo possível diferenciar as populações de *A. aff. fasciatus* das diferentes localidades, corroborando com a proposta que *Astyanax fasciatus* pertence a um complexo de espécies. Além disso, os resultados poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica no gênero *Astyanax*.

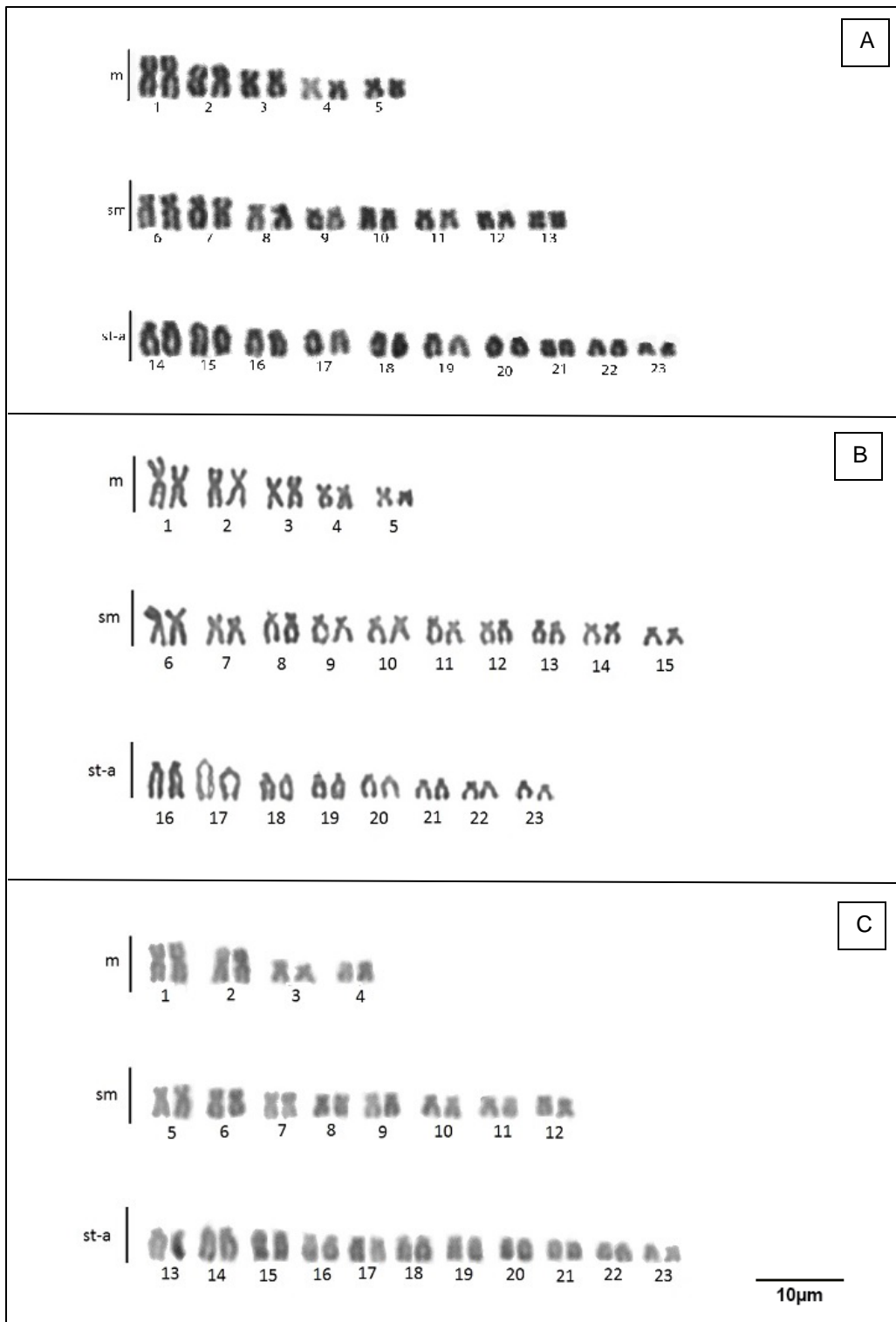
### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular, ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) e ao Departamento de Biologia Geral, pela estrutura física na forma de laboratórios e equipamentos para realização desse trabalho e a CAPES pelo apoio financeiro.

