

Karine Frehner Kavalco

Estudos Evolutivos no Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)



São Paulo
2008

Karine Frehner Kavalco

**Estudos Evolutivos no Gênero *Astyanax*
(Pisces, Characidae)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências, na Área de Biologia-Genética.

Orientador(a): Dra. Lurdes Foresti de
Almeida Toledo

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Kavalco, Karine Frehner

Estudos Evolutivos no Gênero *Astyanax*
(Pisces, Characidae).

197 pp.

Tese (Doutorado)

Instituto de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. *Astyanax*; 2. Evolução Cariotípica; 3.
Evolução Molecular. I. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Para Gabrielle e Rubens,
com amor.

“[...]E o que disserem
Meu pai sempre esteve esperando por mim
E o que disserem
Minha mãe sempre esteve esperando por mim
E o que disserem
Meus verdadeiros amigos sempre esperaram por mim
E o que disserem
Agora meu filho espera por mim[...]
(Renato Russo)

“Não posso lhe dar a fórmula do sucesso,
mas a do fracasso é tentar contentar a todos”
(John F. Kennedy)

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas e instituições tornaram viável a realização deste trabalho, ou o tornaram mais agradável. A elas, meus sinceros agradecimentos:

- Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, que me concedeu bolsa de doutoramento, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelos recursos na forma de auxílio à pesquisa.

- Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela infra-estrutura necessária para a realização dos experimentos e coletas de campo e pelas bolsas concedidas durante os estágios do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE.

- À pós-graduação em Biologia-Genética, na figura de sua coordenadora, a professora Dra. Célia P. Koiffmann.

- À professora Dra. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo, pela orientação e entusiasmo com o trabalho, e pela confiança a mim dedicada.

- À professora Dra. Angela M. Vianna Morgante, por ceder o fotomicroscópio para finalização da tese e pela amizade.

- Ao professor Dr. Sérgio R. Matioli, pela amizade e pelas discussões científicas nos dois anos em que coordenou meu estágio PAE na disciplina de Processos Evolutivos. Ainda, aos professores Dr. Paulo A. Otto e Dr. Gabriel Marroig, pelas contribuições na minha formação durante este período.

- Às professoras Dra. Yatiyo Y. Yassuda, Dra. Priscila Otto e Dra. Maria José de Jesus Silva, pelas contribuições durante meu exame de qualificação.

- À professora Dra. Francisca do Val, pela amizade, pelas maravilhosas aquarelas e por compartilhar comigo a paixão pela Evolução Biológica e pela Divulgação Científica.

- Às secretárias do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Helenice e Deisy, pela ajuda sempre disponível, por compartilharem a espera pela Gabrielle com alegria e por tornarem meus finais de tarde tão agradáveis. Meus agradecimentos à Susi e à D. Genoveva também.

- Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, da biblioteca do IB-USP e aos motoristas e vigias, e a tantos outros anônimos, que tornaram possível cada dia desta jornada.

- Ao técnico Carlos Lopes e a Gilberto Rigo, pela inestimável ajuda durante as coletas.

- Aos colegas do laboratório de Ictiogenética, principalmente à Caroline Garcia, Karina de Oliveira Brandão, Raquel Maria Rodrigues e Frederico Henning. Deixo ainda um agradecimento muito especial para Caroline Garcia e Karina Brandão, pela imprescindível ajuda na finalização de experimentos de minha tese durante minha licença maternidade, e para Rubens Pazza, pela ajuda na discussão dos manuscritos.

- Aos meus orientadores anteriores, já que o conhecimento é cumulativo e através de seus ensinamentos pude galgar mais um degrau: Dr. Vladimir Pavan Margarido e Dr. Orlando Moreira Filho.

- Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições.

- À amiga Karina, por ser esta pessoa tão especial e por aguardar com carinho a chegada da minha pequena... Por ter sido minha primeira (des)orientanda, a “Pupis” que todos gostariam de ter. Enfim, por compartilhar a fase mais importante da minha vida e por estar presente todas as vezes em que precisei.

- À amiga Carol, por todos estes anos de amizade, risadas e dedicação, mesmo quando distante.

- Aos amigos distantes, porém nunca ausentes: Luis A. Bertollo, Alberto J. Prioli, Sonia M.A.P. Prioli, Horácio Júlio Jr. e Alexandre Benvindo, pelos emails bem-humorados e pelos encontros nos congressos.

- Aos amigos polivalentes, que riem conosco nos momentos mais felizes, nos amparam nos momentos menos felizes, e alguns até mudança nos ajudam a fazer: Karina e Leandro, Partiti, Micheli, Jonas, Gabriel, Elton, Dantas, Carlos e Cristiane, Chico, Fabris, Marcelo, Hugo e Kleyne, Inadre e Cristiane, Angêla e Renato, Renata e Diego, Erika. E um abraço muito especial para a Nani.

- Ao amigo, biólogo amador e artista Danniell Soares, que me presenteou com as gravuras da capa e abertura dos capítulos deste volume.

- Finalmente, a minha família, que é minha vida. Agradeço pelo apoio dedicado e incondicional de meu marido Rubens, meus pais Sydney e Magli, meus irmãos Tatiana e Sydney, meus avôs Nory, Hiltrud e Friedrich. À minha mãe agradeço especialmente por todo o período em que cuidou da “flor do dia” para que esta tese fosse finalizada, por ser esta avó tão amorosa. Ao Rubens ainda devo a existência da pessoinha mais linda do mundo, a Gabrielle, cujos sorrisos animam mais que qualquer palavra.

Obrigada a todos, vocês tornaram esta jornada possível.

RESUMO

O gênero *Astyanax* é um dos mais especiosos da ordem Characiformes. Suas mais de 100 espécies distribuem-se por praticamente toda a região Neotropical e habitam os mais diversos ambientes, como regiões montanhosas, trechos lóticos e leitos de rios, porções lênticas ou lagunares e nascentes. Durante cerca de trinta anos estes peixes têm sido alvo de estudos cromossômicos, que os caracterizaram como um grupo com grande diversidade citogenética. Recentemente, o advento de técnicas de citogenética molecular e de estudos empregando marcadores de DNA tem produzido novos dados sobre a biologia evolutiva do grupo, e possibilitado a revisitação de antigos problemas do gênero, como sua difícil classificação taxonômica. No presente trabalho buscou-se a caracterização citogenética e a análise de segmentos do mtDNA (seqüências parciais das regiões dos genes ND2 e ATPase6/8) de diferentes espécies e populações de *Astyanax*, com a finalidade de contribuir para o reconhecimento de padrões e processos evolutivos no gênero. Foram analisados exemplares provenientes das bacias hidrográficas dos rios São Francisco, Tietê, Paranapanema, Mogi-Guaçu, Iguazu, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e Guapimirim. Os resultados forneceram panoramas filogeográficos e estabeleceram relações evolutivas entre as espécies analisadas, utilizando dados associados de duas classes diferentes de marcadores genéticos. Através da aplicação de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares são apresentados dados cariotípicos de *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus*, *A. bockmanni*, *A. aff. fasciatus*, *A. hastatus*, *A. mexicanus* e *A. ribeirae*. Nos estudos filogenéticos foram utilizadas, adicionalmente às seqüências das espécies acima citadas, dados provenientes de *Astyanax* sp.B, *A. giton*, *A. intermedius*, *A. lacustris*, *A. aff. scabripinnis*, *Bryconamericus iheringii*, *Mimagoniatis microlepis* e *Roeboides occidentalis*. Foram ainda incluídas nas análises seqüências do mtDNA de haplótipos diferentes de *A. mexicanus* e *A. bimaculatus* retirados da literatura. Para as diferentes populações amostradas dos grupos *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus* e *A. aff. fasciatus*, foram efetuadas análises filogeográficas associadas a dados cromossômicos. As análises cromossômicas e moleculares do sistema de drenagem do Leste e de bacias circunvizinhas apresentadas no presente trabalho forneceram dados adicionais para o entendimento da biologia evolutiva do gênero *Astyanax*.

Outra contribuição do presente estudo foi a inferência das relações evolutivas de algumas das mais bem estudadas espécies do gênero *Astyanax*, que a despeito da sua importância ecológica e de constituírem um modelo para estudos cromossômicos e evolutivos, ainda não apresentam estudos filogenéticos amplos. Ainda, a associação de dados cromossômicos e moleculares forneceu um panorama interessante sobre as relações evolutivas em algumas espécies do gênero, bem como sobre os processos e padrões evolutivos presentes nos *Astyanax*.

ABSTRACT

Astyanax is one of the species-richest genera within the order Characiformes. More than 100 representatives are widespread throughout nearly all the Neotropical region, inhabiting an array of environments, such as mountain areas, lotic and lentic river portions, lake systems and headwaters. This fish group has been a target of chromosomal studies for over 30 years, showing a remarkable cytogenetic diversity. Recently, the advances in molecular cytogenetics and DNA marker studies have provided new data about the evolutionary biology in this group, allowing revisiting former issues in species of this genus, such as their problematic taxonomical classification. In the present work, we attempted to obtain a cytogenetic characterization and analyze mtDNA segments (partial sequences of the genes ND2 and ATPase6/8) of different species and populations of *Astyanax*, in order to identify the evolutionary patterns and processes within the genus. Specimens from São Francisco, Tietê, Paranapanema, Mogi-Guaçu, Iguaçu, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape and Guapimirim hydrographic basins were collected. The results revealed phylogeographic scenarios and enabled us to establish the evolutionary relationships among the analyzed species, by associating data from two distinct classes of genetic markers. Through classic and molecular cytogenetic techniques, we present karyotypic data in *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus*, *A. bockmanni*, *A. aff. fasciatus*, *A. hastatus*, *A. mexicanus* and *A. ribeirae*. For the phylogenetic studies, we also used, besides those sequences of the species abovementioned, data from the species *Astyanax* sp.B, *A. giton*, *A. intermedius*, *A. lacustris*, *A. aff. scabripinnis*, *Bryconamericus iheringii*, *Mimagoniatis microlepis* e *Roebooides occidentalis*. In the mtDNA analyses, sequences from the mtDNA of *A. aeneus*, and different haplotypes of *A. mexicanus* and *A. bimaculatus* available in the literature were included as well. Phylogeographic analyses coupled with chromosomal data were performed for the distinct populational samples in the groups *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus* and *A. aff. fasciatus*. Both molecular and chromosomal analyses along Eastern drainage systems and nearby basins carried out in the present work provided additional information to the understanding of the evolutionary biology in the genus *Astyanax*. Another contribution of the present work refers to the inference on the evolutionary

relationships in some of the most intensively studied species in the genus *Astyanax*, that, despite of their ecological importance and their role as a model for chromosomal and evolutionary studies, still lack more complete phylogenetic approaches. Furthermore, the association between chromosomal and molecular data revealed an interesting panorama about the evolutionary relationships in some species of this genus, as well as the evolutionary processes and patterns identified within *Astyanax*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Esquema mostrando a organização do mitogenoma de vertebrados. Fonte: Passarge (1995).	11
Figura 2.1 – Cariótipo de <i>A. mexicanus</i> corado em Giemsa. Em destaque, Ag-RONs.	33
Figura 2.2 – Cariótipo de <i>A. mexicanus</i> após bandamento-C. Em destaque, o microcromossomo B.	33
Figura 2.3 – Metáfases de <i>A. mexicanus</i> (a-d). As setas indicam os sites de Cromomicina A ₃ (a) e hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sondas de rDNA 18S (b), rDNA 5S (c) e DNA satélite As-51 (d). As cabeças de setas indicam o microcromossomo B. Metáfases de <i>A. fasciatus</i> (e) e <i>A. bockmanni</i> (f) com FISH com sonda do DNA satélite As-51 (lâminas-controle). Barra=5µm.	34
Figura 3.1 – Cariótipo de <i>A. bockmanni</i> corado em Giemsa. Barra=5µm.	44
Figura 3.2 – Cariótipo de <i>A. bockmanni</i> após bandamento C. Barra=5µm.	44
Figura 3.3 – Metáfases de <i>A. bockmanni</i> . As setas indicam os sítios de Ag-RONs (a) e FISH com sondas de rDNA 18S (b) e 5S (c). Em (d) ausência de sítios do DNA satélite As-51. Barra=5µm.	45
Figura 4.1 – Exemplares e cariótipos corados em Giemsa dos citótipos A (a), B (b) e C (c) de <i>A. hastatus</i> . Nos detalhes, Ag-RONs. Barra dos cariogramas = 5µm.	59
Figura 4.2 – Metáfases de <i>Astyanax hastatus</i> . Citótipos A, B e C após bandamento-C (a-c) e FISH com sondas de rDNA 18S (d-f) e DNA satélite As-51 (g-i). As setas indicam os sítios de rDNA. Barras = 5µm.	60
Figura 5.1 – Cariótipo de <i>A. ribeirae</i> corado em Giemsa. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs. Barra=5µm.	71
Figura 5.2 – Metáfases de <i>A. ribeirae</i> . Em (a) metáfase submetida ao bandamento C. As setas indicam os sítios de FISH com sondas de rDNA 18S (b) e 5S (c). Em (d) ausência de sítios do DNA satélite As-51. Barras=5µm.	72
Figura 6.1 – Mapa da região sudeste do Brasil indicando os principais sistemas hidrográficos: 1) rio São Francisco; 2) rio Grande; 3) rio Paraíba do Sul; 4) rio Mogi-Guaçu; 5) rio Tietê; 6) rio Ribeira de Iguape; 7) rio Paranapanema. As letras identificam os pontos amostrados na literatura (a, b, c, d, e, g, h,) e no presente trabalho (f, i, j, k, l, m) (ver Tabela 6.1).	89
Figura 6.2 – Cariótipos de <i>A. aff. fasciatus</i> corados em Giemsa e após FISH com sonda do satDNA As-51. Exemplares provenientes de Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (a-b); e Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [2n=46 (c-d); 2n=48 (e-f); 2n=50 (g-h)]. Em destaque par número 20 do citótipo de 2n=50 cromossomos, portador de sítios homomórficos do satDNA As-51. Barra=5µm.	90
Figura 6.3 – Cariótipos de <i>A. aff. fasciatus</i> corados em Giemsa e após FISH com sonda do satDNA As-51. Exemplares provenientes de Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (a-b); Pilar do Sul/SP - bacia do rio Paranapanema (c-d); Angatuba/SP – bacia do rio Paranapanema (e-f); e Araras/SP – bacia do rio Mogi-Guaçu (g-h). Barra=5µm.	91
Figura 6.4 – Metáfases de <i>A. aff. fasciatus</i> após bandamento-C. Exemplares provenientes de Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (a); Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [2n=46 (b); 2n=48 (c); 2n=50 (d)]; Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (e); Pilar do Sul/SP - bacia do rio Paranapanema (f). Barras=5µm	92

Figura 7.1 –	Mapa mostrando as populações de <i>A. aff. fasciatus</i> sob estudo. Algarismos dentro dos círculos indicam as principais bacias hidrográficas do sudeste brasileiro: 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Tietê; 3) rio Paranapanema; 4) rio Ribeira de Iguape. Demais algarismos indicam os pontos de coleta: 1) Salesópolis/SP; 2) Indaiatuba/SP; 3) Barrinha/SP; 4) Cachoeira de Emas/SP; 5) Araras/SP; 6) Ouro Fino/MG; 7) Angatuba/SP; 8) Pilar do Sul/SP; 9) Sete Barras/SP.	111
Figura 7.2 –	Figura 7.2 – Cariótipos corados em Giemsa e Ag-RONs de <i>A. aff. fasciatus</i> . Exemplos provenientes de Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [2n=46 (a); 2n=48 (b); 2n=49 (c); 2n=50 (d)]; Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (e); Pilar do Sul/SP – bacia do rio Paranapanema (f); Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (g); Em (h) Ag-RONs mostrando sítios de ativação preferencial. Barras=5µm.	112
Figura 7.3 –	Metáfases de <i>A. aff. fasciatus</i> mostrando sítios de rDNA 18S (a-g) e 5S (h-i) indicados pelas setas. Padrão do rDNA 18S de exemplares provenientes de Salesópolis/SP [2n=46 (a); 2n=48 (b); 2n=49 (c); 2n=50 (d)]; Sete Barras/SP (e); Pilar do Sul/SP (f); Indaiatuba/SP (g); Padrão do rDNA 5S observado nos exemplares provenientes de Salesópolis/SP, Indaiatuba/SP e Pilar do Sul/SP (h); Padrão do rDNA 5S observado nos exemplares provenientes de Sete Barras/SP (i). Barras=5µm.	113
Figura 7.4 –	Árvore consenso de 314 mais parcimoniosas, construída pelo método de máxima parcimônia (MP) (número de passos = 244), mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 35 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,648649; Índice de Retenção (IR) = 0,763636. Os Valores de <i>bootstrap</i> (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i>	114
Figura 7.5 –	Árvores inferidas pelo método de Neighbor-Joining (NJ). a) Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. b) Árvore mostrando apenas topologia. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,5$). Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i> e eliminados nas comparações par-a-par (<i>Pairwise deletion option</i>). A soma do comprimento dos ramos foi de 0,408.	115
Figura 8.1 –	Mapa mostrando as populações de <i>A. altiparanae</i> e <i>A. aff. bimaculatus</i> sob estudo. Algarismos dentro dos círculos indicam as principais bacias hidrográficas do sudeste brasileiro: 1) rio Tietê; 2) rio Paranapanema; 3) rio Ribeira de Iguape; 4) rio Guapimirim. Letras indicam os pontos de coleta: Penápolis/SP (pe); Indaiatuba/SP (in); Salesópolis/SP (sa); Avaré/SP (rc); Pilar do Sul/SP (ps); Sete Barras/SP (pp, ad); Cachoeiras de Macacu/RJ (gp).	141
Figura 8.2 –	Cariótipos de <i>A. altiparanae</i> (a-b) e <i>A. aff. bimaculatus</i> (c-d) corados em Giemsa. Populações provenientes de Salesópolis/SP (a), Pilar do Sul/SP (b), Sete Barras/SP (c) e Cachoeiras de Macacu/RJ (d). Barra=5µm.	141
Figura 8.3 –	Metáfases de <i>A. altiparanae</i> (a-f) e <i>A. aff. bimaculatus</i> (g-l). Ag-RONs (primeira coluna), FISH-18S (segunda coluna) e FISH-5S (terceira coluna) das populações provenientes de Salesópolis/SP (a, b, c), Pilar do Sul/SP (d, e, f), Sete Barras/SP (g, h, i) e Cachoeiras de Macacu/RJ (j, k, l). Barra=5µm.	142
Figura 8.4 –	Metáfases de <i>A. altiparanae</i> (a-d) e <i>A. aff. bimaculatus</i> (e-h) submetidas ao bandamento-C (primeira coluna) e FISH com sonda do satDNA As-51 (segunda coluna). Populações provenientes de Salesópolis/SP (a, b), Pilar do Sul/SP (c, d), Sete Barras/SP (e, f) e Cachoeiras de Macacu/RJ (g, h). Barras=5µm.	143