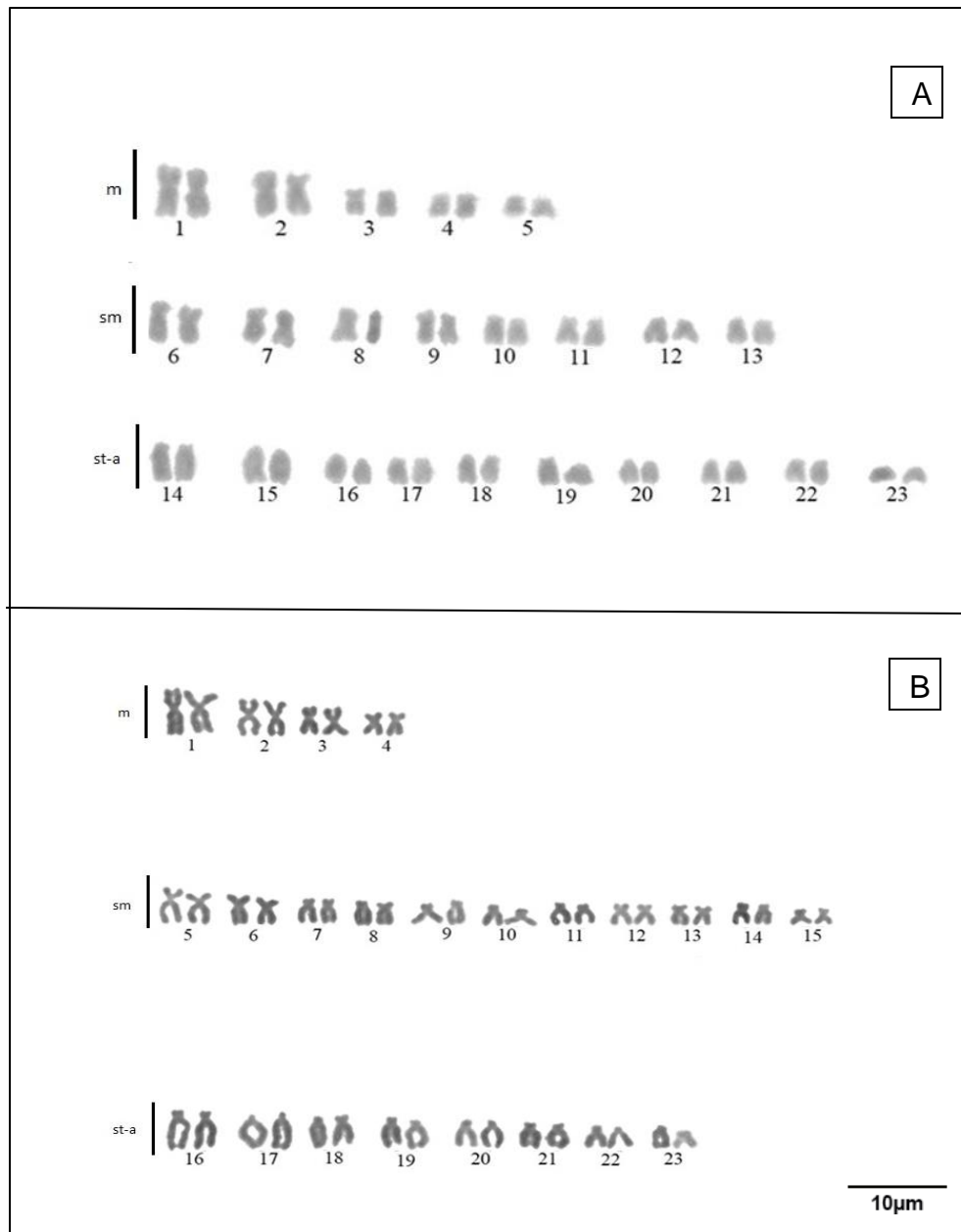
## Anexos

**Tabela 1:** Citótipos encontrados em *Astyanax aff. fasciatus* por Koguissi (1995), Lacerda (2013) e no presente trabalho. M-SM=meta-submetacêntrico, ST-A=subtelo-acrocêntrico.

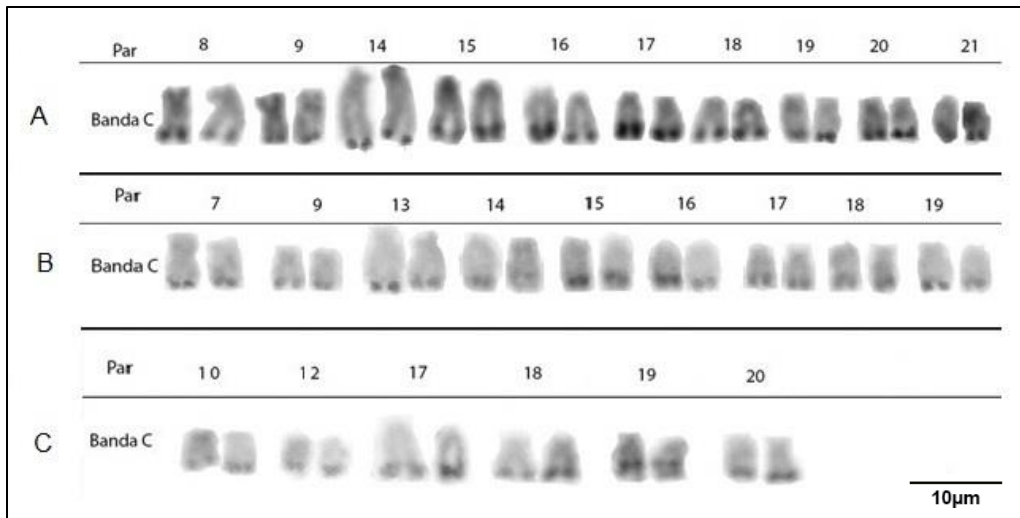
Cariótipos	Koguissi (1995) – 36 exemplares		Frequência	Lacerda (2013) – 20 exemplares		Frequência	Presente – Estudo (2017) – 25 exemplares		Frequência
	M-SM	ST-A	%	M-SM	ST-A	%	M-SM	ST-A	%
A	26	20	25%	26	20	20%	26	20	44%
B	27	19	8,3%	-	-	-	-	-	
C	28	18	8,3%	-	-	-	-	-	
D	30	16	41,7%	-	-	-	30	16	32%
E	34	12	16,7%	34	12	45%	-	-	
F	-	-	-	31	15	20%	-	-	
G	-	-	-	35	11	15%	-	-	
H	-	-	-	-	-		24	22	24%



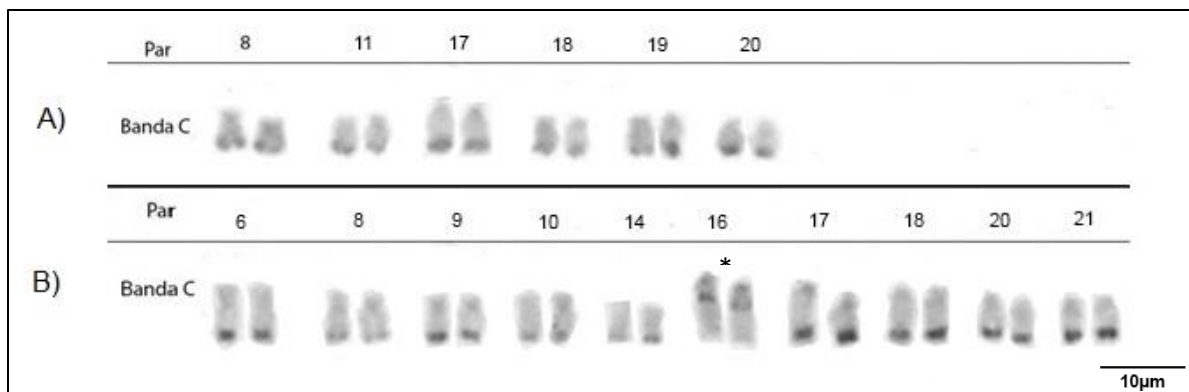
**Figura 1:** Cariótipos encontrados em *Astyanax aff. fasciatus* do Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR. A- Cariótipo I; B- Cariótipo II e C- Cariótipo III.



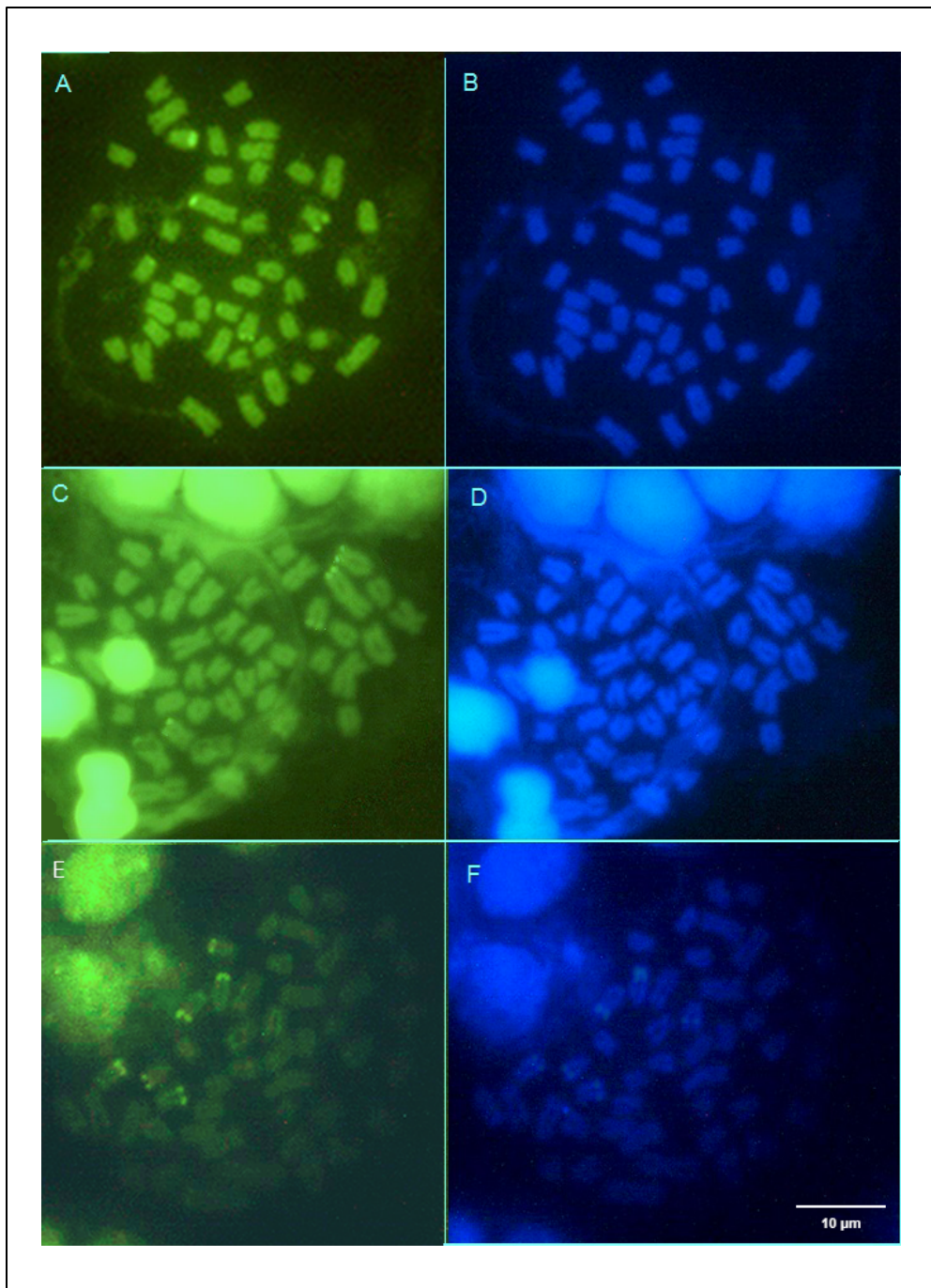
**Figura 2:** Cariótipos encontrados em *Astyanax aff. fasciatus* do Rio Laranjinha (A) e do Ribeirão Jacú (B).



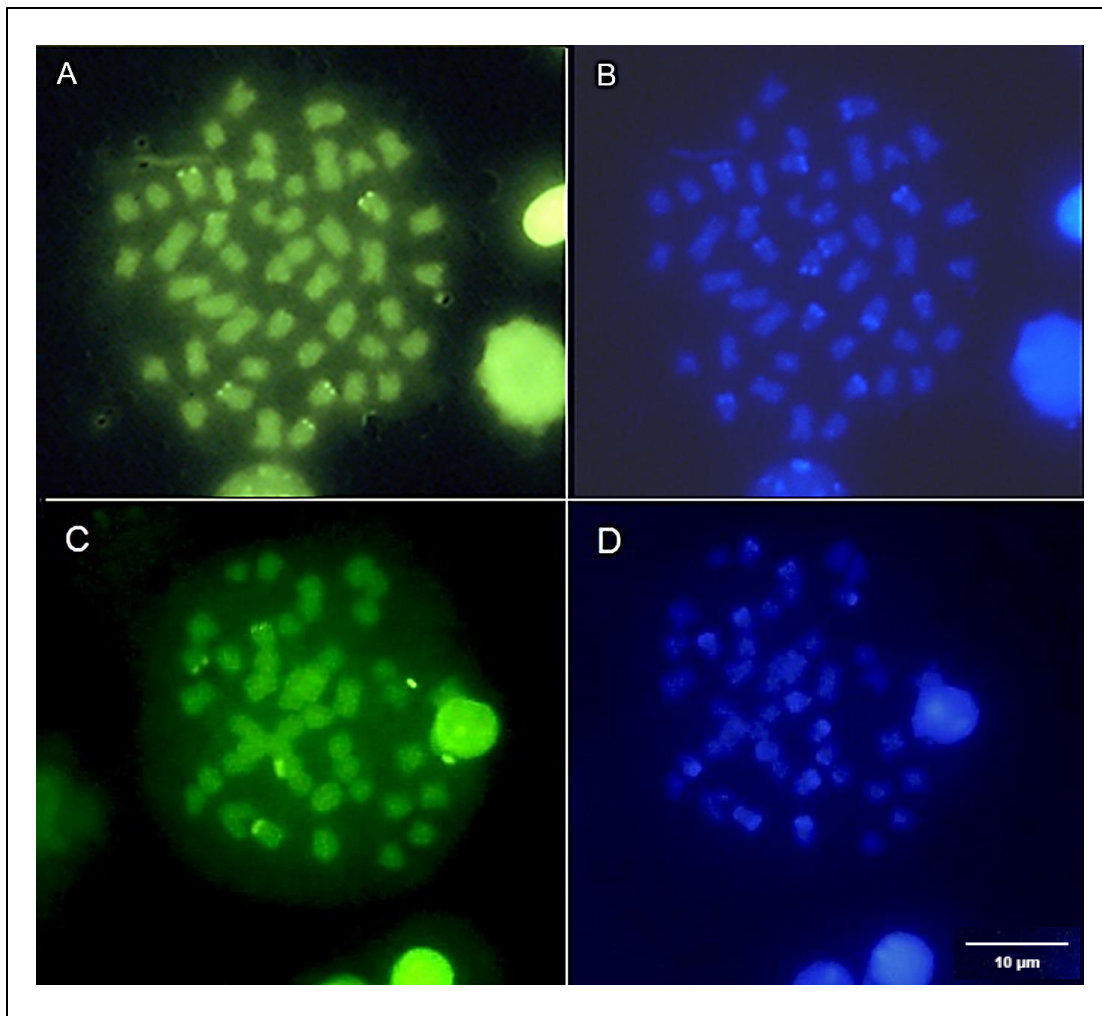
**Figura 3:** Pares cromossômicos de *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas com blocos heterocromáticos obtidos após a técnica de banda C nos diferentes cariótipos.. A- Cariótipo I; B- Cariótipo II e C- Cariótipo III.



**Figura 4:** Pares cromossômicos de *Astyanax* aff. *fasciatus* com blocos heterocromáticos obtidos após realização da técnica de banda C. A- Ribeirão Laranjinha e B- Ribeirão Jacu. O asterisco indica o par de cromossomos com blocos intersticiais observado em único indivíduo da população do Ribeirão Jacu.



**Figura 5:** Metáfases somáticas de *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas, submetidas à coloração sequencial de CMA<sub>3</sub> (A, C e E) e DAPI (B, D e F). Cariótipo I (A e B); Cariótipo II (C e D); Cariótipo III (E e F).