Figura 8.5 –	Árvores construídas pelo método de máxima parcimônia (MP). Os Valores de <i>bootstrap</i> (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i> . a) Árvore consenso de 43 mais parcimoniosas (número de passos = 310) mostrando as relações evolutivas da região tRNA ^{met} +ND2 entre 17 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,929078; Índice de Retenção (IR) = 0,967742. b) Árvore consenso de 22 mais parcimoniosas (número de passos = 285) mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 21 indivíduos: IC = 0,577922; IR = 0,813754.	144
Figura 8.6 –	Árvores dos dados concatenados de 16 indivíduos usando 1.124 posições. Os Valores de <i>bootstrap</i> (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i> e eliminados apenas nas comparações par-a-par no método NJ-MCL (<i>Pairwise deletion option</i>). a) Árvore construída pelo método de máxima parcimônia (MP). Árvore consenso de 5 mais parcimoniosas (número de passos = 589) mostrando as relações evolutivas das regiões tRNA ^{met} +ND2 e ATPase8/6: Índice de Consistência (IC) = 0,802410; Índice de Retenção (IR) = 0,884017. b) Árvore concatenada inferida pelo método de Neighbor-Joining (NJ), linearizada e em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,61$). A soma do comprimento dos ramos foi de 0,857.	145
Figura 9.1 –	Árvore inferida pelo método de Neighbor-Joining (NJ), em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,73$). A calibração do relógio molecular para converte distância em tempo foi aproximadamente 75,443 (tempo/altura do nó). Os Valores de <i>bootstrap</i> (100 réplicas) estão próximos dos ramos. Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i> e eliminados nas comparações par-a-par (<i>Pairwise deletion option</i>). A soma do comprimento dos ramos foi de 2,268.....	167
Figura 9.2 –	Árvore consenso de 104 mais parcimoniosas, construída pelo método de máxima parcimônia (MP) (número de passos = 1562), mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 118 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,535131; Índice de Retenção (IR) = 0,937476. Os Valores de <i>bootstrap</i> (100 réplicas) estão próximos dos ramos. Os <i>gaps</i> foram tratados como <i>missing data</i>	168
Figura 9.3 –	Clado 1 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP), mostrando as relações evolutivas entre os “lambaris de rabo vermelho”.....	169
Figura 9.4 –	Clado 2 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP) , mostrando as relações evolutivas entre os “lambaris de rabo amarelo”.....	170
Figura 9.5 –	Clado 3 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP) , mostrando as relações evolutivas entre os lambaris provenientes da drenagem costeira.....	171

SUMÁRIO

Resumo	iii
Abstract	v
Lista de Figuras.....	vii
Sumário	x
Capítulo I – Introdução Geral – Biologia evolutiva do gênero <i>Astyanax</i>	01
1.1 – O ambiente dos <i>Astyanax</i> fomenta processos evolutivos.....	01
1.2 – Aspectos taxonômicos: grupo complexo.....	05
1.3 – Cromossomos no gênero <i>Astyanax</i> : variabilidade excessiva?.....	06
1.4 – DNA mitocondrial, estudos evolutivos e sua aplicação no gênero <i>Astyanax</i>	10
1.5 – Objetivos	13
Capítulo II – Citogenética Molecular do lambari cego mexicano e observações sobre a evolução cariotípica do gênero <i>Astyanax</i> (Teleostei, Characidae).....	16
Capítulo III – <i>Astyanax bockmanni</i> Vari & Castro, 2007: um cariótipo ambíguo no gênero <i>Astyanax</i>	35
Capítulo IV – <i>Astyanax hastatus</i> (Teleostei, Characidae): um novo complexo de espécies no gênero <i>Astyanax</i> ?.....	46
Capítulo V – Citogenética molecular de <i>Astyanax ribeirae</i> (Teleostei, Characidae), um lambari endêmico da mata Atlântica	61
Capítulo VI – Padrão biogeográfico da distribuição cromossômica de um DNA satélite em <i>Astyanax aff. fasciatus</i> (Teleostei, Characidae) das bacias do sudeste brasileiro	73

Capítulo VII – <i>Astyanax</i> aff. <i>fasciatus</i> (Teleostei, Characidae) do sudeste do Brasil: análises citogenéticas e filogeográficas.....	93
Capítulo VIII – Citogenética comparativa e filogeografia molecular do grupo <i>Astyanax altiparanae-bimaculatus</i> (Teleostei, Characidae)	116
Capítulo IX – Relações evolutivas de espécies do gênero <i>Astyanax</i> : análises cromossômicas e moleculares	146
Capítulo X – Conclusões – Padrões e processos evolutivos observados no gênero <i>Astyanax</i>	172
10.1 – Os <i>Astyanax</i> da drenagem costeira.....	173
10.2 – Os <i>Astyanax</i> das drenagens circunvizinhas ao sistema dos Rios Costeiros.....	175
10.3 – Demais espécies utilizadas nas análises.....	177
10.4 – A abordagem multidisciplinar e sua contribuição à biologia evolutiva dos <i>Astyanax</i>	178
Referências Bibliográficas.....	180
Biografia	195
Anexo	197



Capítulo 1

Capítulo I

Introdução Geral – Biologia evolutiva do gênero *Astyanax*

1.1 O ambiente dos *Astyanax* fomenta processos evolutivos

Os rios que compõem o sistema de drenagem do Leste correm exclusivamente em território brasileiro, e se estendem da foz do rio São Francisco até o rio Itajaí (PAIVA, 1982). Podem ser identificadas três principais drenagens nesta ampla distribuição: a do rio Paraíba do Sul; a do rio Ribeira de Iguape e o conjunto de drenagens atlânticas independentes, ou Rios Costeiros.

Segundo CASTRO e MENEZES (1996), a ictiofauna da porção paulista da bacia do rio Paraíba do Sul está agrupada em 22 famílias e aproximadamente 166 espécies, representadas primariamente por espécies de pequeno porte, habitantes de pequenos cursos de água que constituem cabeceiras hidrográficas. As porções superiores da bacia do rio Ribeira do Iguape (que apresenta 12 famílias e 54 espécies de peixes), ainda contidas em manchas relativamente intactas de Floresta Costeira Atlântica, apresentam uma rica fauna de peixes de pequeno porte, associada a riachos correntosos de floresta, ainda pouco estudada. Considera-se que o número de espécies desta bacia seja subestimado, uma vez que ictiólogos estimam o total de espécies da região em torno de 150 (CASTRO e MENEZES, 1996). Tal estimativa certamente relaciona-se ao fato de que córregos com mata ciliar mais bem preservada mantêm maior riqueza de espécies de peixes em comparação com áreas com cobertura vegetal mais degradada (BURCHER *et al.*, 2008).

Por sua vez, o conjunto dos Rios Litorâneos, contém 15 famílias e 48 espécies de peixes de água doce. Embora, em termos numéricos, menos diversa do ponto de

vista taxonômico que as outras regiões, é a mais rica em formas endêmicas (cerca de 80% dos Ostariophysi dos rios costeiros do leste do Brasil são endêmicos), já que possui uma longa história evolutiva independente de suas bacias componentes. Este número deverá aumentar significativamente quando a região for mais bem explorada (CASTRO e MENEZES, 1996).

A bacia do rio Paraná circunda grande parte do sistema de drenagem do Leste, com o qual teve óbvia relação pretérita (AB'SABER, 1957) e é considerada uma das oito regiões faunísticas da América do Sul (GÉRY, 1969). O Paraná é o principal rio da bacia do Prata e o segundo maior em extensão do continente. Desde sua nascente, no rio Paranaíba, até sua foz, ele percorre cerca de 3.800 km, e ao longo dessa distribuição habitam cerca de 35 famílias, representadas por 230 espécies de peixes, sendo a família Characidae a mais expressiva em número de espécies (AGOSTINHO e JÚLIO JR., 1999). De fato, a família Characidae abrange mais da metade dos caracóides neotropicais, e é composta em sua grande maioria pelos pequenos "tetras" (LOWE-McCONNELL, 1999). Segundo CASTRO e MENEZES (1996), a porção paulista do Alto rio Paraná possui 22 famílias e aproximadamente 166 espécies de peixes.

Embora estes números reflitam em termos absolutos a biodiversidade conhecida nas respectivas bacias, nem todas as espécies listadas ocorrem em todo biótopo. Em alguns casos ocorrem meros agregados de peixes, retidos pela retração da água no período da seca, o que não representaria comunidades verdadeiras (consideradas um registro de acumulações de espécies durante tempos geológicos) (LOWE-McCONNELL, 1999), para as quais processos e padrões evolutivos precisam ser sugeridos com cuidado.

A história natural da ictiofauna das drenagens da costa brasileira está relacionada com a geomorfologia da região e, segundo ALMEIDA e CARNEIRO (1998),

esta é caracterizada pela presença da Serra do Mar, um conjunto de escarpas festonadas com cerca de 1.000 km de extensão, que se estende do Rio de Janeiro até norte de Santa Catarina. No Estado do Paraná configura uma cadeia de montanhas com cimos elevados até a 1.800 m de altitude. Em São Paulo, impõe-se como típica borda de planalto, freqüentemente nivelada pelo topo em altitudes de 800 a 1.200 m. Embora percorra grande distância, a Serra do Mar é interrompida na região do Vale do Ribeira de Iguape. Neste trecho, a posição da Serra do Mar como borda limite do planalto passou a ser desempenhada pela Serra de Paranapiacaba, bem mais para o interior da região (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998). A Serra do Mar, portanto, representa um imponente divisor das águas que correm dentro do continente e deságuam na bacia do Prata daquelas que drenam para o oceano Atlântico.

Regiões montanhosas, como esta, impõem aos organismos pressões seletivas particulares, devidas principalmente a sua topografia. A geografia e a demografia populacional têm desempenhado papel fundamental na maioria dos cenários de especiação (MAYR, 1942; 1963). Segundo FUTUYMA (1997), animais aquáticos mostram uma maior diversidade regional em regiões montanhosas onde há sistemas de rios isolados e o isolamento geográfico de espécies de peixes nas cabeceiras dos rios pode levar estas comunidades a processos evolutivos importantes, culminando na especiação por alopatria. Segundo FUTUYMA e MAYER (1980), a especiação alopátrica é o principal meio de especiação na natureza e a divisão de sub-populações pode impedir o fluxo gênico, levando tais grupos a tornarem-se suficientemente divergentes, até constituírem espécies distintas. Populações geograficamente distantes, ou nas quais não há fluxo gênico, são mais freqüentemente isoladas por esterilidade ou diferenças etológicas que populações vizinhas. Uma evidência para a diferenciação alopátrica é fornecida pela freqüente correspondência entre

descontinuidade biológica e topográfica (FUTUYMA, 1997). Além disso, sistemas de rios tropicais de grande porte admitem que algumas espécies de peixes se isolem geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras intrapopulacionais físicas, químicas ou bióticas, permitindo que estas evoluam dentro do próprio sistema (LOWE-McCONNELL, 1969). Dentre estes fatores, as pressões seletivas bióticas parecem exercer um papel preponderante nos ambientes de baixa latitude. DOZBZHANSKY (1950) ressaltou que a seleção biótica parece ser de importância especial nas comunidades tropicais e, sendo dependente da densidade, pode ser mais moduladora em seus efeitos do que a seleção abiótica (independente da densidade) encontrada em ambientes temperados (sazonais); tais pressões bióticas podem ser responsáveis pelas sutilezas de semelhanças protetoras e manifestações de mimetismo nas faunas tropicais. A constante interação entre predador e presa, com o desenvolvimento de mecanismos para evitar que sejam predados, em contrapartida às adaptações no predador, contrapostas por mecanismos de comportamentos adicionais antipredatórios, é um aspecto das comunidades sul-americanas de insetos, e a mesma situação parece ocorrer para os peixes tropicais (LOWE-McCONNELL, 1999).

A especiação também pode ocorrer repentinamente em pequenas populações pela ação de eventos como poliploidização, rearranjos cromossômicos ou mudanças no sistema de cruzamentos aleatórios (AVISE, 2004).

Entretanto, a divergência dos organismos aquáticos nas cabeceiras de rios está também relacionada com os aspectos físicos destes ambientes, pelo fato de estes apresentarem condições abióticas peculiares, como também uma peculiar fauna ictiológica. Pequenas alterações ecológicas (como temperatura da água, pH, condutividade, disponibilidade de oxigênio e turbidez) ocorrem mais rapidamente

nestes ambientes se comparados a rios de grande porte, em situações de mudanças climáticas (LOWE-MCCONNELL, 1969).

Em se tratando da ictiofauna de riachos, pode-se supor que estes ambientes exerceram pressões de seleção, favorecendo fortemente o pequeno porte das espécies componentes (CASTRO, 1999). Entre os peixes de pequeno porte habitantes destes cursos d'água verifica-se a presença dos representantes do gênero *Astyanax*, cuja distribuição é observada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (EIGENMANN, 1921).

1.2 Aspectos taxonômicos: grupo complexo

O gênero *Astyanax* abrange peixes conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977). Seus exemplares possuem tamanho reduzido, tendo como principais características morfológicas: nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão, e escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1988). Os lambaris são peixes não-migradores, com fecundação externa e ausência de cuidado parental (VAZZOLLER e MENEZES, 1992).

EIGENMANN (1921) propôs a existência de 74 espécies e subespécies neotropicais de *Astyanax*, enquanto GÉRY (1977) afirma haver mais de 62 espécies e subespécies apenas em rios brasileiros. GARUTTI (1995; 1998), entretanto, sustenta que este gênero é composto por aproximadamente 100 espécies e subespécies. Além

de esse número não ser exato, MELO (2001) argumenta que é provável que muitas espécies ainda estejam por ser descritas. De fato, muitos autores têm apresentado à comunidade científica a descrição de táxons recentemente descobertos (CASTRO e VARI, 2004; LIMA e ZUANON, 2004; BERTACO e LUCINDA, 2005; HALUCH e ABILHOA, 2005; BERTACO e LUCENA, 2006; BERTACO e GARUTTI, 2007; VARI e CASTRO, 2007), embora os pequenos tetras sejam bastante semelhantes em sua aparência e difíceis de serem identificados (LOWE-MCCONNELL, 1999).

Em revisão recente foram listadas cerca de 90 espécies válidas, as quais se encontram *insertae sedis* dentro da família Characidae (REIS *et al.*, 2003). É possível que a variação do número de espécies do gênero *Astyanax* seja devida a erros amostrais. Segundo GARUTTI (1988), um número muito grande de espécies, muitas das quais descritas com base em um número muito reduzido de exemplares, tem sido colocado nesse gênero. Neste sentido, trabalhos de redefinição das espécies já descritas, como o de MELO e BUCKUP (2006), têm contribuído para a elucidação da história evolutiva do gênero, eliminando possíveis redundâncias nas descrições específicas.

Dentre os *Astyanax* de ocorrência registrada na região da drenagem dos Rios Costeiros e Alto Paraná, destacam-se *A. fasciatus*, *A. bimaculatus*, *A. bockmanni*, *A. giton*, *A. hastatus*, *A. intermedius*, *A. parahybae*, *A. ribeirae*, *A. scabripinnis*, e *A. teniatus* (compilado com base em REIS *et al.*, 2003).

1.3 Cromossomos no gênero *Astyanax*: variabilidade excessiva?

O número diplóide no gênero *Astyanax* vai de $2n=36$ a $2n=50$ cromossomos, e a grande variabilidade cariotípica observada torna difíceis quaisquer inferências

sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo nas espécies com alto grau de polimorfismos (para revisão veja PAZZA e KAVALCO, 2007).