**Figura 6:** Metáfases somáticas de *Astyanax* aff. *fasciatus* submetidas à coloração sequencial de CMA3 (A e C) e DAPI (B e D). Rio Laranjinha (A e B) e Ribeirão Jacu (C e D).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.D.S., M. MANTOVANI, O. MOREIRA-FILHO. 2006. Chromosomal distribution of the As-51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 29: 448-452.

ARTONI, R.F., SHIBATTA, O.A., GROSS, M.C., SCHNEIDER, C.H., ALMEIDA, M.C., VICARI, M.R., BERTOLLO, L.A.C. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4(2), p. 197-202.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil. Genet.**, 1: 103-120.

DIAS, A. L., GIULIANO-CAETANO, L. 2003. Citogenética de alguns grupos de peixes do rio Tibagi, pp. 473-529. In: M. E. Medri, E. Bianchini, O. Shibatta, J. Pimenta (Org.) **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina.

FERREIRA-NETO, M., ARTONI, R.F., VICARI, M.R., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J.P.M., BAKKALI, M., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. 2012. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. **Comparative Cytogenetics**, 6 (1): 29-40. doi: 10.3897/Comp Cytogen.v6i1.2151

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia, Porto Alegre**, 13: 65-88.

KAVALCO, K. F., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2007. Molecular cytogenetics of blind Mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 4(2), p. 103-111.

KOGUISSI, N.A. 1995. **Estudo citogenético da espécie *Astyanax* sp provenientes do Ribeirão Três Bocas – Londrina/PR**. Monografia do Curso de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

JUSTI, A.J. 1993. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. São Carlos – SP: Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.**

LACERDA, L.G. 2013. **Variabilidade Cromossômica Estrutural em *Astyanax aff fasciatus*.** Tese Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.

MEDRADO, A.S. 2015. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2015. **Diversidade genética em pequenos caracídeos do grupo *Incertae sedis* (Teleostei, Characiformes): Uma abordagem citogenética e molecular com ênfase no complexo de espécies *Astyanax fasciatus*.** Tese de Doutorado. Universidade estadual de santa cruz. Ilhéus – BA.

MOLINA, W.F., ALVES, D.E.O., ARAÚJO, W.C., MARTINEZ, P.A., SILVA, M.F. M., COSTA, G.W.W.F. 2010. Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1807- 1814.

MORELLI, S., BERTOLLO, L.A.C., FORESTI, F., MOREIRA-FILHO, O., TOLEDO-FILHO, A.S. 1983. Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae), I Karyotypic variability. **Caryologia**, 36: 235-244.

PAZZA, R., KAVALCO, K.F., BERTOLLO, L.A.C. 2006. Chromosomo Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I. Karyotype Analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in Sympatric Karyotypes and their Possible Hybrid Forms. **Cytogenetic and Genome Research**, 112: 313-319.

PAZZA, R., KAVALCO, K.F. 2007. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The Nucleus**, v. 50, p. 519-543.

PAZZA, R., KAVALCO, S.A.F., PENTEADO, P.R., KAVALCO, K.F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2008. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, 72.

REIS, R.E, KULLANDER, S.O., FERRARIS JR, C.J. 2003. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.

SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, 77, 83–103.

SUMMER, A.M.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, 75: 304-306.

TORRES-MARIANO, A. R., MORELLI, S. 2006. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p. 161-165.

## CAPÍTULO 2:

**Caracterização e Considerações Citogenéticas Sobre as relações filogenéticas de *Markiana nigripinnis* dentro da Família Characidae (Characiformes)**

Esse artigo será submetido à revista **Neotropical Ichthyology**.

## **Caracterização e Considerações Citogênicas Sobre as Relações Filogenéticas de *Markiana nigripinnis* dentro da Família Characidae (Characiformes)**

Monteiro, A. B. G. F.<sup>1</sup>; Giuliano-Caetano, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Cep 86057-970, Londrina-PR  
E-mail: abmonteiro91@gmail.com

### **RESUMO**

O gênero *Markiana* até recentemente era considerado como *Incertae Sedis*. Com base principalmente na análise de caracteres osteológicos, foi proposta uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertae Sedis*, originando um ramo na filogenia de Characidae denominado “clado *Astyanax*” no qual *Markiana nigripinnis* estaria inserido. Estudos mais recentes baseados em análises espermáticas e moleculares propõem sua localização dentro da subfamília Stevardiinae. Com a finalidade de contribuir para o entendimento da sua relação filogenética com os demais Characidae foram analisados exemplares de *Markiana nigripinnis* provenientes do Rio Miranda-Corumbá/MS utilizando coloração convencional, impregnação por nitrato de prata, bandeamento C, fluorocromos base específicos e FISH com sondas de DNAr. Os exemplares analisados apresentaram número diplóide  $2n=52$  e fórmula cariotípica:  $32\ sm + 20\ st-a$ , com constrição secundária no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, coincidentes com a RON, com a sonda de DNAr 18S e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. O bandeamento C revelou marcações nas regiões pericentroméricas e intersticiais proximais em cromossomos st-a, sendo alguns desses cromossomos DAPI<sup>+</sup>, ou seja, rica em pares de base AT. A FISH com sonda DNAr 5S apresentou um par com marcação intersticial. Quanto ao seu relacionamento filogenético, os dados citogenéticos corroboram com os dados morfológicos, espermáticos e moleculares, demonstrando semelhanças de *Markiana nigripinnis* com as espécies contidas na família Stevardiinae.

**Palavras Chaves:** Relação Filogenética, Clado *Astyanax*, Stevardiinae, Citogenética.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Markiana nigripinnis* foi descrita originalmente como *Tetragonopterus nigripinnis* Perugia, 1891, baseado em caracteres morfológicos. Caracteriza-se por ser um peixe de pequeno porte, atingindo cerca de 10 centímetros de comprimento, com escamas crenuladas cobrindo parcialmente os lobos caudais e a nadadeira anal, e listras em forma de zig-zague ao longo do corpo. São conhecidos popularmente como lambari do campo, considerados bentopelágicos, com hábito alimentar onívoro e comumente encontrados no sistema do Pantanal de Mato Grosso do Sul, sendo considerada uma espécie nativa das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Mamoré, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Carvalho *et al.* 2015)

Eigenmann 1903, analisando o gênero *Markiana* a partir de caracteres como morfologia dentária e morfologia das escamas, considerou apenas duas espécies válidas, *Markiana geayi* e *Markiana nigripinnis*. Assim como vários outros gêneros de Characidae, *Markiana* pertencem à subfamília Tetragonopterinae, porém por falta de evidências que sustentassem essa subfamília como monofilética todos os gêneros, exceto *Tetragonopterus*, foram considerados *Incertae sedis* (Lima *et al.* 2003).

Na literatura são encontradas hipóteses filogenéticas divergentes e pouco esclarecedoras, onde suas sinapomorfias sustentam fracamente as relações de *M. nigripinnis* com os demais gêneros de Characidae. Dentre essas hipóteses, Mirande (2010) baseado em caracteres osteológicos, sugere uma nova relação de proximidade entre gêneros *Incertae Sedis*, propondo 22 subfamílias em Characidae, dentre elas o “clado *Astyanax*”, formado por algumas espécies de *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Psellogrammus*, *Markiana* e a subfamília Stevardiinae como um grupo mais abrangente, composto por algumas espécies do gênero: *Bryconamericus*, *Hemibrycon*, *Cyanocharax*, *Knodus*, *Aulixidens*, *Attonitus*, *Acobrycon*, *Pseudocorynopoma*, *Mimagoniatus*, *Diapoma*, *Odontostoechus*, *Nantís*, *Piabina* e *Creagrutus* Segundo esse autor, *M. nigripinnis* pertenceria ao Clado *Astyanax* indicando um suposto relacionamento de *Markiana* com o gênero *Astyanax*.

Entretanto, a partir da análise estrutural de espermatozoides, Baicere-Silva *et al.* (2011), evidenciaram que *Markiana nigripinnis* compartilha o mesmo padrão de

espermatozoides encontrado para os membros não inseminadores da subfamília Stevardiinae, além da presença de quatro dentes na série interna do pré-maxilar e ectopterigóide triangular curto, demonstrando uma relação próxima entre *M. nigripinnis* e membros de Stevardiinae. Essa hipótese foi confirmada por Oliveira *et al.* (2011) através de estudos com base na análise filogenética de sequências de DNA de dois genes mitocondriais e três genes nucleares, e também por Thomaz *et al.* (2015), a partir da análise molecular utilizando dados de sequências de DNA a partir de sete fragmentos de genes, onde é proposta uma nova filogenia para a subfamília Stevardiinae, com *M. nigripinnis* fazendo parte desta subfamília, sendo a hipótese mais aceita atualmente.

A partir das informações ainda incertas sobre sua posição filogenética, *Markiana nigripinnis* mostra-se um excelente material para os estudos citogenéticos que, juntamente com os dados morfológicos, taxonômicos e moleculares, podem contribuir para melhor esclarecer a relação de parentesco dessa espécie com os demais membros da família Characidae.

## MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos de citogenética convencional e molecular foram utilizados para caracterizar a estrutura cromossômica de *Markiana nigripinnis*, sendo coletados três exemplares pertencentes ao Rio Miranda, localizado na bacia do Rio Paraguai, situado no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais CEEA nº 56/07, processo nº 26135/07.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos pela técnica de suspensão celular (Bertollo *et al.* 1978) e a classificação cromossômica teve por base a relação entre braços proposta por Levan *et al.* (1964). A detecção das regiões organizadoras de nucléolo foi realizada segundo protocolo proposto por Howell & Black (1980). A heterocromatina constitutiva foi detectada pela técnica de bandamento-C, descrita por Sumner (1972). Regiões CG e AT ricas foram detectadas com cromomicina A<sub>3</sub> e 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) respectivamente, de acordo com Schmid (1980). A FISH foi realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com modificações, e a sonda de rDNA 18S, isolada de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004), foi

marcada com biotina-16-dUTP (Roche) e detectada utilizando avidina-FITC (fluoresceína conjugada a isotiocianato-avidina) e a sonda de rDNA 5S, obtida a partir do genoma de *Imparfinis shubarti* (Gouveia *et al.* 2016) foi marcada digoxigenina 11 dUTP e detectada com Anti-Digoxigenina Rodamina conjugada. Os cromossomos foram contra corados com DAPI 2µg/mL.

## Resultados

Os exemplares de *Markiana nigripinnis* analisados apresentaram número diplóide constante de  $2n=52$  e fórmula cariotípica de 32 submetacêntricos (sm)+ 20 subtelo-acrocêntricos (st-a), com constrição secundária intersticial no braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos, o par 3, coincidentes com a região organizadora de nucléolo, observados após impregnação com Nitrato de Prata. (Figura 1A).

Quanto ao padrão de Bandamento C, blocos heterocromáticos foram observados em algumas regiões pericentroméricas e principalmente, intersticiais de cromossomos sm e st-a (Figura 1B). A coloração sequencial de banda C com fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI, revelou blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> coincidentes com o par da constrição secundária, enquanto que alguns cromossomos st-a apresentam regiões pericentroméricas e intersticiais DAPI<sup>+</sup>, correspondente aos blocos heterocromáticos (Figura 1C, D).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda de DNAr 5S revelou um par de cromossomos marcados (Figura 2A). Já com a sonda de DNAr 18S foi evidenciado um par portador na região intersticial do braço longo, provavelmente correspondente ao par 3 (Figura 2B).

## Discussão

Os estudos de Mirande (2010) sugerem que o gênero *Markiana* faz parte de um clado formado por algumas espécies do gênero *Astyanax* (exceto *A. latens* e *A. paris*), *Hyphessobrycon anisitsi* e *Psellogrammus kennedy* devido a condição sinapomórfica não-exclusiva de ausência completa ou presença de um único dente maxilar, sendo o único caráter de suporte para o clado *Astyanax*. Entretanto, estudos de análises filogenética e molecular propõem uma nova filogenia para a

subfamília Stevardiinae, com a inclusão de *M. nigripinnis* (Oliveira *et al.* 2011; Thomaz *et al.* 2015). Neste estudo algumas características citogenéticas em *M. nigripinnis* podem reforçar a inclusão desta espécie em Stevardiinae.

O número diplóide em *M. nigripinnis* ( $2n=52$ ), mostrou-se diferente do observado para o gênero *Astyanax*, que varia de  $2n=36$  em *Astyanax schubarti*, a  $2n=50$  em *A. scabripinnis*, *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *A. jacuhiensis* (Souza e Moreira-Filho, 1995; Artoni *et al.* 2006; Ferreira Neto, *et al.* 2009; Pacheco *et al.* 2010), assim como para *Hyphessobrycon anisitsi*, com  $2n=50$  (Mendes *et al.* 2011). Porém *Markiana* demonstrou um  $2n$  compatível com o observado para algumas das espécies dos gêneros *Bryconamericus*, *Knodus* e *Piabina*, pertencentes a subfamília Stevardiinae (Tabela 1). O complemento cromossômico  $2n=52$  parece ser comum e compartilhado por grande número de espécies nessa subfamília, podendo ser considerada uma característica relevante para Stevardiinae.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) são consideradas bons marcadores citotaxonômicos, podendo ser utilizadas para formular hipóteses filogenéticas (Pescatori, 2006), sendo identificadas tanto por análises com impregnação com Nitrato de Prata quanto por FISH, com sonda de DNAr 18S.

Algumas subfamílias de Characidae apresentam um padrão de RONs simples, como em Bryconinae (Almeida-Toledo *et al.* 1996; Margarido e Galetti Jr., 1996) múltiplas como Serrasalminae (Galetti Jr, Silva, Cerminaro, 1985), ou apresentam tanto RONs simples como múltiplas, como é o caso de *Astyanax* (Rocon-Stange e Almeida-Toledo, 1993).