A. schubarti possui o menor número cromossômico do gênero, com pequenas variações em relação às fórmulas cariotípicas (MORELLI *et al.*, 1983; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001, 2005). Além de *A. schubarti*, pelos estudos realizados até o momento, outras espécies também possuem números cromossômicos conservados. Por exemplo, *A. parahybae* apresenta $2n=48$ cromossomos nas duas populações estudadas, uma no alto (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003) e outra no médio Paraíba do Sul (CENTOFANTE *et al.*, 2003). Entretanto, a maioria das espécies de *Astyanax* com número cromossômico conservado apresenta $2n=50$ cromossomos. Em geral trata-se de espécies de distribuição restrita, endêmicos de certas bacias hidrográficas e com poucas amostragens ao longo dos sistemas hidrográficos em que habitam (PAZZA e KAVALCO, 2007). Por esta razão, na medida em que os estudos avançarem, é possível que este agrupamento se mostre artificial e não reflita a real situação dos números diplóides destas espécies.

No gênero *Astyanax* são observados “complexos de espécies”, relativos a pelo menos três grupos, onde tanto números diplóides quanto fórmulas cariotípicas são variáveis: *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991); *A. fasciatus* (JUSTI, 1993; PAZZA *et al.*, 2006) e *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). Nos “complexos” *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* é observado alto grau de variabilidade, sobretudo no tocante às suas macroestruturas cariotípicas, números diplóides, presença de cromossomos supranumerários ou Bs e polimorfismos de blocos heterocromáticos e das regiões organizadoras nucleolares (RONS). A variação no número cromossômico em espécies de *Astyanax* pode ainda ser devida à ocorrência de triploidias (PAZZA e KAVALCO, 2007). No “complexo” *A. altiparanae*, entretanto, a

diversidade cariotípica parece estar limitada à macroestrutura cariotípica, uma vez que outros tipos de polimorfismos cromossômicos estão ausentes.

A ocorrência desses “complexos de espécies” demonstra a dificuldade de inferir a filogenia cromossômica do grupo, uma vez que é relativamente pequeno o número de espécies informativas de *Astyanax* analisadas, e estas apresentam grande diversidade. Ainda, diante da variação observada nas análises cromossômicas, não é difícil concordar que o grupo possa ter origem polifilética, como foi sugerido por WEITZMAN e MALABARBA (1998), baseando-se em análises morfológicas do gênero.

Os dados referentes às espécies de ocorrência na bacia do Leste são escassos, estando praticamente limitados à drenagem do rio Paraíba do Sul. Dentre as espécies de ocorrência registrada na bacia do rio Paraíba do Sul há dados citogenéticos para populações de *A. scabripinnis* – $2n=50$ (SOUZA e MOREIRA-FILHO, 1995; NEO *et al.*, 2000, 2001; FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *A. parahybae* – $2n=48$ (JUSTI, 1993; HERAS, 1998; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *A. giton* e *A. intermedius* – ambos com $2n=50$ cromossomos (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). *A. janeiroensis*, proveniente da bacia do rio Ribeira de Iguape, possui $2n=50$ cromossomos (CARVALHO *et al.*, 2002). As demais espécies ocorrentes na região costeira ainda não foram estudadas do ponto de vista citogenético.

Apesar de ainda incipientes, os estudos na região puderam indicar a evidência citogenética de agrupamentos bem definidos na bacia do rio Paraíba do Sul (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO *et al.*, 2004, 2007). Segundo os autores, na sub-bacia do rio Paraitinga são observados dois grupos, um possuidor de poucos cromossomos acrocêntricos, com presença de DNA satélite pAs-51 e sítios GC-ricos (constituído das espécies *A. scabripinnis* e *A. parahybae*), e outro grupo, com muitos cromossomos

acrocêntricos, sem heterocromatina GC-rica ou DNA satélite pAs-51 (formado por *A. giton* e *A. intermedius*).

Mais um suporte a estes dados é fornecido pela localização gênica de sítios de rDNA 5S. Dentre estas espécies, podem-se verificar claramente dois grupos com relação ao número e localização dos loci deste DNA ribossômico. *A. scabripinnis* e *A. parahybae* possuem um sítio intersticial em um cromossomo metacêntrico, ausente em *A. giton* e *A. intermedius* (KAVALCO *et al.*, 2004). A ocorrência deste sítio em *A. scabripinnis* e *A. parahybae*, previamente observado em outras espécies do gênero *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002), além de um número reduzido de loci gênicos (6 e 4, respectivamente), denota o provável relacionamento entre estas espécies e outras ocorrentes nas bacias do rio Tietê e São Francisco, e seu distanciamento de *A. intermedius* e *A. giton*, ambos possuidores de 10 sítios de rDNA 5S.

Adicionalmente, através de análises multivariadas das similaridades cariotípicas dos dados publicados para o gênero *Astyanax*, PAZZA E KAVALCO (2007) geraram um dendrograma de Neighbour-Joining, baseado na distância euclidiana, onde é possível observar que os cariótipos de *A. giton* e *A. intermedius* são mais semelhantes ao de outra população de *A. scabripinnis* do Paraíba do Sul do que com *A. scabripinnis* e *A. parahybae* do rio Paraitinga, grupando ainda com *A. janeiroensis*, *A. schubarti* e uma população de *A. scabripinnis* dos rios Costeiros.

As características apontadas tornam interessantes os estudos neste grupo, sobretudo no sistema hidrográfico do Leste brasileiro, uma vez que tais tendências talvez ocorram igualmente nas demais espécies e/ou populações da região, muitas das quais são ainda desconhecidas do ponto de vista citogenético.

1.4 DNA mitocondrial, estudos evolutivos e sua aplicação em *Astyanax*

A análise da similaridade nucleotídica pode fornecer dados para estudos de relações evolutivas, sendo possível para tal, a escolha de genes mitocondriais e nucleares. Segundo PAGE e HOLMES (1998), cada uma das diferentes técnicas para inferência filogenética tem sua vantagem e desvantagem, e sua aplicação correta depende do grupo taxonômico a ser estudado e as hipóteses a serem testadas, ou seja, o direcionamento filogenético das questões. Para os autores, os dados moleculares, particularmente a seqüência nucleotídica, oferecem potencialmente uma imensidade de informações, que ultrapassa a extensão do vasto conhecimento taxonômico.

Os dados de seqüenciamento possibilitam a visualização de diferenças moleculares com alta resolução (transições *versus* transversões; substituições sinônimas *versus* não sinônimas; substituições de nucleotídeos *versus* inserções ou deleções; mudanças em regiões codificantes ou não, etc.), e podem ser aplicados para análises intra-específicas, quando genes ou regiões com evolução mais rápida são os indicados para análise, ou entre táxons superiores, quando genes que evoluem mais lentamente são a melhor escolha (AVISE, 2004). Por exemplo, a região controle do mtDNA (D-loop) normalmente é utilizada para estudos populacionais, enquanto o Citocromo *b*, encontrado na mesma molécula, geralmente é utilizado para análises em táxons acima do nível de espécie (PEREIRA, 2000).

O genoma mitocondrial apresenta algumas particularidades, entre as quais o fato de codificar, de leveduras a mamíferos, praticamente as mesmas proteínas, apesar de possuir distintas organizações gênicas (BOORE, 1999). O mtDNA dos vertebrados é muito pequeno (15 a 20 kb), com uma organização extremamente compacta, com 37 genes (Figura 1.1) e poucos nucleotídeos intergênicos não-codificantes, apesar de aparecer em várias (10^2 a 10^4) cópias por célula (PEREIRA,

2000). Características como alta taxa de evolução em relação à do DNA nuclear; ausência de recombinação (na maioria dos casos) e herança predominantemente materna, entre outras, o tornam visado para estudos genéticos e evolutivos (AVISE *et al.*, 1987). Embora incomuns, evidências de recombinação no mtDNA de peixes foram observadas, por exemplo, em linguados (HOARAU *et al.*, 2002) e em carpas triplóides (Guo *et al.*, 2006).

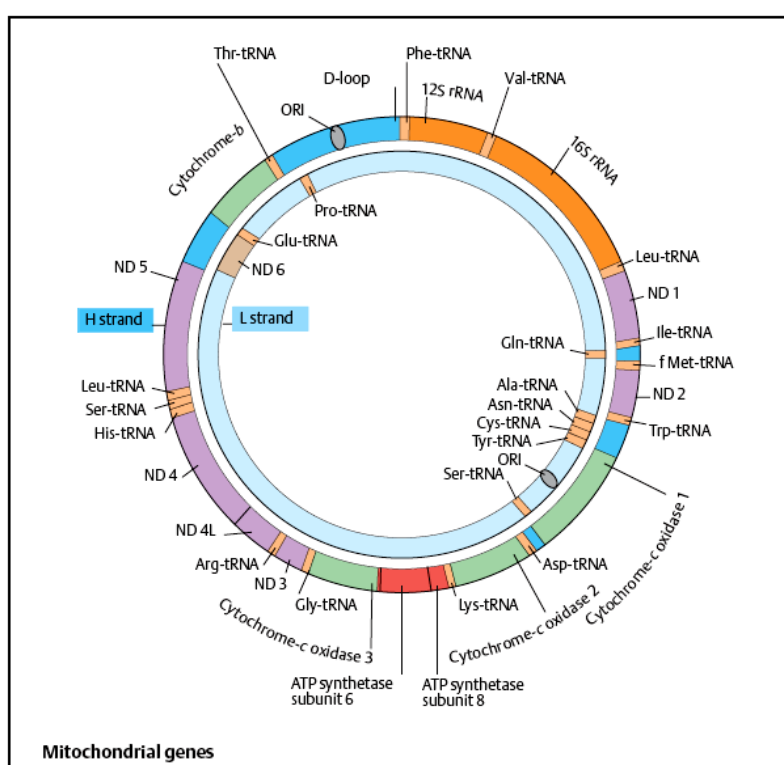


Figura 1.1 – Esquema mostrando a organização do mitogenoma de vertebrados. Fonte: Passarge (1995).

A organização básica do mtDNA de alguns grupos de vertebrados, considerada conservada (Figura 1.1), é assumida como tendo a região controle não codificante, 13 genes que codificam para proteínas, dois genes de rRNAs, e 22 tRNAs arranjados numa molécula circular (JOHANSEN *et al.*, 1990). Em alguns peixes são observados rearranjos na organização do genoma mitocondrial (MIYA e NISHIDA, 1999; MIYA *et al.*,

2001, 2003; MABUCHI *et al.*, 2004), normalmente com relação aos genes de tRNAs (STANTON *et al.*, 1994). Entretanto, em exemplares da subordem Notothenioidei (Perciformes) provenientes da Antártida não foi observada a existência da região que codifica o gene da subunidade 6 da NADH-desidrogenase e do tRNA^{Glu} (PAPETTI *et al.*, 2007). A região controle do mtDNA, ou *D-loop*, é responsável pela variação no tamanho da molécula (URSING e ARNASON, 1998), que pode ser de 6 kb até mais de 2000 kb, se considerados todos os organismos já analisados (PAGE e HOLMES, 1998).

Vários trabalhos têm aplicado a análise de seqüências do mtDNA para o estudo das relações evolutivas entre os peixes, entretanto, os grupos neotropicais ainda possuem poucas informações a esse respeito (ALVES-GOMES *et al.*, 1995; ORTÍ *et al.*, 1996; ORTÍ e MEYER, 1997; HILSDORF *et al.*, 2002; SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2004; MOYSÉS, 2005).

Com relação ao gênero *Astyanax*, os recentes estudos com marcadores moleculares são ainda incipientes, estando relacionados a ferramentas como o RAPD – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (PAIVA *et al.*, 2001; GALINDO *et al.*, 2002; MATOSO, 2002; PRIOLI *et al.*, 2002; LEUZZI *et al.*, 2004; PAZZA *et al.*, 2007), RFLP – polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (TOLEDO *et al.*, 2002; MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002; MATOSO, 2002), e ISSR – repetições entre seqüências únicas (PAZZA *et al.*, 2007). As análises de seqüências gênicas são observadas em poucos trabalhos (ORTÍ e MEYER, 1997; VIEIRA *et al.*, 2001; PRIOLI *et al.*, 2002; STRECKER *et al.*, 2003, 2004; CALCAGNOTTO *et al.*, 2005), sendo ausentes em espécies da região costeira. Os estudos de seqüências nucleares ainda não foram aplicados na resolução de problemas intrínsecos do gênero, como na abordagem filogenética entre diferentes espécies.

Segundo VIEIRA *et al.* (2001), as estimativas de distância genética entre dez populações de *A. scabripinnis*, obtidas através do seqüenciamento do gene mitocondrial 12S rRNA, indicam que se trata de um grupo polifilético, como sugerido anteriormente por estudos citogenéticos. O polifiletismo do gênero também ficou evidente em análises de seqüências nucleares e mitocondriais de *A. bimaculatus* e *A. scabripinnis*, em um estudo das relações evolutivas da ordem Characiformes (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005). Por outro lado, foi observada alta similaridade em análises de seqüências mitocondriais (incluindo a região controle) de populações de *A. altiparanae* do rio Iguaçu (PRIOLI *et al.*, 2002), o que indica que a variação no gênero *Astyanax* pode ser ampliada por ser um agrupamento artificial, e demonstra seu grande potencial para estudos genéticos e evolutivos, além da necessidade de revisões taxonômicas.

1.5 Objetivos

A ictiofauna da bacia do Leste possui formas endêmicas, provavelmente em virtude das características geológicas da região e dos processos evolutivos que ocorrem nas pequenas populações habitantes de cabeceiras. Esta fauna, extremamente interessante pela existência de isolados populacionais, que podem proporcionar abruptamente eventos de especiação, carece de estudos que visem à compreensão de sua biodiversidade e de suas relações evolutivas.

A rica biodiversidade dos pequenos peixes habitantes das cabeceiras de rios é facilmente observada nos *Astyanax*, tanto com relação a sua morfologia como nos estudos citogenéticos. A complementação das análises citogenéticas com dados moleculares, utilizando-se a comparação das seqüências nucleotídicas com a finalidade de serem identificadas possíveis relações de parentesco, pode auxiliar na

visualização do panorama evolutivo do gênero na região. Em vista destes dados, o presente trabalho buscou:

1 – Efetuar estudos cariotípicos em espécies do gênero *Astyanax* provenientes da bacia do Leste brasileiro, na tentativa de mapear os eventos ocorridos na divergência cromossômica do grupo, comparando os dados obtidos com os dados disponíveis para populações previamente estudadas;

2 – Analisar os complementos cromossômicos de populações de *Astyanax* provenientes de bacias circunvizinhas ao sistema de drenagem do Leste e estabelecer comparações com os dados disponíveis na literatura;

3 – Realizar o seqüenciamento nucleotídico de regiões do genoma mitocondrial, com a finalidade de perfazer análises das relações evolutivas de espécies do gênero *Astyanax*, sobretudo nas previamente caracterizadas pelos estudos citogenéticos.

Para elucidação destes questionamentos, propuseram-se a utilização de análises cromossômicas (coloração convencional, bandamento C, detecção das regiões organizadoras de nucléolos, hibridação *in situ* fluorescente utilizando sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e do DNA repetitivo pAs-51, e aplicação de fluorocromos base específicos) e moleculares [amplificação, purificação e seqüenciamento de fragmentos mitocondriais que correspondem às seqüências parciais do tRNA da metionina (tRNA^{MET}) e da subunidade 2 do gene da NADH-desidrogenase (ND2); e das subunidades 6 e 8 da ATPase e de região parcial da subunidade 3 do gene da citocromo-oxidase (CO3)], em exemplares de diversas populações e espécies de *Astyanax* e de espécies relacionadas, provindos de diferentes bacias hidrográficas brasileiras.

Tais dados, numa abordagem conjunta, propiciaram a obtenção de caracteres diagnósticos entre populações e/ou espécies e de inferências filogenéticas para algumas espécies do gênero *Astyanax* que habitam as regiões dos rios costeiros e continentais das regiões sul e sudeste do Brasil.



Capítulo 2

Capítulo II

Citogenética molecular do lambari cego mexicano e observações sobre a evolução cariotípica do gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae).¹

Abstract

Astyanax mexicanus is popularly known as the blind Mexican tetra or blind cave tetra and has been extensively studied regarding various aspects of its biology and genetics. Despite the identification of linkage maps of genes related to QTLs (Quantitative Trait Loci) by many recent studies, only its diploid number was known from a cytogenetical point of view. With the purpose of providing a base for comparative studies and for the elucidation of physical maps for the species, cytogenetical studies were performed in a group of 10 blind specimens from Mexico. All the individuals presented $2n=50$ chromosomes and a karyotypic formula composed of $8M+18SM+12ST+12A$. A few specimens presented one or two B microchromosomes of the acrocentric type. Although simple Ag-NORs were evidenced, FISH (fluorescence *in situ* hybridization) with an 18S rDNA probe evidenced eight sites, and six sites were observed with a 5S rDNA probe. Little constitutive heterochromatin was observed, mainly related with the Ag-NOR region and located close to the centromeres, including those from the B microchromosomes. A few pericentromeric heterochromatin regions were mainly constituted by GC, including the one from the Ag-NOR. Very subtle markings were observed by FISH with an As-51 satellite DNA probe. The B microchromosome did not present

¹ KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF. Molecular Cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic evolution of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). Zebrafish 4(2):103-111, 2007. (Anexo I)

ribosomal genes or satellite DNA. Chromosomal aspects of the genus *Astyanax* are discussed.