*Markiana nigripinnis* apresentou um sistema de RONs simples, que foi confirmado com DNAr 18S e também com a coloração por fluorocromos base-específico CMA<sub>3</sub>. Para os integrantes do clado *Astyanax* é predominante um sistema de RONs múltiplas como em *A. schubarti*, *A. lacustres*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni* e *A. altiparanae* (Fernandes e Martins-Santos, 2006) e *Hyphessobrycon anisitsi* (Mendes *et al.* 2011).

Em alguns integrantes de Stevardiinae, como para o gênero *Bryconamericus*, tem sido descrito a presença de RONs simples ou múltiplas (Pescatori, 2008). Paintner-Marques *et al.* (2003), relataram para uma população de *Bryconamericus* aff. *Iheringii* do rio Água da Floresta, bacia do rio Tibagi (PR), a presença de RONs

simples, na qual foram identificadas em regiões teloméricas sobre o braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos grandes. Capistano *et al.* (2008) estudando a população do riacho Tatupeba- PR revelou também um padrão de RONS simples, marcando apenas um par de cromossomos submetacêntricos.

Ainda que a presença de RONS simples no gênero *Bryconamericus* não ser frequente, populações de *Bryconamericus stramineus* analisadas por Pescatori (2008) no Ribeirão Alambari, Córrego Jacutinga e Ribeirão Hortelã, apresentaram um sistema de RONS simples, encontradas na região telomérica no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos grandes, reforçando também a existência de um padrão simples para este gênero.

Apesar de muitas espécies de Stevardiinae analisadas citogeneticamente apresentarem um predomínio de RONS múltiplas como o gênero *Bryconamericus* existem várias espécies e populações descritas que apresentam ocorrência RONS simples como para uma população de *Piabina argentea* coletada na Bacia hidrográfica do rio São Francisco (Peres, 2005). Pazian *et al.* (2012) também analisaram populações distintas de *P. argentea* e algumas apresentaram RONS simples. No gênero *Knodus*, onde Krinski *et al.* (2008) relata a ocorrência de RONS múltiplas em *Knodus cf. Chapadae*, porém a presença de um padrão de RONS simples já ter sido descrito na espécie *Knodus breviceps* por Troy (2004).

Através da técnica de bandamento C fazendo-se a análise da heterocromatina constitutiva de *M. nigripinnis* foi observada a presença de um padrão de blocos heterocromáticos preferencialmente em regiões intersticiais e também alguns blocos pericentroméricos. Para o gênero *Astyanax* a distribuição da heterocromatina é bem variável, sendo encontrada em regiões pericentroméricas e intersticiais em *A. altiparanae* (Pacheco *et al.* 2001; Domingues *et al.* 2007) e terminais como em *A. fasciatus* (Pazza *et al.* 2008)

De acordo com Wasko e Galetti (1998) a distribuição da heterocromatina constitutiva é variável nas espécies de *Bryconamericus* e parece não ter uma tendência geral quanto à sua localização, podendo ser encontradas em regiões centroméricas e teloméricas e também como pequenos blocos intersticiais.

Peres (2005) descreveu para *Piabina argentea* bandas C positivas para região das Ag-RONS e também para a região pericentromérica de alguns cromossomos em

exemplares da população do rio São Francisco. A presença de algumas bandas pericentroméricas também foi observada na população *Knodus* cf. *Chapadae* do Ribeirão Buriti, pertencente a bacia do alto Rio Paraguai, além bandas centroméricas, que também foram observadas em *Knodus breviceps* (Troy, 2004).

Em Characiformes, grande parte das espécies estudadas exibem um número de no máximo quatro sítios de DNAr 5S, preferencialmente localizados na região intersticial, como visto em *M. nigripinnis*, sendo considerado uma região estratégica estando relacionada com a manutenção e preservação do gene, pois essa região estaria menos susceptível a rearranjos cromossômicos (Martins e Galetti Jr., 2001). Para *Astyanax*, estudos relatam populações com um par cromossômico portador do gene DNAr 5S e em outras com quatro cromossomos portadores do DNAr 5S (Vicari, 2006), com o segundo ou terceiro par metacêntrico constantemente marcado na região pericentrométrica (Fernandes, 2006; Peres *et al.* 2008).

Embora as análises de Mirande (2010), sugiram um agrupamento de *Markiana* com *Astyanax* e alguns outros gêneros, as características citogenéticas observadas para *M. nigripinnis* mostram grande similaridade com as informações já descritas para alguns integrantes da subfamília Stevardiinae. Essas informações corroboram com os dados morfológicos, espermáticos e moleculares reafirmando o posicionamento de *M. nigripinnis* dentro da subfamília Stevardiinae.

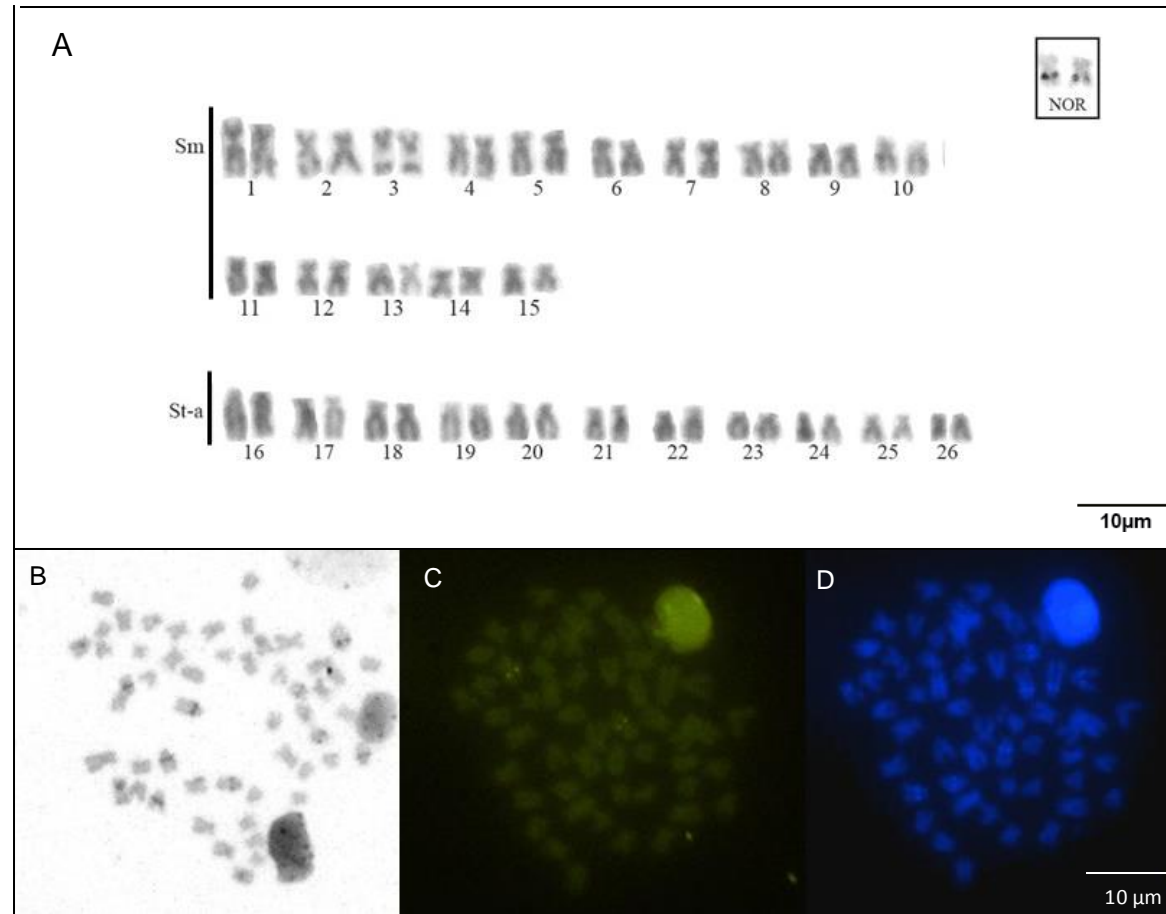
### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular, ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) e ao Departamento de Biologia Geral, pela estrutura física na forma de laboratórios e equipamentos para realização desse trabalho e a CAPES pelo apoio financeiro.