Resumo

Astyanax mexicanus é conhecido popularmente como tetra cego mexicano ou tetra cego das cavernas, e tem sido extensivamente estudado com relação a vários aspectos de sua genética e biologia. Apesar da recente identificação de mapas de ligação de genes relacionados a QTLs (Loci de caracteres quantitativos), apenas seu número diplóide é conhecido do ponto de vista citogenético. Com o objetivo de prover a base para estudos comparativos e a elucidação de mapas físicos para a espécie, estudos citogenéticos foram realizados em um grupo de 10 exemplares cegos provindos do México. Todos os indivíduos apresentaram $2n=50$ cromossomos e fórmula cariotípica composta por $8M+18SM+12ST+12A$. Poucos espécimes apresentaram um ou dois microcromossomos B do tipo acrocêntrico. Embora Ag-RONs simples tenham sido identificadas, a hibridação fluorescente *in situ* – FISH – com sonda de rDNA 18S evidenciou oito sítios, e seis sítios foram observados com a sonda de rDNA 5S. Pouca heterocromatina constitutiva foi observada, em sua maioria relacionada com as Ag-RONs ou localizada próxima aos centrômeros, incluindo aquela observada no microcromossomo B. Algumas destas heterocromatins apresentaram-se constituídas predominantemente por bases GC, incluindo a da região das Ag-RONs. Foram observadas marcações bastante sutis através da FISH com sonda de DNA satélite As-51. O microcromossomo B não apresentou genes ribossômicos ou DNA satélite. Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* são discutidos.

Introdução

O grupo *Astyanax* abrange peixes conhecidos popularmente como piabas ou lambaris, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977). Em recente revisão foram listadas cerca de 90 espécies válidas, as quais se encontram *insertae sedis* na família Characidae (REIS *et al.*, 2003).

Além dos estudos referentes à análise da macroestrutura dos cromossomos, localização de cístrons ribossômicos e DNAs satélites, a caracterização de seqüências oriundas de cromossomos B também produziu dados interessantes (MESTRINER *et al.*, 2000), os quais colocam o gênero numa posição de destaque em relação a outros grupos de distribuição neotropical, ainda pouco explorados neste sentido. Segundo LANGECKER *et al.* (1995) e JEFFERY (2001), o gênero *Astyanax* tem se mostrado um excelente modelo para estudos gerais sobre mecanismos evolutivos.

Astyanax mexicanus, conhecido no meio aquarista como tetra cego, é uma das 86 espécies de peixes que habitam regiões cavernícolas e apresentam traços troglomórficos (ROMERO e PAULSON, 2001). A espécie era considerada subespécie de *A. fasciatus* (MELO, 2001), um grupo com expressiva variabilidade cariotípica, do qual vários citótipos ($2n=45$ a $2n=48$) são observados convivendo em simpatria, sem aparente hibridismo (PAZZA *et al.*, 2006).

Estudos citogenéticos em *A. mexicanus* foram realizados nas décadas de 60, 70 e 80, e caracterizaram o número diplóide de três populações, uma das quais foi citada como *Astyanax jordani*, uma sinonímia antiga de *A. mexicanus*. Tais estudos identificaram dois números diplóides diferentes, $2n=50$ (KIRBY *et al.*, 1977; VASIL'EV, 1980) e $2n=48$ (POST, 1965). Dados mais refinados sobre a estrutura dos cromossomos dessa espécie, como padrões de bandamentos e localização de genes e

seqüências de DNA, são ausentes, impossibilitando abordagens comparativas com as demais espécies do gênero.

A característica da ausência de visão nas populações cavernícolas, decorrente da supressão da expressão do gene *Pax6* e posterior degeneração da estrutura ocular (TIAN e PRICE, 2005), despertou o interesse para estudos da biologia evolutiva e do desenvolvimento dos olhos, para os quais *A. mexicanus* tornou-se um modelo (JEFFERY, 2001). Populações subterrâneas de *A. mexicanus* exibem olhos degenerados, afundados nas órbitas e cobertos com uma camada de pele; redução ou perda completa da pigmentação melânica; sistema gustativo expandido e outros traços troglomórficos (DOWLING *et al.*, 2002). Além disso, apresentam metabolismo mais eficiente e são mais sensíveis a estímulos químicos e mecânicos, características que constituem, obviamente, pontos de divergência (PANARAM e BOROWSKY, 2005).

Os estudos sobre o grupo têm identificado desde grupos de genes importantes no desenvolvimento morfológico das estruturas oculares (JEFFERY *et al.*, 2003) até o padrão de herança dos alelos que produzem o fenótipo cego, exclusivo de populações cavernícolas. Através do cruzamento controlado em laboratório entre as formas cavernícolas e de superfície, marcadores quantitativos do tipo QTL têm sido isolados e mais de 30 grupos de ligação foram identificados (PROTAS *et al.*, 2006). O hibridismo natural como consequência de contato secundário entre as formas de superfície e cavernícola de *A. mexicanus* ocorre em cerca de 30% das populações estudadas (MITCHELL *et al.*, 1977), embora estudos genéticos e bioquímicos indiquem baixos níveis de heterozigosidade nas populações subterrâneas (AVISE e SELANDER, 1972; PANARAM e BOROWSKY, 2005), talvez devido à infertilidade das proles (BOROWSKY e WILKENS, 2002).

Estudos biogeográficos de *A. mexicanus* sugerem dois eventos de colonização no continente norte-americano, de acordo com filogeografia obtida a partir de seqüências do DNA mitocondrial de populações de caverna e de superfície. As populações de caverna são divididas em dois grupos: SEP, com olhos grandes e pigmentação reduzida; e VEP, com olhos variáveis e presença de pigmentação (WILKENS, 1988). Embora geograficamente próximas, populações SEP em geral são mais distantes das populações VEP e de superfície, enquanto as formas VEP são mais próximas das populações de superfície. STRECKER *et al.* (2004) sugerem que após a primeira migração, ocorrida após a formação do Istmo do Panamá por volta de 4,5 milhões de anos atrás, as populações de superfície nas regiões mais ao Norte sucumbiram ao frio, enquanto as populações de caverna (SEP) e mais ao Sul da América Central ficaram protegidas. Com a elevação da temperatura, entre 1,8 e 3,0 milhões de anos, uma nova migração aconteceu, recolonizando as regiões de superfície e alcançando novas regiões cavernícolas (STRECKER *et al.*, 2004).

Com o intuito de fornecer dados citogenéticos recentes e complementares aos anteriormente descritos, que possibilitem estudos comparativos, foram realizadas análises cariotípicas em exemplares do tetra cego, *Astyanax mexicanus*, do grupo SEP. Foram utilizadas, além das metodologias de bandamento cromossômico convencional e fluorocromos, a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNAs 18S e 5S e de um DNA satélite isolado de *Astyanax scabripinnis* (As-51). Aspectos da evolução cariotípica do gênero *Astyanax* e das particularidades biológicas de *A. mexicanus* são discutidos.

Material e Métodos

Foram estudados 10 exemplares de *Astyanax mexicanus*, provenientes de estoques importados do México para fins de aquariofilia no Brasil. O comprimento padrão médio dos exemplares foi de 40 mm. Devido ao seu tamanho reduzido, não foi possível realizar a sexagem dos animais. Os exemplares apresentam ausência total de pigmentação e do desenvolvimento de estruturas perceptíveis relacionadas à visão.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo GOLD *et al.* (1990), utilizando solução de Hanks para melhor controle do tempo de ação da colchicina. A impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RON – Regiões Organizadoras de Nucléolos Argeofílicas) seguiu o protocolo de KAVALCO e PAZZA (2004), utilizando-se aparelho de microondas. A localização direta dos cístrons ribossômicos foi realizada através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006), com sondas específicas 18S (HATANAKA e GALETTI Jr., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI Jr., 1999).

Adicionalmente, foi realizada FISH utilizando sonda de DNA satélite As-51, isolada a partir de uma população de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000). Com intuito de evitar resultado falso-negativo ou falso-positivo, as preparações de *A. mexicanus* foram submetidas ao procedimento de FISH juntamente com lâminas de preparações de *Astyanax fasciatus*, sabidamente portadoras de seqüências homólogas com a sonda, e de *A. bockmanni*, as quais não possuem homologia com tal DNA satélite, como forma de controle.

Aproximadamente 50 metáfases foram analisadas para cada procedimento de FISH, e cerca de 15 metáfases de cada exemplar foram analisadas nas preparações com Giemsa, Banda-C e Ag-RONs.

As sondas foram marcadas com Uridina Biotinilada (BdUTP), através do kit de Nick Translation Bionik Labeling System, Invitrogen®. Durante o procedimento de FISH optou-se por lavagens de alta estringência, utilizando-se Formamida 20% em 0,1xSSC. Os sinais foram amplificados utilizando-se solução de FITC-avidina e anti-avidina conjugada com biotina, incubadas em tampão NFDM. As lâminas foram montadas com 25µL de Vectashield Mounting Medium antifade, Vector® with Propidium Iodide (1.5µg/mL).

O bandamento-C e a coloração pelo fluorocromo Cromomicina A₃ seguiram as metodologias de SUMNER (1972) e SCHMID (1980), respectivamente.

As preparações foram analisadas em microscópio ótico e capturadas (utilizando-se 5Mp de definição) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e com o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos levou em consideração a razão de braços (RB), classificando os cromossomos em quatro tipos: M -metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM - submetacêntrico (RB= 1,71-3,00), ST -subtelocêntrico (RB= 3,01-7,00) e A - acrocêntrico (RB= maior que 7,00), de acordo com LEVAN *et al.* (1964).

Resultados

Todos os exemplares apresentaram 50 cromossomos e fórmula cariotípica composta de 8M+18SM+12ST+12A (Figura 2.1). Foi observada a ocorrência de micro-cromossomos B do tipo acrocêntrico em alguns indivíduos (Figuras 2.2, 2.3). A frequência deste elemento foi variável, sendo de dois supranumerários em algumas metáfases do indivíduo (ocorrido em dois exemplares, em 5% das metáfases), ou um

supranumerário, em 100% das metáfases analisadas (ocorrido em dois exemplares, dos quais mais de 30 metáfases foram analisadas para fins de contagem).

A impregnação pelo nitrato de prata evidenciou duas marcações terminais nos braços curtos de dois cromossomos do tipo acrocêntrico, correspondentes ao par 24 (Figura 2.1 – detalhe). Embora o nitrato de prata tenha evidenciado Ag-NORs simples, a hibridação de sonda de rDNA 18S demonstrou que *A. mexicanus* possui oito cromossomos portadores de sítios, e sua distribuição foi preferencialmente terminal em braços longos e curtos de alguns pares cromossômicos SM, ST e A. Não foram identificadas marcações no micro-cromossomo B (Figura 2.3b).

A FISH-5S evidenciou a existência de oito sítios, sendo seis deles localizados em regiões terminais de cromossomos ST-A, e dois localizados intersticialmente em um par SM (Figura 2.3c).

O bandamento-C evidenciou pouca heterocromatina, predominantemente na região pericentromérica de alguns cromossomos: blocos conspícuos foram observados apenas nos cromossomos do par 24, portadores de constrição secundária (Figura 2.2). A Cromomicina A₃ evidenciou heterocromatinas GC-ricas restritas às regiões próximas aos centrômeros, em cromossomos A. O micro-cromossomo B não apresentou afinidade com o corante GC-específico (Figura 2.3a), e mostrou-se parcialmente heterocromático, em sua região pericentromérica (Figura 2.2 – detalhe).

Não foram observados sinais conspícuos resultantes da hibridação com a sonda do DNA satélite As-51 em *A. mexicanus*, tanto nos cromossomos do complemento quanto no cromossomo B (Figura 2.3d). Entretanto, sutis marcações parecem ter sido produzidas nas regiões terminais dos braços curtos de dois ou três pares cromossômicos. As marcações mostraram sinais difusos e pouco perceptíveis,

sobretudo nos núcleos interfásicos. As lâminas do controle positivo, *A. fasciatus*, apresentaram marcações conspícuas em vários cromossomos do complemento (Figura 2.3e), bem como nos núcleos interfásicos, ao contrário das preparações do controle negativo, *A. bockmanni*, as quais não mostram qualquer homologia com a sonda As-51 (Figura 2.3f).

Discussão

O gênero *Astyanax* tem se mostrado um modelo evolutivo bastante interessante dentre os peixes Neotropicais, sobretudo pelas pesquisas realizadas em sua espécie mais estudada, *Astyanax mexicanus*. Embora praticamente todos os aspectos explorados na pesquisa genética do grupo tenham sido realizados em populações deste tetra cego, dados sobre os seus cromossomos mostravam-se incipientes. Uma das aplicações práticas oriundas da caracterização cromossômica das espécies constitui a correta definição taxonômica, interface denominada “citotaxonomia”. Segundo BERTOLLO *et al.* (1986), as contribuições da citotaxonomia são: uma boa caracterização cromossômica das espécies; a evidência cariotípica para as suas relações evolutivas; o suporte adicional para a identificação de espécies taxonomicamente problemáticas; e a reunião de evidências sobre possíveis casos de espécies crípticas.

As informações citogenéticas disponíveis para o gênero *Astyanax* mostram a existência de “complexos de espécies”, relativos a pelo menos três grupos: *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991); *A. fasciatus* (JUSTI, 1993) e *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006b). Nestes complexos são verificados: alto grau de variabilidade, sobretudo no tocante às macroestruturas cariotípicas;

presença de cromossomos supranumerários ou Bs (os quais podem também variar em tamanho e composição); polimorfismos de blocos heterocromáticos e das regiões organizadoras nucleolares (RONS).

A variabilidade cariotípica do gênero (os números diplóides variam de 36 a 50 cromossomos) torna difíceis conclusões sobre a evolução cromossômica do grupo, sobretudo nestas espécies com alto grau de polimorfismos. Adicionalmente, são observadas espécies que apresentam a macroestrutura cariotípica mais conservada, como *A. bimaculatus*, *A. parahybae* (antes considerada subespécie de *A. fasciatus* – MELO, 2001) e *A. schubarti*. Neste sentido, o estudo das demais espécies, além de favorecer abordagens comparativas, pode identificar corretamente populações ou espécies, delimitando os caracteres biológicos exclusivos de cada subgrupo, e direcionando a análise das unidades de seleção e de outros estudos genéticos, fornecendo um panorama mais confiável da história evolutiva do gênero.

Assim como a maioria das espécies de *Astyanax*, *A. mexicanus* apresentou 50 cromossomos, sem diferenciação aparente entre machos e fêmeas, uma vez que apenas uma fórmula cariotípica, assim como padrões de bandamentos, foram observados. Além disso, o primeiro par metacêntrico, característico dos Characidae (SCHEEL, 1973; MORELLI *et al.*, 1983; PORTELA *et al.*, 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005), também se mostrou presente.

O cariótipo de *A. mexicanus* mostrou-se bastante assimétrico (Figura 2.1), sendo composto por vários cromossomos do tipo SM, uma tendência do grupo formado por algumas populações de *A. scabripinnis* (NÉO *et al.*, 2000a; 2000b; FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *A. parahybae* (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003) e por *A. fasciatus*, especificamente o citótipo padrão $2n=48$ (PAZZA *et al.*, 2006),

embora a distribuição entre os quatro tipos de cromossomos seja mais equilibrada na espécie ora estudada. A fórmula cariotípica mostrou diferenças em relação às descrições anteriores. KIRBY *et al.* (1977) observaram a presença de 40 cromossomos M-SM e 10 ST-A, porém os dados ora obtidos indicam a existência de 26 M-SM e 24 ST-A. Diferenças sutis na classificação dos tipos cromossomos podem decorrer de diferentes medições ou razões de braço utilizadas. Neste caso, as razões de braços consideradas são iguais, porém KIRBY *et al.* (1977) obtiveram suas preparações cromossômicas a partir de epitélio das brânquias, por um protocolo descrito por MCPHAIL e JONES (1966). O desenvolvimento de procedimentos que garantissem maior qualidade nas preparações seguiu-se nas décadas posteriores ao desenvolvimento desta técnica, o que nos possibilitou a obtenção de cromossomos mais distendidos, para os quais é mais fácil determinar o posicionamento do centrômero, e, portanto, a razão de braços. Ainda, segundo KIRBY *et al.* (1977), esfregaços de testículos são materiais de difícil análise, o que pode ter dificultado a determinação do número haplóide correto para os espécimes estudados por POST (1965), que indica um $n=24$.

Uma das discussões mais atuais em relação ao estudo dos cromossomos advém da presença não obrigatória de elementos supranumerários, sua evolução e influências nos organismos que os possuem. Embora sejam cromossomos encontrados em uma ampla diversidade de organismos (como plantas, crustáceos, insetos, peixes, anfíbios, répteis e mamíferos), o gênero *Astyanax* tem mostrado variações em relação ao tamanho, número e frequência destes elementos em relação ao sexo (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1997; 1998a; 1998b). Os micro-cromossomos B observados no presente trabalho representam a primeira descrição destes elementos em estudos citogenéticos da espécie.

Em relação aos cromossomos B, dois grupos podem ser identificados no gênero *Astyanax*: o primeiro deles composto por espécies que apresentam esporadicamente cromossomos Bs, como *A. eigenmanniorum* (STRIBECKE *et al.*, 1985), *A. fasciatus* e *A. schubarti* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001), e também *A. mexicanus*, e outro composto basicamente por *A. scabripinnis*, para o qual é relatada em diversas populações a ocorrência de variados tipos destes cromossomos. Embora tenha sido cogitada uma relação ancestral entre os cromossomos supranumerários observados em diversas espécies do gênero (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004), estudos mais profundos com relação à composição do DNA destes mostram-se necessários para a confirmação de tais inferências, uma vez que dados da genética molecular de *Astyanax mexicanus* indicam que populações isoladas podem desenvolver homoplasias, como a evolução do albinismo (PROTAS *et al.*, 2006), e que a convergência de caracteres não pode ser desconsiderada.

Como em outros estudos, o presente trabalho evidenciou que *A. mexicanus* exibe características comuns a organismos que constituem populações pequenas e limitadas geograficamente, as quais sofrem os processos evolutivos de maneira particular, influenciados pela alopatria. Tais evidências estão relacionadas à pequena diversidade genética das populações cavernícolas, inferida por estudos enzimáticos (AVISE e SELANDER, 1972) ou com marcadores de DNA (PANARAM e BOROWSKY, 2005), nas quais processos, como a deriva gênica, podem atuar efetivamente na flutuação das frequências gênicas.

A deriva gênica também pode ter influenciado a frequência dos microcromossomos B nos indivíduos ora estudados, uma vez que em muitos casos estes elementos têm sido considerados neutros em relação ao *fitness* dos seus portadores, e

também que as populações cavernícolas são normalmente pequenas. Adicionalmente, o fato de o elemento supranumerário ter se mostrado quase totalmente heterocromático pode indicar a ausência de relação adaptativa para seus portadores. A ausência das seqüências identificadas por meio de FISH indica, ainda, que este micro-cromossomo não está relacionado com genes ribossômicos, não apresenta heterocromatina GC-rica ou similaridade com o DNA satélite difundido no genoma de alguns *Astyanax*. Entretanto, NÉO *et al.* (2000a; 2000b) argumentam que cromossomos B em *A. scabripinnis* podem desempenhar algum papel adaptativo, uma vez que é observada a ocorrência de tais elementos apenas em populações distribuídas acima dos 1000 m de altitude na Serra da Mantiqueira (Brasil).

O padrão de bandamento C observado destoou dos encontrados em populações de *A. fasciatus*, espécie em que blocos conspícuos podem ser observados, os quais são equivalentes aos sítios de DNA satélite As-51. Assim como *A. mexicanus*, outras espécies de *Astyanax* (*A. giton* e *A. intermedius*) apresentam pouca heterocromatina, que se encontra restrita às regiões pericentroméricas e das Ag-RONs. Porém, diferenças marcantes entre suas fórmulas cariotípicas são observadas, uma vez que *A. mexicanus* possui um número bastante equilibrado de cromossomos M-SM e ST-A, e que *A. giton* e *A. intermedius* apresentam predominância de cromossomos A (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). *A. mexicanus* não apresentou marcações resolutivas por meio da FISH As-51, sugerindo, talvez, pequeno número de cópias ou homologia parcial entre as regiões terminais de alguns cromossomos e a sonda. Análises comparativas em relação à presença do DNA satélite As-51 em espécies do gênero sugerem a existência de dois grupos nas bacias sul-americanas do rio Paraná e Paraíba do Sul: um grupo com cariótipos constituídos de poucos

cromossomos A e com presença de DNA satélite As-51 e sítios GC-ricos, que seria representado por algumas populações de *A. scabripinnis*, *A. parahybae* e *A. fasciatus*, e outro grupo portador de muitos cromossomos A, no qual heterocromatinas GC-ricas e DNA satélite As-51 estão ausentes, representado por *A. giton* e *A. intermedius* (KAVALCO *et al.*, 2007). MESTRINER *et al.* (2001) sugerem que *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* possuem um padrão de distribuição do DNA As-51 considerado ancestral, uma vez que as populações por eles analisadas mostraram poucos cromossomos portadores deste DNA satélite. Neste sentido, pode-se sugerir uma diminuição gradativa deste satélite nas espécies *A. giton* e *A. intermedius*. Porém, como a seqüência deste DNA satélite mostra-se bastante semelhante a transposons identificados no genoma de *Anopheles*, pode-se inferir que o padrão ancestral teria uma distribuição bastante baixa no genoma, e que o acúmulo deste DNA satélite poderia ser uma tendência. Considerando-se a distribuição no cariótipo de *A. mexicanus* como semelhante a uma condição basal, os dois grupos derivados apresentariam tendências contrárias. Uma vez que as bacias do rio Paraná (*A. fasciatus*, *A. scabripinnis*) e do Orinoco (*A. mexicanus*) dividiram-se muito antes da formação da bacia do rio Paraíba do Sul (*A. scabripinnis*, *A. parahybae*, *A. giton* e *A. intermedius*), poderia ser hipotetizado que enquanto em *A. scabripinnis*, *A. parahybae* e *A. fasciatus* mecanismos de acúmulo e dispersão teriam disseminado os sítios de As-51 em diversos cromossomos, em *A. giton* e *A. intermedius* um processo posterior de perda deste DNA teria culminado na ausência dos sítios. Por outro lado, devido às várias diferenças observadas nos cariótipos destas duas espécies em relação às demais espécies estudadas (quantidade de cromossomos A, ausência de heterocromatina e satélite As-51, muitos sítios de rDNA 5S e ausência de sítio no

cromossomo M marcador dos *Astyanax*), a hipótese de que ambas façam parte de um subgrupo independente dentro do gênero e que tais características não constituam sinapomorfias, mas simplesiomorfias de outro ramo, deve ser considerada. A idéia de que *Astyanax* represente um grupo polifilético foi primeiramente proposta com base em caracteres morfológicos por WEITZMAN e MALABARBA (1998), e poderá ser testada através de filogenias moleculares.

Embora as relações entre estas espécies ainda permaneçam pouco resolvidas, a caracterização da heterocromatina como indicador de relacionamentos taxonômicos já foi utilizada anteriormente, e o DNA satélite mostrou ser uma ferramenta resolutiva (DEUMLING e GREILHUBER, 1982). Sendo um grupo especioso, espera-se que o aumento dos dados referentes a outras espécies de *Astyanax* possa elucidar estas questões.

A distribuição dos genes ribossômicos em *Astyanax* seguiu um padrão já observado em estudos anteriores. Dados da distribuição de sítios 5S em *Astyanax* demonstram que podem ser também observados dois grupos quanto a este caráter, e que esses grupos têm se mostrado congruentes com a divisão anterior. ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2002) identificaram um par M marcador, presente em cinco espécies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. lacustris*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* e *A. schubarti*). Tal par foi também observado em *A. mexicanus* (presente trabalho), *A. scabripinnis* (KAVALCO *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2005), *A. fasciatus* (PAZZA *et al.*, 2006) e *A. parahybae* (KAVALCO *et al.*, 2003), sendo ausente em *A. giton* e *A. intermedius* (KAVALCO *et al.*, 2003). Adicionalmente, o grande número de sítios rDNA 5S presentes nestas últimas espécies (10 a 12 sítios) pode refletir um estreito relacionamento entre elas e seu distanciamento filogenético das demais.

Regiões GC-ricas associadas com as Ag-RONs, além de serem comuns em peixes – tanto que no passado foi sugerido o emprego de fluorocromos GC-ricos para sua localização (MAYR *et al.*, 1985; AMEMIYA e GOLD, 1986) – são também características conservadas para o gênero. Entretanto, nem todo sítio CG-rico, bem como nem toda marcação com nitrato de prata nos cromossomos é seguramente um sítio portador de rDNA 45S (DOBIGNY *et al.*, 2002).

A. mexicanus, a exemplo de outras espécies do gênero, apresentou marcações GC-ricas adicionais aos sítios das Ag-RONs principais (Figura 2.3a), e oito cromossomos portadores do rDNA 18S (Figura 2.3b). Os sítios de rDNA 18S em *Astyanax* mostram-se múltiplos, podendo variar mesmo entre populações de uma espécie, ou em espécies de um complexo (MANTOVANI *et al.*, 2005). São observados nas regiões terminais nos cromossomos (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2005; PAZZA *et al.*, 2006), ou em posição intersticial (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002), e normalmente mostram-se de difícil determinação, por seus tamanhos reduzidos (PAZZA *et al.*, 2006).

Várias espécies de Characidae apresentam populações pequenas, sobretudo aquelas que representam táxons característicos de ambientes de cabeceiras de rios ou habitantes de pequenos riachos. Neste grupo, a especiação por meio de alopatria é indicada como o provável mecanismo gerador de diversidade entre grupos, assim como o que ocorre em regiões montanhosas, onde os sistemas hídricos apresentam-se limitados geograficamente por elevações (FUTUYMA, 1997). CASTRO (1999) ressalta que muito da fauna das cabeceiras dos rios ainda está por ser descrita na região Neotropical, e provavelmente será constituída de peixes de pequeno porte. Ambientes como cavernas, em que há confinamento de massas de água com pouco ou

nenhum trânsito de fauna, atuam como ambientes insulares, uma vez que a troca de genes seria limitada por fatores geográficos. De uma forma geral, podemos pensar nos peixes como um grupo cujo deslocamento é restrito em sua bacia, uma vez que para praticamente todos os grupos, percursos de terra seca representam barreiras intransponíveis (CASTRO, 1999), embora mesmo a calha dos grandes rios possa ser um divisor efetivo para a fauna das cabeceiras (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003).

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

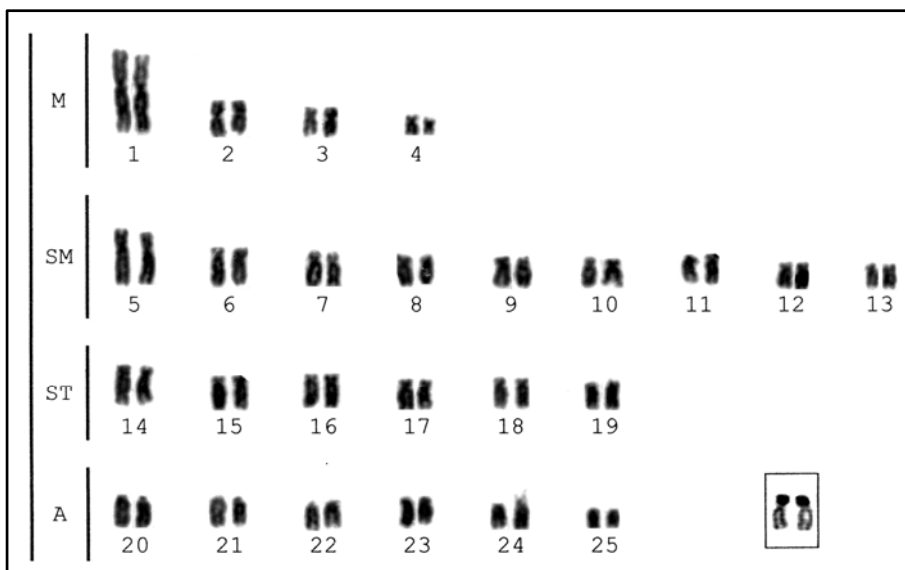


Figura 2.1 – Cariótipo de *A. mexicanus* corado em Giemsa. Em destaque, Ag-RONs.

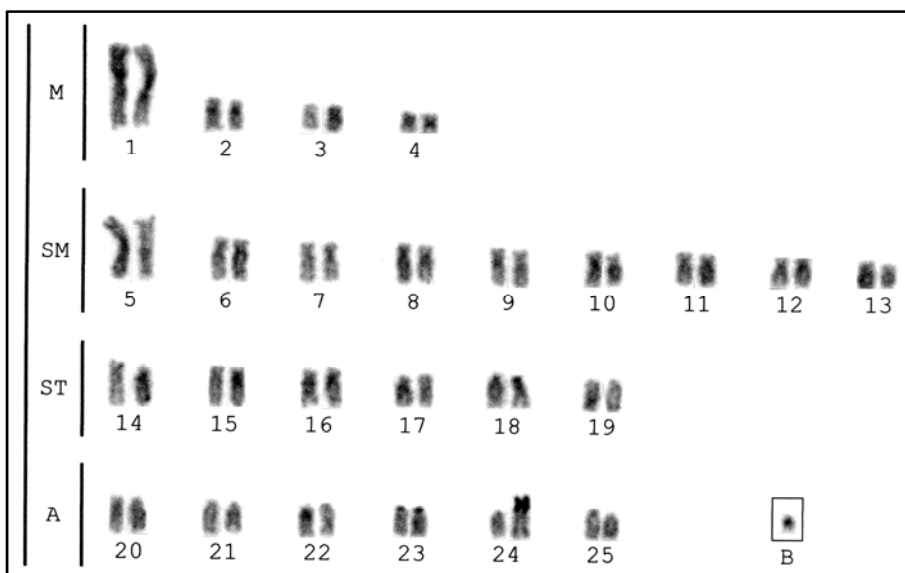


Figura 2.2 – Cariótipo de *A. mexicanus* após bandamento-C. Em destaque, o microcromossomo B.

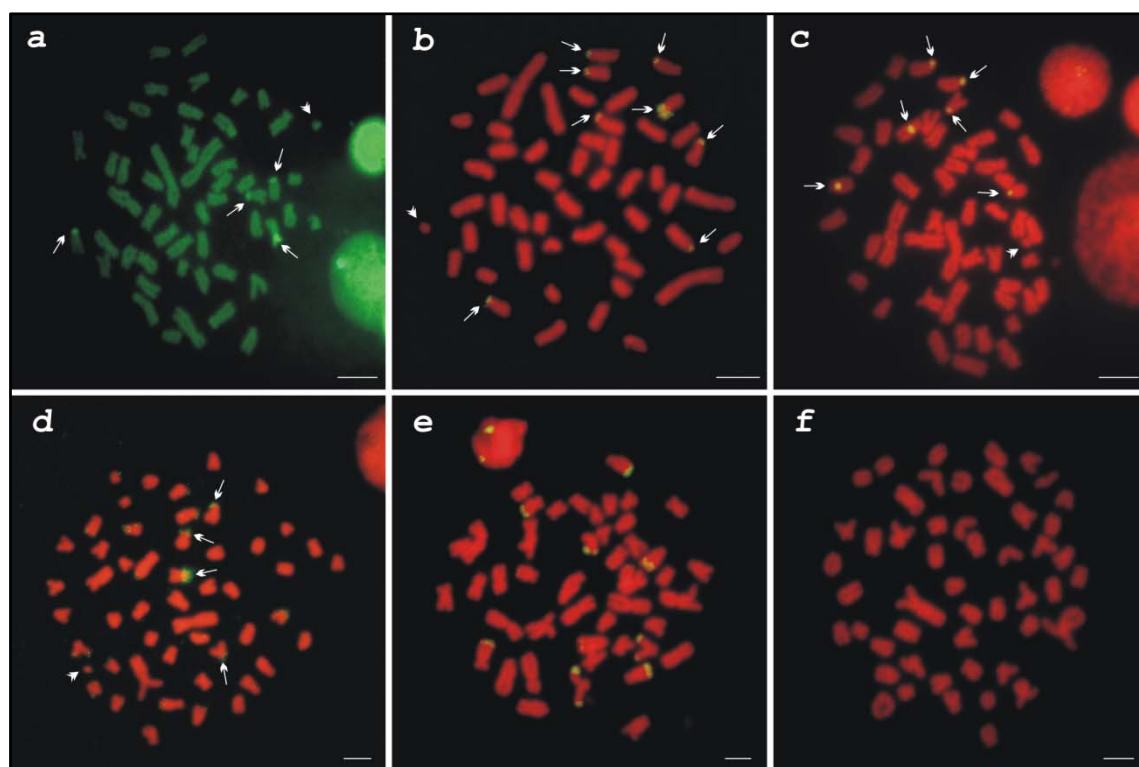


Figura 2.3 – Metáfases de *A. mexicanus* (a-d). As setas indicam os sites de Cromomicina A₃ (a) e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S (b), rDNA 5S (c) e DNA satélite As-51 (d). As cabeças de setas indicam o microcromossomo B. Metáfases de *A. fasciatus* (e) e *A. bockmanni* (f) com FISH com sonda do DNA satélite As-51 (lâminas-controle). Barra=5 μ m.



Capítulo 3

Capítulo III

Astyanax bockmanni Vari & Castro, 2007: um cariótipo ambíguo no gênero *Astyanax*.¹

Abstract

Despite of the widespread distribution of *Astyanax bockmanni* in streams along the Upper Paraná River system in central, southeastern, and southern Brazil, only recently, it has been recognized as a distinct *Astyanax* species. Cytogenetic studies were performed in two different populations and showed conservative features. The species presented $2n=50$ chromosomes, a karyotype formula composed of $10M+12SM+12ST+16A$ and multiple Ag-NOR sites. FISH (fluorescent *in situ* hybridization) with 18S rDNA probes evidenced eight sites, located on ST/A chromosomes. Four signals were observed with 5S rDNA probes, two of them located at the interstitial region on a M chromosomal pair and two at the terminal region on an A chromosomal pair. Little amounts of constitutive heterochromatin were observed, mainly distributed at the distal region on two chromosomal pairs. Additionally, some heterochromatin was located close to the centromeres. Regions showing homologies with the As-51 satellite DNA were not identified in the chromosomal complement of *A. bockmanni*. The species presented a set of features previously identified in two different groups within *Astyanax*. The chromosomal evolution in the genus *Astyanax* is discussed.

¹ KAVALCO KF, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF. *Astyanax bockmanni* Vari & Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. Genetica (aceito).