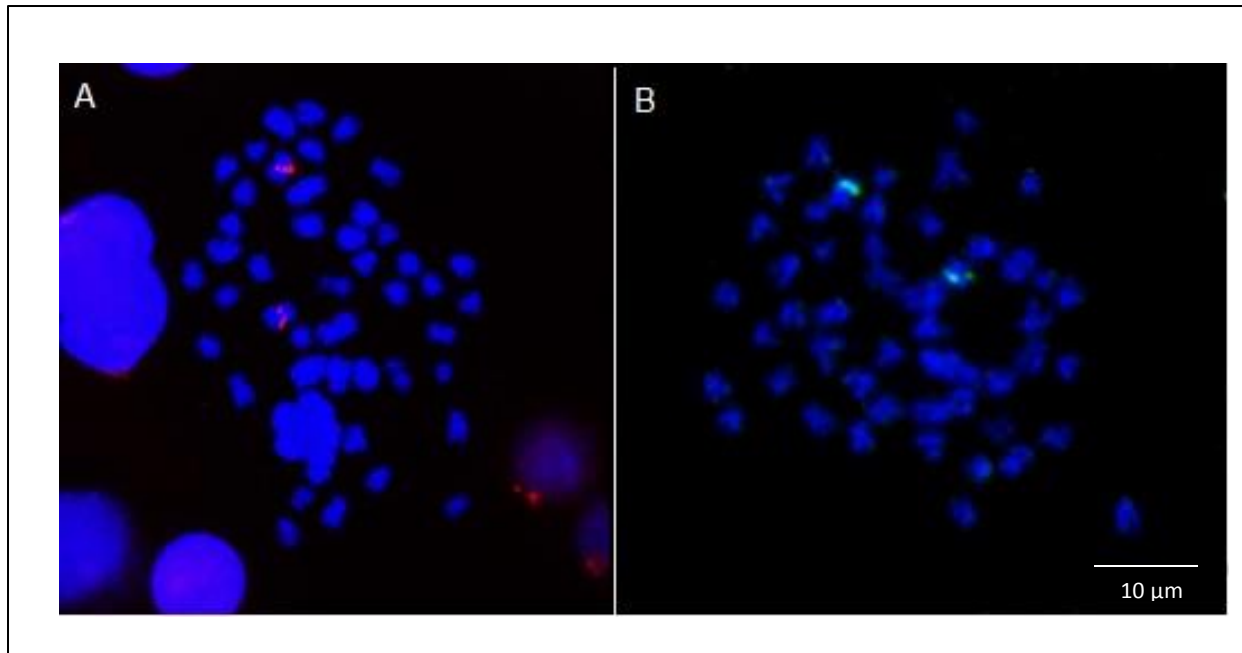
## Anexos

**Tabela 1:** Número diplóide e fórmula cariotípica disponível para algumas espécies pertencentes à subfamília Stevardiinae.

ESPÉCIE	2n	Fórmula Cariotípica	LOCALIDADE	REFERÊNCIA
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>Iheringii</i>	52	8m+22sm+10st+12a	Rio Água da Floresta (PR)	Paintner-Marques <i>et al.</i> (2003)
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>Iheringii</i>	52	12m+18sm+8st+14a	Córrego Maringá (PR)	Capistano <i>et al.</i> (2008)
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>exodon</i>	52	10m+24sm+6st+12a	Ribeirão Três Bocas (PR)	Paintner-Marques <i>et al.</i> (2002)
<i>Bryconamericus</i> <i>stramineus</i>	52	6m+12sm+14st+20a	Ribeirão Hortelã (SP)	Pescatori <i>et al.</i> (2008)
<i>Bryconamericus</i> <i>stramineus</i>	52	10m+18sm+12st+12a	Ribeirão Alambari (SP)	Pescatori <i>et al.</i> (2008)
<i>Bryconamericus</i> <i>stramineus</i>	52	12m+16sm+16st+8a	Córrego Jacutinga (SP)	Pescatori <i>et al.</i> (2008)
<i>Knodus</i> cf. <i>chapadae</i>	52	14m+14sm+14st+10a	Ribeirão Buriti/ MT	Krinski <i>et al.</i> (2008)
<i>Knodus breviceps</i>	52	16m+12sm+12st+12a	Rio das Mortes/ MS	Troy (2004)
<i>Piabina argentea</i>	52	8m+14sm+16st+14a	Três Marias/ MG	Peres (2005)
<i>Piabina argentea</i>	52	26m-sm+26st-a	Rio Mogi Guaçu/SP	Portela <i>et al.</i> (1988)
<i>Piabina argentea</i>	52	2m+10sm+16st+24a	Rio Piracicaba/ SP	Wasko (1996)



**Figura 1:** A- Cariótipo de *Markiana nigripinnis* com coloração convencional com Giemsa; B- Metáfase somática submetida à técnica de banda C; C e D- Metáfases somáticas com coloração de CMA3 e DAPI, respectivamente. No Box par cromossômico AgNOR.



**Figura 2:** Metáfases somáticas de *Markiana nigripinnis* com hibridação fluorescente *in situ*. A- Sonda de DNAr 5S e B- Sonda de DNAr 18S.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., BIGONI, A.P., BERNARDINO, G., FORESTI, F., TOLEDO-FILHO, S.A. 1996. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. **Caryologia**, v.49, p. 35-43.

ARTONI, R.F., SHIBATTA, O.A., GROSS, M.C., SCHNEIDER, C.H., ALMEIDA, M.C., VICARI, M.R., BERTOLLO, L.A.C. 2006. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4(2), p. 197-202.

BAICERE-SILVA, C. M., BENINE, R. C., QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2011. *Markiana nigripinnis* (Perugia, 1891). 2011. As a putative member of the subfamily Stevardiinae (Characiformes: Characidae): spermatic evidence. **Neotrop. Ichthyol**, vol.9, N.2, pp.371-376. ISSN 1679-6225.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI C.S., MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Brasil. Genet.**, 1: 103-120.