Resumo

Embora *Astyanax bockmanni* seja amplamente distribuída em rios do centro-oeste, sudeste e sul brasileiros, apenas recentemente a espécie foi descrita e diferenciada de outras espécies de *Astyanax*. Estudos citogenéticos realizados em duas populações indicaram a conservação dos caracteres analisados. A espécie apresenta $2n=50$ cromossomos, distribuídos em $10M+12SM+12ST+16A$, Ag-RONs e sítios de rDNA 18S múltiplos, localizados em cromossomos ST/A. Quatro sítios de rDNA 5S foram identificados, sendo que dois deles localizaram-se intersticialmente em um cromossomo M, e dois terminalmente em um cromossomo A. Foi observada escassa heterocromatina constitutiva, distribuída em região distal de dois pares cromossômicos. Adicionalmente, as regiões pericentroméricas dos cromossomos também foram marcadas. Não foram identificadas regiões de homologia com o DNA satélite As-51 nos cromossomos de *A. bockmanni*. A espécie apresenta uma confluência de características identificadas previamente em dois grupos distintos de *Astyanax*. Dados da evolução cromossômica do grupo e seu posicionamento taxonômico são discutidos.

Introdução

A bacia do rio Paranapanema drena o sudeste do Brasil, nas fronteiras dos Estados de São Paulo e Paraná. Suas nascentes são localizadas na Serra de Paranapiacaba, um importante divisor de águas para as bacias dos rios Paraíba do Sul, Paranapanema e Paraná. A região compreende parte da formação inicial do rio Paraná, e possui uma fauna peculiar. CASTRO e VARI (2004) admitem certo endemismo na área, devido ao isolamento pretérito propiciado por Sete Quedas, hoje submersas no lago de Itaipu.

CASTRO (1999) considera que grande parte ictiofauna de cabeceiras ainda esteja por ser descrita na região Neotropical, e que consistirá provavelmente de peixes de pequeno porte. Para o gênero *Astyanax* isso é especialmente verdadeiro. Nos últimos anos algumas espécies vêm sendo descritas, a maior parte delas provindas de pequenos rios e córregos, como *A. cremnobates* e *A. brachypterygium* (BERTACO e MALABARBA, 2001); *A. biotae* (CASTRO e VARI, 2004); *A. dnophos* (LIMA e ZUANON, 2004); *A. totae* (HALUCH e ABILHOA, 2005); *A. elachylepis* (BERTACO e LUCINDA, 2005); *A. microschemos* e *A. pelecus* (BERTACO e LUCENA, 2006), *A. henseli* (MELO e BUCKUP, 2006) e *A. bockmanni* (VARI e CASTRO, 2007).

A. bockmanni é uma espécie amplamente distribuída em riachos do sistema do alto rio Paraná, nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, tendo sido identificada previamente como *A. eigenmanniorum*. A localidade tipo de *A. bockmanni* é o rio Paranaíba, localizado ao norte da distribuição descrita e próximo a bacia do rio Tocantins (VARI e CASTRO, 2007).

O processo de descrição de espécies é importante devido à aquisição de subsídios para a compreensão da história biológica das mesmas. Ainda, a identificação das espécies geralmente ocorre com base em características ecológicas e morfológicas. Entretanto, considerando o conceito biológico de espécie, alguns táxons podem ser diferenciados apenas por características dependentes de uma abordagem mais refinada, como a propiciada pelos marcadores citogenéticos e genéticos. Além disso, alguns caracteres interessantes têm sido descritos no gênero *Astyanax*, como polimorfismos cromossômicos (PAZZA *et al.*, 2006) e cromossomos B (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004). Adicionalmente, os dados sobre diferentes espécies podem contribuir com o conhecimento sobre a evolução cariotípica do gênero, de maneira geral ainda obscura.

Este artigo apresenta dados cromossômicos sobre a espécie recentemente descrita, *A. bockmanni*, na tentativa de contribuir para a caracterização do grupo. Segue discussão considerando os aspectos citogenéticos de outras espécies de *Astyanax* provenientes de drenagens próximas.

Material e Métodos

Foram analisados espécimes de *A. bockmanni* de dois diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema, Brasil. Oito indivíduos (cinco fêmeas e três machos) são provenientes do ponto de São Miguel Arcanjo (S 23°54'44"/ Wo 47°57'40"), e sete (sendo uma fêmea e seis machos) são provenientes de Pilar do Sul (S 23°48'45" / Wo 47°42'31"). Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com GOULD *et al.* (1990), por procedimento de "air-drying". As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), analisadas por meio de coloração com nitrato de Prata (Ag-RONs) foram realizadas de acordo com KAVALCO e PAZZA (2004), usando microondas. As bandas-C seguiram o protocolo de SUMNER (1972), baseado em tratamento com HCl-Ba(OH)₂.

A localização cromossômica dos cístrons ribossômicos por hibridação fluorescente *in vitro* (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006) foi realizada usando sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI Jr., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI Jr., 1999). Adicionalmente, FISH usando a sonda do DNA satélite As-51 (MESTRINER *et al.*, 2000) foi realizada. As sondas foram marcadas com Uridina Biotinilada (BdUTP), através do kit de Nick Translation Bionik Labeling System, Invitrogen®. Durante o procedimento de FISH optou-se por lavagens de alta estringência, utilizando-se Formamida 20% em 0,1xSSC. Os sinais foram amplificados utilizando-se solução de FITC-avidina e anti-avidina conjugada com biotina, incubadas em tampão NFDM. As lâminas foram montadas com 25µL de Vectashield Mounting Medium antifade, Vector® with

Propidium Iodide (1.5µg/mL). Com intuito de evitar resultados falso-negativos ou falso-positivos, as preparações de *A. bockmanni* foram submetidas ao procedimento de FISH juntamente com lâminas de preparações de outras espécies de *Astyanax* (dados não mostrados). Os cromossomos foram classificados como metacêntrico (M), submetacêntrico (SM), subtelocêntrico (ST) e acrocêntrico (A) (LEVAN *et al.*, 1964).

Resultados

Não foram observadas diferenças entre as duas populações analisadas, nem entre exemplares de sexos distintos. Os espécimes analisados apresentaram $2n=50$ cromossomos, cariótipo composto por $10M+12SM+12ST+16A$ e número fundamental $NF=84$ (Figura 3.1). O bandamento C revelou pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, localizada subterminalmente em dois pares cromossômicos (11º e 12º pares), e nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 3.2). A coloração com nitrato de prata mostrou RONS múltiplas, variando de 1 a 4 marcações em cromossomos ST/A (Figura 3.3a). Entretanto, oito sítios de rDNA 18S foram localizados (Figura 3.3b). Os sítios de rDNA 5S encontram-se localizados na região distal do braço curto de um par de ST medianos e em posição intersticial de um par M de tamanho médio (Figura 3.3c). A FISH com a sonda do satDNA As-51 não identificou regiões de homologia no complemento cromossômico de *Astyanax bockmanni* (Figura 3.3d).

Discussão

O número cromossômico modal para *Astyanax* é 50, e a espécie ora analisada possui este número diplóide, sem diferenças entre os sexos. O cariótipo é bastante simétrico, sem grandes diferenças relacionadas ao tamanho nos tipos cromossômicos,

característica pouco comum em outras espécies de *Astyanax* provindas da bacia do rio Paranapanema (MANTOVANI *et al.*, 2004; ABEL *et al.*, 2006). Entretanto, o primeiro par metacêntrico característico dos Characidae (SCHEEL, 1973; MORELLI *et al.*, 1983; PORTELA *et al.*, 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001, 2005) está presente (Figura 3.1).

Algumas espécies de peixes parecem ser restritas a pequenos tributários e córregos, onde a diferenciação alopátrica facilmente ocorre (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), e o gênero *Astyanax* possui alguns grupos com características compartilhadas: em espécies provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul, cujas nascentes são próximas as da bacia do rio Paranapanema, dois grupos foram identificados com relação aos dados citogenéticos. *A. scabripinnis* e *A. parahybae* mostram cariótipos com maior número de cromossomos de dois braços, enquanto *A. giton* e *A. intermedius* possuem grande número de cromossomos A (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). Adicionalmente, *A. scabripinnis* e *A. parahybae* possuem um cromossomo marcador, um M mediano portador de um sítio intersticial com rDNA 5S, enquanto em *A. giton* e *A. intermedius* esta característica citogenética é ausente (KAVALCO *et al.*, 2004). Este marcador foi encontrado pela primeira vez em espécies provenientes das bacias dos rios São Francisco e Paraná, por ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2002). Estes autores identificaram o cromossomo marcador em cinco diferentes espécies, *A. altiparanae*, *A. lacustris*, *A. fasciatus*, *A. schubarti* e *A. scabripinnis*. Estudos subsequentes em algumas espécies do complexo *A. fasciatus* provindas da bacia do rio Paraná mostraram o mesmo cromossomo marcador (PAZZA *et al.*, 2006).

Os sítios de rDNA 5S têm sido associados a outras características com o fim de sustentar hipóteses sobre a diversificação cariotípica no gênero *Astyanax* (KAVALCO *et al.*, 2007). Dados sobre a grande quantidade de cromossomos acrocêntricos em *A.*

giton e *A. intermedius* (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), adicionados à ausência de regiões de homologia com o DNA satélite As-51, enquanto *A. scabripinnis* e *A. parahybae* possuem este DNA satélite, sustentam a idéia da existência de dois grupos na bacia do rio Paraíba do Sul (KAVALCO *et al.*, 2007). Ainda, o polifiletismo do gênero baseado em caracteres morfológicos foi previamente sugerido por WEITZMAN e MALABARBA (1998) e tem sido confirmado em estudos posteriores (VARI e CASTRO, 2007).

Entretanto, em *A. bockmanni* as características citogenéticas encontram-se embaralhadas. Além da presença do sítio de rDNA 5S em posição intersticial num cromossomo M (Figure 3.3c), o DNA satélite As-51 é ausente (Figura 3.3d). Além disso, *A. bockmanni* possui igual quantidade de cada tipo cromossômico (Figura 3.1) e pouca heterocromatina constitutiva (Figura 3.2). Embora sua distribuição seja distal, esta heterocromatina não tem relação com o DNA satélite As-51 (Figura 3.3d), como normalmente observado em outras espécies de *Astyanax* (MANTOVANI *et al.*, 2004; ABEL *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006).

A coloração com nitrato de prata e a FISH do rDNA 18S mostraram uma tendência anteriormente observada no gênero: muitos sítios distribuídos em cromossomos ST/A, alguns deles de difícil identificação (FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006a, 2006b; PAZZA *et al.*, 2006).

Devido a esta mistura de caracteres, qualquer inferência sobre as relações de *A. bockmanni* com as demais espécies do gênero se torna difícil. Por outro lado, uma detalhada consideração pode ser feita em relação aos dois marcadores citogenéticos em uso para o gênero *Astyanax*, o rDNA 5S e o DNA satélite As-51. A natureza dos marcadores precisa ser avaliada para realização de qualquer inferência sobre a evolução cariotípica do gênero.

O rDNA 5S é considerado um traço conservado em diferentes espécies com relação à seqüência gênica, enquanto a seqüência do NTS é mais variável. De fato, no gênero *Astyanax*, este caráter parece ser mais conservado que o DNA satélite As-51 (ABEL *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006). Por outro lado, a organização complexa, com a existência de seqüências parálogas, torna difíceis quaisquer abordagens filogenéticas com o rDNA 5S (MARTINS e GALETTI JR., 2001b). Por esta razão, estudos com a associação de abordagens genéticas e citogenéticas têm sido mais bem sucedidos (FERREIRA *et al.*, 2007).

Assume-se que a organização do gene 5S em dois clusters pode corresponder a diferentes sítios cromossômicos (MARTINS e GALETTI JR., 2001b; MARTINS *et al.*, 2002). Neste sentido, o sítio em região intersticial nos cromossomos de *Astyanax* pode ser devido à presença da menor unidade, portadora do NTS tipo II, como em *Leporinus* (Anostomidae) (MARTINS e GALETTI JR., 2001b), *Brycon* (Characidae) (WASKO *et al.*, 2001), *Oreochromis* (Perciformes) (MARTINS *et al.*, 2002) e em espécies de Curimatidae (SANTOS *et al.*, 2006). Este cístron pode estar disperso em posição subterminal nos cromossomos de *A. giton* e *A. intermedius*, pela ausência de tais sítios intersticiais nos mesmos. A caracterização da seqüência destes dois tipos de NTS precisa ser realizada para qualquer inferência segura, uma vez que outras espécies de peixes têm apresentado a ausência de sítios de rDNA 5S na região intersticial dos cromossomos M/SM, como os Siluriformes *Hypostomus affinis* e *Harttia loricariformis* (KAVALCO *et al.*, 2004).

Por sua vez, o DNA satélite As-51 possui seqüência similar a um retrotransposon descrito inicialmente para genoma de *Anopheles gambiae* (MESTRINER *et al.*, 2000). Elementos transponíveis têm um comportamento particular no genoma, e sua dispersão pode ser considerada uma tendência. Além disso, eles parecem estar

relacionados com eventos de evolução cariotípica em diversos organismos. MESTRINER *et al.* (2000) isolaram o DNA satélite As-51 de um cromossomo B de *A. scabripinnis*. Cromossomos B têm mostrado um padrão independente de evolução e parecem ser importantes na diversificação cariotípica do gênero *Astyanax* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2003).

Portanto, essa seqüência de DNA repetitivo possui um padrão mais variável que o rDNA 5S nos cromossomos de *Astyanax*, sendo que *A. giton* e *A. intermedius* possuem os fenótipos mais disruptivos, sobretudo quando os dois marcadores são associados. ABEL *et al.* (2006) mostra dados sobre a distribuição do DNA As-51 em populações de *A. scabripinnis* provenientes das bacias dos rios Paranapanema e São Francisco, em que as diferentes bacias apresentam grande diferença na quantidade de DNA satélite. Um panorama similar tem sido identificado em espécies de *A. aff. fasciatus* (KAVALCO *et al.*, 2006; PERES *et al.*, 2006), e a variação intra-específica torna o marcador uma característica complexa. Ou seja, os marcadores rDNA 5S e DNA satélite As-51 podem ser frágeis para abordagens parciais, e as abordagens comparativas, além da adição de novos marcadores, seria a melhor opção. Em conclusão, constata-se que estes marcadores cromossômicos (rDNA 5S e satDNA As-51) parecem ser não resolutivos para o entendimento das relações evolutivas entre *A. bockmanni* e outras espécies do gênero *Astyanax*.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

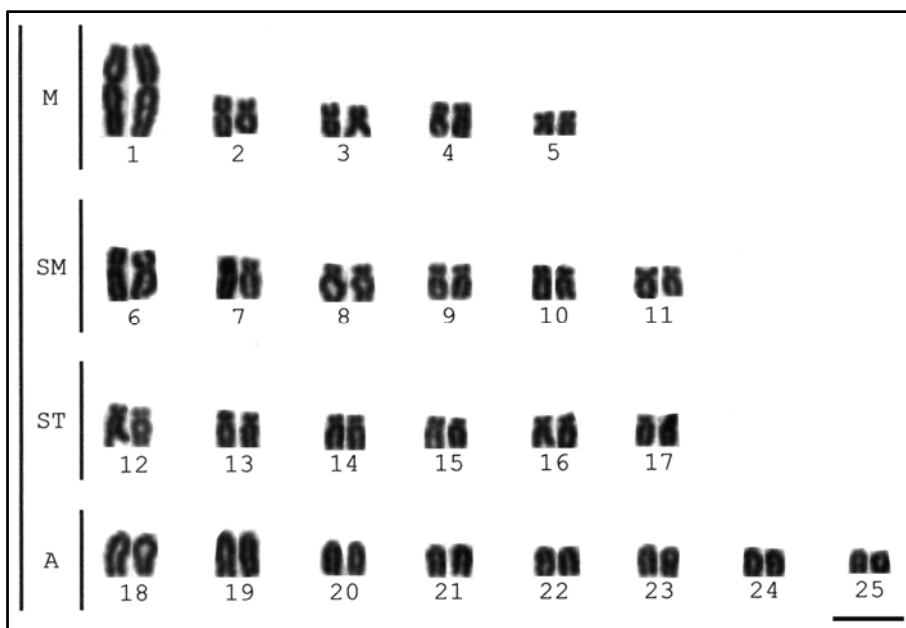


Figura 3.1 – Cariótipo de *A. bockmanni* corado em Giemsa. Barra=5μm.

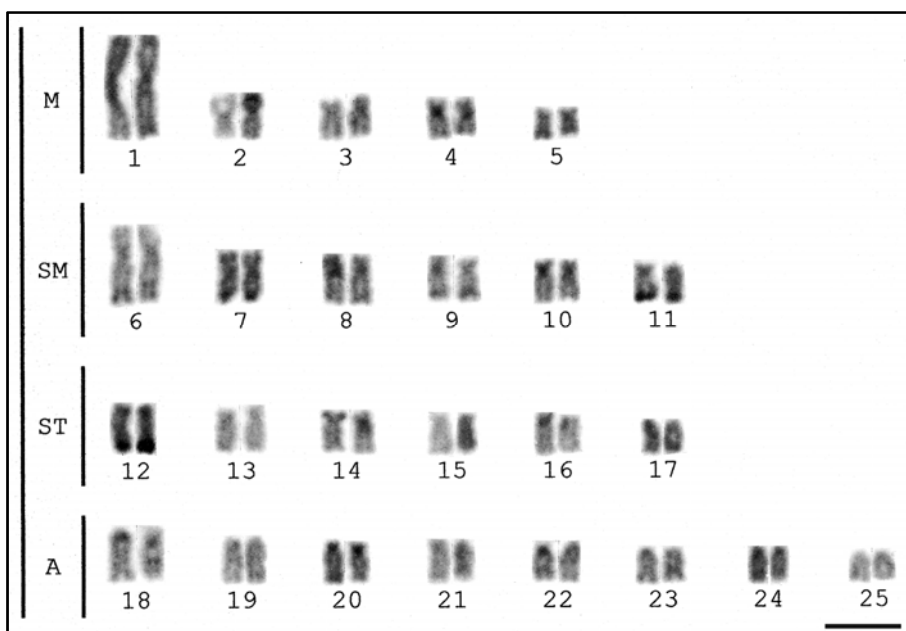


Figura 3.2 – Cariótipo de *A. bockmanni* após bandamento C. Barra=5μm.

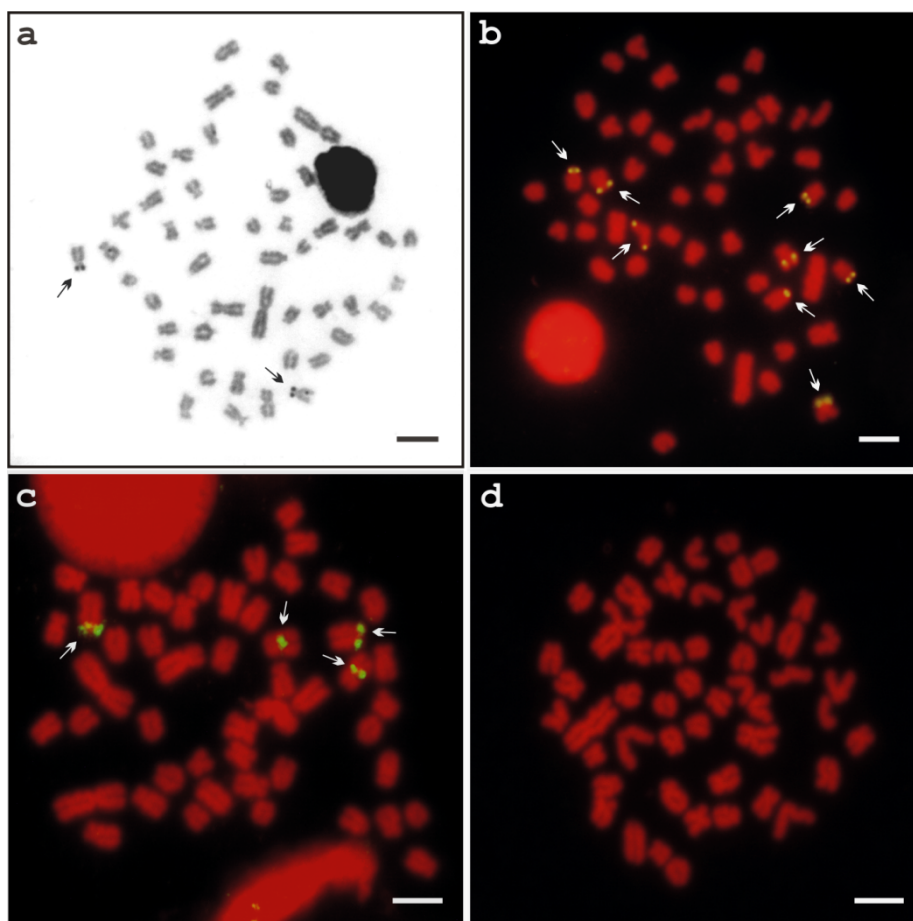


Figura 3.3 – Metáfases de *A. bockmanni*. As setas indicam os sítios de Ag-RONs (a) e FISH com sondas de rDNA 18S (b) e 5S (c). Em (d) ausência de sítios do DNA satélite As-51. Barra=5 μ m.



Capítulo 4

Capítulo IV

Astyanax hastatus Myers 1928 (Teleostei, Characidae): um novo complexo de espécies no gênero *Astyanax*?¹

Abstract

Four populations of *Astyanax hastatus* from Guapimirim river basin (Rio de Janeiro State) were analyzed and three distinct cytotypes were identified. These cytotypes present $2n=50$ chromosomes, with $4M+8SM+10ST+28A$ (Cytotype A), $8M+10SM+14ST+18A$ (Cytotype B), $6M+8SM+4ST+32A$ (Cytotype C) and little amounts of heterochromatin, mainly located over pericentromeric regions of several chromosomal pairs. No homologies with the As-51 satellite DNA were observed in the three cytotypes, but all of them presented multiple 18S rDNA sites, as detected by both silver nitrate staining and FISH (fluorescent *in situ* hybridization). The application of the term “species complex” in *Astyanax* is discussed under a cytotaxonomic viewpoint.

Resumo

Foram analisadas quatro populações de *Astyanax hastatus* provenientes da bacia do rio Guapimirim (Estado do Rio de Janeiro), tendo sido observados três diferentes citótipos. Esses citótipos apresentaram $2n=50$ cromossomos, $4M+8SM+10ST+28A$ (Citótipo A), $8M+10SM+14ST+18A$ (Citótipo B), $6M+8SM+4ST+32A$ (Citótipo C) e escassa presença de heterocromatina constitutiva distribuída preferencialmente nas regiões pericentroméricas de vários cromossomos. Não foi identificada, em nenhum

¹ KAVALCO KF, BRANDÃO KO, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF. *Astyanax hastatus* Myers 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within *Astyanax* genus? Genetics and Molecular Biology. (submetido).

dos três citótipos, homologia com o DNA satélite As-51. Todos os citótipos apresentaram múltiplos sítios de rDNA 18S, identificados pela impregnação por nitrato de prata e por FISH (hibridação fluorescente *in situ*). Discute-se a aplicação da denominação “complexo de espécies” e seu uso no gênero *Astyanax*, à luz da citotaxonomia.

Introdução

Os lambaris são peixes de pequeno porte, pertencentes ao gênero *Astyanax*. Distribuem-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (EIGENMANN, 1921). Esse gênero Neotropical compreende aproximadamente 90 espécies válidas, muitas delas habitantes de pequenos corpos d'água. Dentre as espécies desse gênero, analisamos no presente capítulo *Astyanax hastatus*, uma espécie não descrita do ponto de vista citogenético, cuja ocorrência é registrada na Bacia dos Rios Costeiros, Rio de Janeiro (LIMA *et al.*, 2003).

Os dados disponíveis na literatura indicam que o número cromossômico modal para o gênero *Astyanax* é $2n=50$ cromossomos, sendo registrada, entretanto, uma ampla variação com relação à composição cromossômica. É provável que rearranjos não-Robertsonianos como inversões pericêntricas tenham desempenhado um papel fundamental na diversidade cromossômica desse gênero (PAZZA e KAVALCO, 2007).

Três “complexos de espécies” foram descritos no gênero *Astyanax*, com base em características cromossômicas (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004; PAZZA *et al.*, 2006). A designação “complexo de espécies” refere-se a situações em que duas ou mais espécies biológicas provavelmente ocorrem, porém com limites entre as espécies componentes praticamente

impossíveis de determinação (NELSON, 1999). Nesses grupos de *Astyanax* mencionados, entretanto, embora não sejam identificadas diferenças morfológicas, diferenças no número cromossômico, fórmula cariotípica e/ou outras características macroestruturais são facilmente identificadas nos diferentes citótipos.

MOREIRA-FILHO e BERTOLLO (1991) descreveram a diversidade cariotípica de populações de "*A. scabripinnis*", incluindo variação nos números diplóides ($2n=46$, 48 ou 50 cromossomos) e no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. A partir desses dados, os autores concluíram que as diferentes fórmulas cariotípicas correspondiam a entidades únicas num contexto evolutivo, uma vez que o processo que originou cada um dos citótipos observados provavelmente tenha sido a especiação alopátrica.

O grupo "*A. fasciatus*" possui a maior diversidade cariotípica já registrada entre os *Astyanax*. Apesar da ocorrência de duas formas "padrão", nas quais, aparentemente, todos os cromossomos possuem homólogos (com $2n=46$ e $2n=48$), ocorrem ainda citótipos variantes, nos quais nem sempre é observada homologia total entre os cromossomos do complemento, isto é, são identificados números ímpares de cromossomos, ocorrendo $2n=45$, $2n=46$ e vários tipos com $2n=47$, em exemplares coexistindo em simpatria e sintopia (PAZZA *et al.*, 2006). Algum fluxo gênico ocorre entre esses diferentes citótipos, porém sem híbridos óbvios, indicando a divergência incipiente do grupo (PAZZA *et al.*, 2007).

Os "complexos de espécies" são caracterizados por grande variação, principalmente pela presença de números cromossômicos diferentes. Entretanto, a diferença entre os cariótipos pode também estar restrita às fórmulas cariotípicas, ou seja, os cariogramas apresentam tipos diferentes de cromossomos, indicando,

possivelmente a ocorrência de rearranjos sem modificação do conteúdo gênico. “*A. altiparanae*”, por exemplo, corresponde a outro grupo bastante variável, no qual os NF (número fundamental) dos citótipos variam de 76 a 100, mantendo, entretanto o número diplóide ($2n=50$) (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004).

No presente capítulo são apresentados dados sobre populações de uma espécie cujo cariótipo não foi ainda descrito, *Astyanax hastatus*. Os espécimes analisados foram coletados em quatro diferentes localidades da bacia do rio Guapimirim (Rio de Janeiro). Foram efetuados estudos cromossômicos usando técnicas clássicas e moleculares, com o intuito de contribuir para o conhecimento da evolução cromossômica desse especioso gênero. É discutida a aplicação do conceito “complexo de espécies,” para o conjunto formado pelos diferentes citótipos de *A. hastatus*, bem como para as outras espécies do gênero que apresentam variantes citogenéticas fortemente relacionados.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares de *A. hastatus* provenientes de quatro diferentes pontos geográficos (descritos adiante) ao longo da bacia do rio Guapimirim, na bacia dos rios Costeiros, região da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os exemplares analisados apresentavam até 10 cm de comprimento padrão, sendo mais comuns os indivíduos com tamanho menor do que 3 cm. Todos os exemplares foram identificados e estão depositados na coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS, Brasil.

Vinte e dois exemplares do ponto 1 – distrito de Ypiranga (S 22°38’11,6”/Wo 42°42’42,3”); 10 do ponto 2 – Município de Santana do Japuíba (S 22°33’39,9”/Wo

42°40'51,1"); 27 do ponto 3 – rio Macacu (S 22°29'06,1"/Wo 42°39'40,3"); e 14 do ponto 4 – rio Macacu, no Município de Cachoeiras de Macacu (S 22°27'51,2"/Wo 42°39'16,5") foram analisados.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos conforme GOLD *et al.* (1990). A coloração por nitrato de prata (Ag-RON) foi efetuada conforme KAVALCO e PAZZA (2004). O bandamento C seguiu a metodologia descrita por SUMNER (1972). A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006) foi realizada utilizando-se sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI JR., 2004) e de um DNA satélite (As-51) isolado de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000).

As preparações cromossômicas foram analisadas com microscópio ótico e capturadas (com 5Mp de resolução) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos levou em consideração a razão de braços, podendo ser: M-metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM-submetacêntrico (RB=1,71-3,00), ST-subtelocêntrico (RB=3,01-7,00) e A-acrocêntrico (RB maior que 7,00), de acordo com LEVAN *et al.* (1964).

Resultados

Todas as populações apresentaram Ag-RONs e sítios de rDNA 18S nos braços curtos de cromossomos ST-A e pouca heterocromatina constitutiva, distribuída preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos. Embora com o mesmo número cromossômico, diferentes fórmulas cariotípicas foram observadas, tendo sido identificados três diferentes citótipos.

Os exemplares provenientes do ponto 1 apresentaram $2n=50$ cromossomos, fórmula cariotípica composta por $4M+8SM+10ST+28A$ cromossomos e $NF = 72$ (citótipo A) (Figura 4.1a). Esse citótipo apresentou duas Ag-RONs (Figura 4.1a – detalhe), enquanto a FISH-18S identificou seis marcações em posição terminal de cromossomos A (Figura 4.2d). O bandamento-C identificou pouca heterocromatina constitutiva, localizada principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 4.2a). A hibridação com a sonda do DNA satélite As-51 não revelou regiões de homologia (Figura 4.4g).

Os exemplares do ponto 2 apresentaram $2n=50$ cromossomos, distribuídos em $8M+10SM+14ST+18A$, com $NF = 82$ (citótipo B) (Figura 4.1b). Três sítios portadores de Ag-RONs foram identificados (Figura 4.1b – detalhe), enquanto a FISH-18S marcou quatro sítios no braço curto de cromossomos A, além de um par A com marcação bitelomérica (Figura 4.2e). O bandamento C identificou pouca heterocromatina constitutiva, que se mostrou restrita às regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 4.2b); não foi identificada homologia com o DNA satélite A-51 nesse citótipo (Figura 4.2h).

Por sua vez, os exemplares dos pontos 3 e 4 apresentaram o mesmo citótipo, com $2n=50$ cromossomos organizados em $6M+8SM+4ST+32A$, e com $NF = 68$ (Citótipo C) (Figura 4.1c). Foram observadas de uma a oito marcações pelo nitrato de prata, sendo mais freqüentes de um a quatro sítios (Figura 4.1c - detalhe). A FISH-18S identificou quatro regiões de DNA ribossômico localizadas terminalmente em cromossomos A e mais um par SM com marcação distal no braço curto (Figura 4.2f). Foi observada escassa heterocromatina constitutiva, distribuída preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 4.2c). Assim como nos

demais citótipos, o DNA satélite As-51 não foi localizado nos cromossomos do citótipo D (Figura 4.2i).

Discussão

O gênero *Astyanax* possui uma marcante diversidade cariotípica (PAZZA e KAVALCO, 2007) e, segundo LANGECKER *et al.* (1995) e JEFFERY (2001), o grupo tem se mostrado um excelente modelo para estudos gerais sobre mecanismos evolutivos. Com relação à ictiofauna neotropical, pode-se dizer que se trata de um dos grupos mais bem documentados do ponto de vista citogenético, havendo mais de 60 artigos publicados com dados de diferentes espécies, embora os grupos *A. scabripinnis*, *A. altiparanae* (referenciado em alguns como *A. bimaculatus*) e *A. fasciatus* sejam, de longe, os que apresentam maior número de populações estudadas. Para revisão ver PAZZA e KAVALCO (2007).

A grande diversidade que ocorre nesse grupo é também compartilhada com outros grupos de peixes neotropicais que se caracterizam por ampla distribuição, como o gimnotídeo *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1984, 1985, 1988, 1996; entre outros) e os eritrínídeos *Hoplias* (BERTOLLO *et al.*, 1979; BERTOLLO *et al.*, 2000; PAZZA e JULIO JR., 2003; entre outros) e *Erythrinus* (BERTOLLO *et al.*, 2004). Embora esses grupos compartilhem ampla distribuição e freqüentemente formem populações isoladas, onde a especiação alopátrica facilmente ocorre (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), entre a fauna Neotropical há exemplos de peixes com tais características que não possuem variações cromossômicas, como o calictídeo *Hoplosternum littorale*, talvez por tratar-se de uma espécie facilmente introduzida em novos ambientes (PAZZA *et al.*, 2005).

A diversidade cariotípica do gênero *Astyanax* pode estar relacionada com número diplóide e macroestrutura cromossômica, presença ou ausência de cromossomos B, polimorfismos de bandas heterocromáticas e localização dos genes ribossômicos. Devido a tal variação, que muitas vezes é inter e intrapopulacional, a ocorrência de “complexos de espécie” tem sido sugerida para pelo menos três grupos no gênero (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; JUSTI, 1993; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004).

Em contraste com a grande variação presente nos números diplóides nos grupos *A. scabripinnis* e *A. fasciatus*, os citótipos descritos para o grupo *A. altiparanae* apresentam o número diplóide conservado de 50 cromossomos (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). O grupo *A. hastatus* compartilha algumas características com o complexo de espécies *A. altiparanae*, como fórmulas cariotípicas e NF diferentes em citótipos com $2n=50$ cromossomos (Figura 4.1), além da variação na quantidade e posição dos genes ribossômicos. Este tipo de variação parece indicar que processos evolutivos agindo nos cromossomos, como inversões pericêntricas e paracêntricas, podem ter desempenhado um papel importante na diferenciação das populações de *A. hastatus*.

É possível que o cariótipo ancestral para o gênero *Astyanax* seja composto por $2n=50$ cromossomos (6M, 22SM, 10ST e 12A), por ser a forma encontrada na base do dendrograma de Neighbour-Joining dos cariótipos das diferentes espécies/populações do gênero (PAZZA e KAVALCO, 2007).

Algumas espécies do gênero *Astyanax* apresentam ainda números diplóides diferentes de 50 cromossomos, como *A. schubarti*, que possui $2n=36$ (DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2005), e *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* que possuem populações com

2n=46 e 2n=48 cromossomos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; JUSTI, 1993; PAZZA *et al.*, 2006), mas a grande maioria das espécies estudadas apresenta 2n=50 cromossomos (PAZZA e KAVALCO, 2007). Todas essas espécies, entretanto, independente de seu número diplóide, apresentam o primeiro par metacêntrico característico dos Characidae (SCHEEL, 1973; MORELLI *et al.*, 1983; PORTELA *et al.*, 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005; PAZZA *et al.*, 2006; KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007).