CAPISTANO, T. G., PORTELA-CASTRO, A.L.B., JULIO-JUNIOR, H.F. 2008. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the rivers Paranapanema and Ivaí, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 1: 203-207.

CARVALHO, F.R., SANTOS A.C. 2015. Taxonomic status of *Tetragonopterus anomalus* Steindachner, 1891, an inquirenda species in Characidae (Teleostei: Characiformes). **Zootaxa**, 4018 (1): 146-150.

DOMINGUES, M. S., VICARI, M. R., ABILHOA, V., WANSER, J. P., CESTARI, M. M., BERTOLLO, L. A. C., ALMEIDA, M. C., ARTONI, R. F. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 37- 44.

FERNANDES, C. A., MARTINS-SANTOS, I. C. 2006. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 1-5.

FERREIRA-NETO, M., VICARI, M. R., CAMARGO, E. F., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO, O. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 792-796.

GALETTI JR., P. M., SILVA, E. B., CERMINARO, R. T. 1985. Multiple NOR system in fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 8: 479-484.

GOUVEIA, J.G., WOLF, I.R., MORAES-MANÉCOLO V.P.O., BARDELLA, V.B., FERRACIN, L.M., GIULIANO-CAETANO, L., ROSA, R., DIAS, A.L. 2016. Isolation and characterization of 5S rDNA sequences in catfishes genome (Heptapteridae and Pseudopimelodidae): perspectives for rDNA studies in fish by C0t method. **Cytotechnology**, 68 (2016), pp. 2711–2720.

HATANAKA, T., GALETTI JR, M.P. 2004. Mapping of the 18S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122: 239-244.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: as 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015.

KRINSKI, D., CENTOFANTE, L., MIYAZAWA, C.S. 2008. Multiple NORs in *Knodus* cf. *chapadae* (Pisces: Characidae: incertae sedis) from Upper Paraguay Basin, Mato Grosso State, Brazil. **The Nucleus**, 51: 229–238.

LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.

LIMA, F.C.T., MALABARBA, L.R., BUCKUP, P.A., PEZZI DA SILVA J.F., VARI, R.P., HAROLD, A., BENINE, R., OYAKAWA, O.T., PAVANELLI, C.S., MENEZES, N.A., LUCENA, C.A.S., MALABARBA, M.C.S.L., LUCENA, Z.M.S., REIS, R. E., LANGEANI, F., CASSATI, L., BERTACO, V.A. GENERA INCERTAE SEDIS IN CHARACIDAE. IN: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C.J. (Eds.). 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, **Edipucrs**, 729p.

MARGARIDO, V. P., GALETTI JR., P. M. 1996. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**, v. 85, p. 219-228.

MARTINS, C., GALETTI JR., P. M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910.

MENDES M.M, ROSA, R., GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2011. Karyotype diversity of four species of the *Incertae Sedis* group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.9.

MIRANDE, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotrop. ichthyol**, vol.8, n.3, pp.385-568. ISSN 1679-6225.

OLIVEIRA, C., AVELINO, G.S., ABE, K.T., MARIGUELA, T.C., BENINE, R.C., ORTÍ, G., VARI, R.P., CASTRO, R.M.C. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evol Biol**,11: 275.

PACHECO, R. B., GIULIANO-CAETANO, L., JULIO JUNIOR, H. F., Dias, A. L. 2010. First cytogenetic data on *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) from lago Guaíba, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 667-671.

PAINTNER-MARQUES, T.R, GIULIANO-CAETANO, L., DIAS, A.L. 2003. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genet Mol Biol**, 26:145-149.

PAZZA, R., KAVALCO, S.A.F., PENTEADO, P.R., KAVALCO, K.F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2008. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, 72.

PAZIAN, M. F., PEREIRA, L.H.G., DIAS, C.K.S., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. 2012. Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus *Piabina* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 10: 329-340.

PERES, W.A.M. 2005. **Análise da Diversidade Cariotípica de Characidae da Bacia Do São Francisco**. Tese de Mestrado, Universidade Federal São Carlos, SP, Brasil.

PERES, W.A.M., BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA-FILHO, O. 2008. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 222-226.

PESCATORI, G.L.R. 2008. **Estudos citogenéticos em populações de *Bryconamericus stramineus*, Eigenmann, 1908. (Teleostei, Characidae) em rios das bacias dos Rios Tietê e Paranapanema**. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, SP, Brasil.

PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.83, p.2934-2938.

PORTELA, A.L.B.S., GALETTI JR, P.M., BERTOLLO, L.A.C. 1988. Considerations on the Chromosome Evolution Of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Rev. Brasil. Genet.**, 11,307-316.

ROCON-STANGE, E.A.R., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 1993 Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética.**, v. 16, p. 601-615.

SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, 77, 83–103.

SOUZA, I.L., MOREIRA-FILHO, O. 1995. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, 60: 1-11.

SUMNER, A.M.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, 75: 304-306.

THOMAZ, A.T., ARCILA, D., ORTÍ, G., MALABARBA, L.R. 2015. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **Evolutionary Biology**, 15 (146): 1-25.

TROY, W.P. 2004. **Diversidade cariotípica de lambaris da subfamília Tetragonopterinas (Characidae, Charadiformes)**. Cuiabá, MT. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil.

VICARI, M.R. 2006. **Diversidade de peixes residentes em cabeceiras de rios. Uma abordagem cromossômica em três diferentes biomas aquáticos da região sul do Brasil**. Tese de Doutorado. UfSCar, São Carlos, SP, Brasil. p. 158.

WASKO, A.P., GALETTI JR, P.M. 1998. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**, 94:185-193.

## Considerações Finais

Neste trabalho os dados citogenéticos forneceram informações importantes para as duas espécies da família Characidae aqui estudadas. De modo geral, podem ser destacadas as seguintes considerações sobre o presente estudo:

1. Os exemplares de *Astyanax* aff. *fasciatus* das três diferentes localidades apresentaram o número diploide conservado ( $2n=46$ ), entretanto mostraram variação estrutural resultando em fórmulas cariotípicas diferentes;
2. A diversidade cariotípica observada na população de *Astyanax* aff. *fasciatus* do Ribeirão Três Bocas/PR sugere que inversões pericêntricas estão influenciando a evolução cariotípica nessa população;
3. O padrão de distribuição e composição da heterocromatina em *Astyanax* aff. *fasciatus* podem ser utilizados como marcadores para diferenciação cariotípica entre as diferentes populações;
4. Os dados cromossômicos de *Astyanax* aff. *fasciatus* corroboram com a proposta de um complexo de espécies.
5. A caracterização citogenética de *Markiana nigripinnis* foi realizada pela primeira vez, mostrando similaridade com as informações já descritas para alguns integrantes de Stevardiinae, diferindo para aquelas descritas para *Astyanax*.
6. Os dados citogenéticos sugerem que *M. nigripinnis* estaria melhor relacionada dentro da família Stevardiinae.