Outra simplesiomorfia do gênero é a presença de múltiplos cístrons ribossômicos de rDNA 18S. Os sítios de rDNA 18S em *Astyanax* mostram-se dispersos, podendo variar mesmo entre populações de uma espécie, ou em espécies de um grupo (MANTOVANI *et al.*, 2005), como em *A. hastatus* (Figura 4.2d, e, f). São usualmente observados nas regiões terminais nos cromossomos (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2005; PAZZA *et al.*, 2006), ou em posição intersticial (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002), e normalmente mostram-se de difícil determinação, por seus tamanhos reduzidos (FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO e MOREIRA FILHO, 2003; PAZZA *et al.*, 2006). Os sítios de rDNA 18S em *A. hastatus* também são diminutos e localizados na região terminal dos cromossomos (Figura 4.3d, e, f).

Embora compartilhe essas características com a maioria das espécies já descritas do ponto de vista citogenético, a FISH-18S evidenciou marcação em ambos os telômeros em um par A do citótipo B (Figura 4.2e). Tal caráter foi previamente observado nos gêneros *Hoplias* (BORN e BERTOLLO, 2000) e *Oligosarcus* (HATTORI *et al.*, 2007), e em *A. scabripinnis* (MALACRIDA *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2005) e *A. paranae* (VICARI *et al.*, 2008), esta última considerada anteriormente subespécie de *A.*

scabripinnis. Tendo em vista o grande número de populações já estudadas no gênero *Astyanax*, as RONS biteloméricas não parecem ser uma característica generalizada e, no caso do grupo *A. hastatus*, são observadas em apenas um dos três citótipos.

O satélite As-51 é uma seqüência de DNA repetitivo que foi descrita inicialmente em *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000) e tem sido identificada em outras espécies de *Astyanax*, constituindo-se num interessante marcador para o gênero. A ausência de homologia com a seqüência do DNA satélite As-51 observada no grupo *A. hastatus* (Figura 4.2g, h, i) é compartilhada por outras espécies de distribuição costeira, como *A. giton*, *A. intermedius* (KAVALCO *et al.*, 2007) e *A. ribeirae* (capítulo V, neste volume). O satDNA As-51 também está ausente em *A. bockmanni* (capítulo III, neste volume), de distribuição na bacia do alto rio Paraná, e em uma população de *A. scabripinnis* do rio São Francisco (ABEL *et al.*, 2006). Com relação às espécies que ocorrem na drenagem costeira, além da ausência de homologia com a seqüência As-51, observa-se a presença de vários cromossomos acrocêntricos, sobretudo nos cariótipos de *A. giton* e *A. intermedius* (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), sendo que este último possui um cariótipo idêntico ao do citótipo C de *A. hastatus* (Figura 4.1c). Análises genéticas mais refinadas poderão indicar se essa similaridade é resultado de convergência ou ancestralidade. É interessante observar que as espécies de distribuição marginal no sudeste brasileiro apresentem cariótipos com maior quantidade de cromossomos A do que as espécies que ocorrem na drenagem interiorana (Alto Paraná, principalmente). Talvez seja um reflexo do processo de vicariância ao qual peixes de pequeno porte estão especialmente sujeitos (CASTRO, 1999). As populações da costa poderiam ter sido fragmentadas a partir de um estoque único ou poucos estoques e a posterior falta de fluxo gênico entre as sub-

populações formadas poderia fazer com que essas se diferenciasssem, culminando com a especiação. Talvez isso explique o porquê de várias espécies de *Astyanax* que ocorrem na costa apresentarem muitos cromossomos A, enquanto os *Astyanax* de outras drenagens, como por exemplo, *A. altiparanae*, possuem cariótipos compostos por mais cromossomos SM.

A expressão “Complexo de espécies” refere-se a situações em que duas ou mais espécies biológicas provavelmente ocorrem, porém os limites entre as espécies componentes são praticamente impossíveis de determinar em face a sua variação (NELSON, 1999). Embora seja difícil fazer a caracterização das espécies com base em seu conjunto gênico, em se tratando de análises citogenéticas é mais provável que a variação já observada em peixes neotropicais seja reflexo da ocorrência de espécies crípticas e não de complexos de espécies, pois diferenças expressivas em cromossomos quase sempre implicam em impossibilidade de cruzamentos viáveis.

É difícil questionar o fato de que mecanismos evolutivos possam atuar de forma independente em cada citótipo/espécie, por seus ambientes particulares (ou seja, pressões seletivas diferenciadas) e pelas características genômicas intrínsecas de cada citótipo (como suas fórmulas cariotípicas, quantidade de heterocromatina, localização de genes), embora seja complicado correlacionar evolução orgânica e evolução cariotípica. Essa descontinuidade entre os diferentes níveis de evolução pode ser a responsável pela existência de espécies crípticas em peixes, como ocorre em *Hoplias* (BERTOLLO *et al.*, 1979; DERGAN e BERTOLLO, 1990; PAZZA e JULIO JR., 2003) e *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1984, 1985, 1988), e certamente no gênero *Astyanax*, inclusive para o grupo *A. hastatus*. Portanto, os diferentes citótipos aqui descritos devem corresponder a unidades de seleção, sendo representativos de

entidades específicas e constituindo um grupo de espécies crípticas e não um complexo de espécies, uma vez que é possível identificar diferenças em cada citótipo e limites biológicos entre os exemplares, pela ausência de hibridismo detectado pelos marcadores citogenéticos empregados. Tal análise pode também ser realizada para os outros grupos que possuem populações com diferentes citótipos no gênero *Astyanax*, como é o caso de *A. scabripinnis*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae*. Embora a definição de complexo de espécies possa sofrer modificações (NELSON, 1999), a designação de “espécies crípticas” poderia ser adotada nesses casos bem discriminados pelos estudos citogenéticos.

Apesar das expressivas diferenças nos cromossomos e das tentativas de análises morfométricas por variáveis canônicas, os estudos morfológicos não têm discriminado facilmente os subgrupos nessas espécies crípticas (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MIZOGUSHI e MARTINS-SANTOS, 1998b; MAISTRO *et al.*, 1998; ARTONI *et al.*, 2006; MEDRADO *et al.*, 2008; PAZZA *et al.*, 2008b). Uma das explicações que podem ser postuladas seria a de que nesses grupos ou as alterações cromossômicas estão precedendo a diferenciação morfológica ou as espécies possuem plasticidade fenotípica. Outra explicação seria a de que a análise normalmente utilizada não tenha identificado as diferenças existentes. TAYLOR (1999) comenta que com o desenvolvimento de análises morfológicas mais sofisticadas (por exemplo, análise multivariada), a maioria das espécies-irmãs ou crípticas tem demonstrado exibir ao menos alguma diferenciação morfológica.

Embora os citótipos de *A. hastatus* ainda não possam ser facilmente considerados espécies, se aplicado o conceito Darwiniano, ou sua versão revisitada (MALLET, 1995), em que a espécie é reconhecida como um cluster morfológico e

genotípico, esses citótipos devem corresponder a espécies de acordo com o conceito biológico de espécie (MAYR, 1969), uma vez que foram observados diferentes números diplóides ao longo da mesma sub-bacia hidrográfica, sem indícios cromossômicos de hibridismo.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

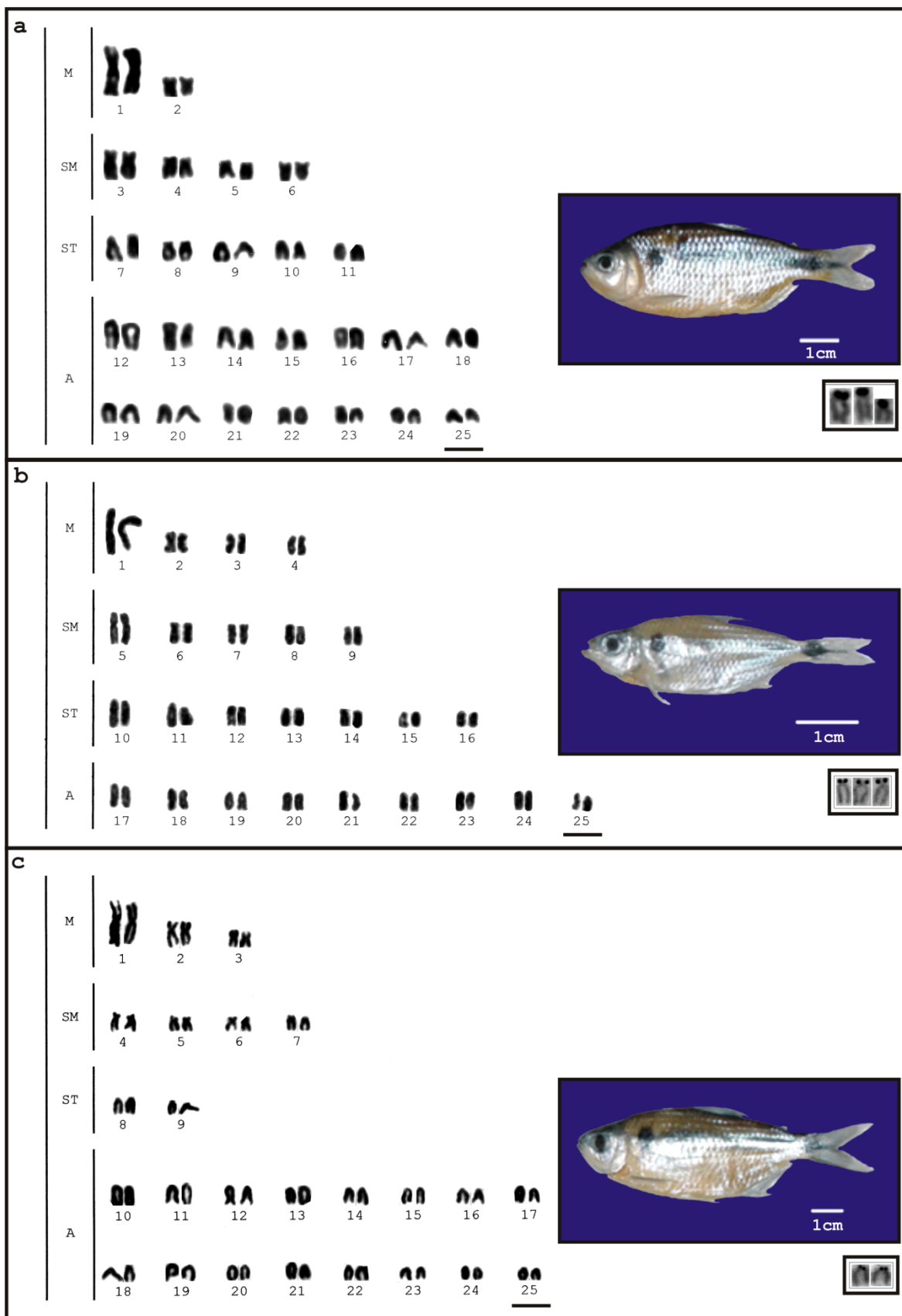


Figura 4.1 – Exemplares e cariótipos corados em Giemsa dos citótipos A (a), B (b) e C (c) de *A. hastatus*. Nos detalhes, Ag-RONs. Barra dos kariogramas = 5µm.

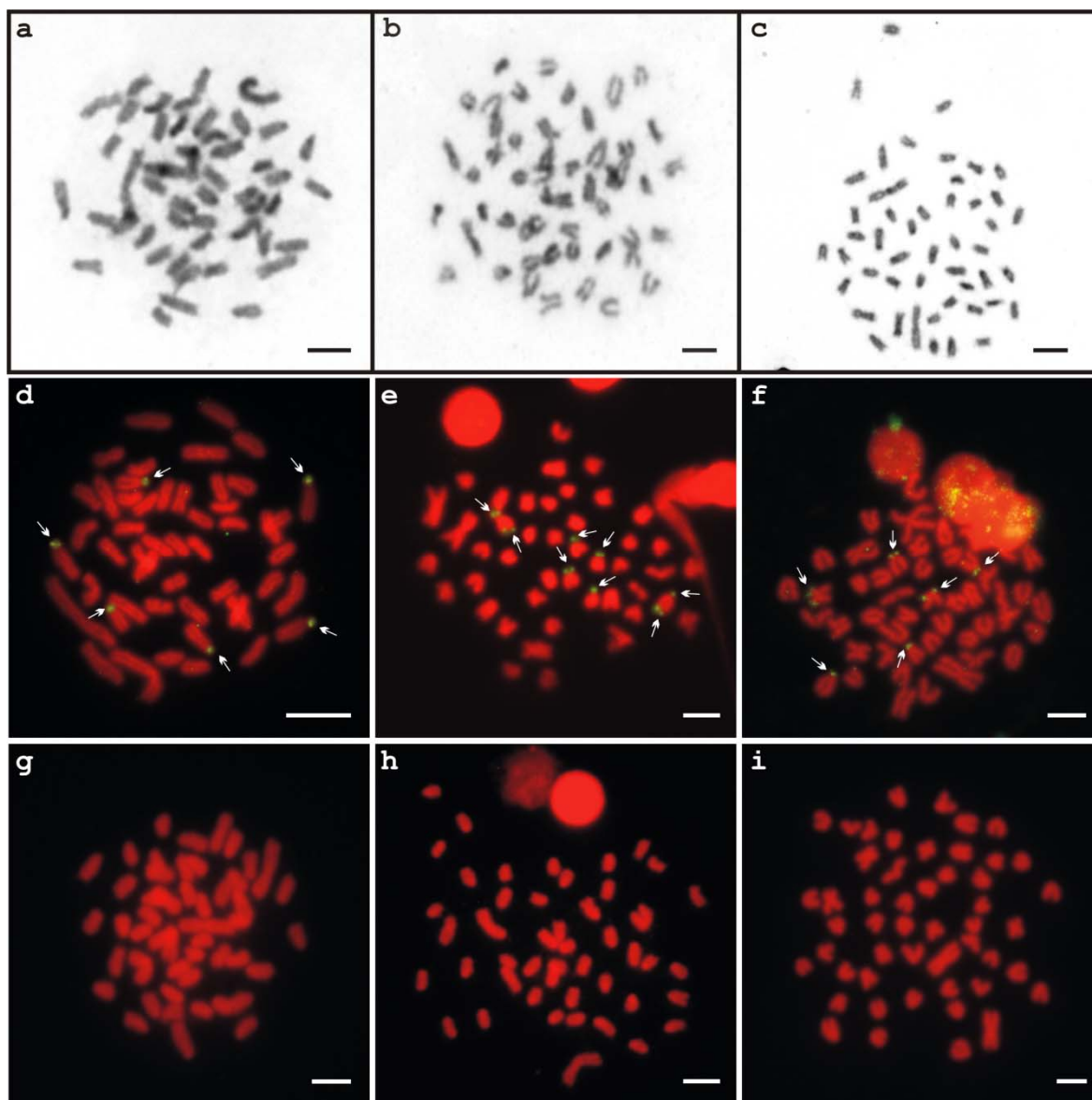


Figura 4.2 – Metáfases de *Astyanax hastatus*. Citótipos A, B e C após bandamento-C (a-c) e FISH com sondas de rDNA 18S (d-f) e DNA satélite As-51 (g-i). As setas indicam os sítios de rDNA. Barras = 5 μm.



Capítulo 5

Capítulo V

Citogenética molecular de *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), um lambari endêmico da mata Atlântica¹

Abstract

Astyanax ribeirae is an endemic characin fish of Ribeira de Iguape river basin, completely unknown under a cytogenetic viewpoint so far. In the present work, specimens from three distinct geographic sites were analyzed and all presented the same karyotypic structure, composed of $2n=50$ chromosomes, comprising $4M+10SM+6ST+30A$ and a fundamental number (FN) equal to 70. Silver nitrate staining revealed single NORs on ST/A chromosomes. C-banding indicated the presence of few heterochromatin blocks at pericentromeric region of some chromosomes. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) allowed identifying four 18S rDNA sites and six 5S rDNA sites, all located on ST/A chromosomes. FISH with As-51 satellite DNA probe presented no homology signals in chromosomes of *A. ribeirae*, indicating that this would be a unique species within the genus *Astyanax*. Conservation actions are required in order to preserve the few remaining Atlantic rainforest areas in Brazil, the exclusive habitat of such characin species. Data about the karyotypic evolution within *Astyanax* are discussed.

Resumo

Astyanax ribeirae é um lambari endêmico da bacia do rio Ribeira de Iguape, ainda desconhecido do ponto de vista citogenético. No presente trabalho, exemplares

¹ KAVALCO KF, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin from Atlantic rainforest. Ichthyological Research (submetido).

provenientes de três diferentes pontos geográficos foram analisados e todos apresentaram uma mesma constituição cariotípica, consistindo em $2n=50$ cromossomos, sendo $4M+10SM+6ST+30A$ e número fundamental $NF=70$. A impregnação por nitrato de prata identificou a ocorrência de RONS simples em cromossomos ST/A. O bandamento C revelou a presença de pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, estando esta localizada nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos. A hibridação fluorescente in situ – FISH, permitiu a identificação de quatro sítios de rDNA 18S e de seis sítios de rDNA 5S, todos localizados em cromossomos ST/A. A sonda do DNA satélite As-51 não mostrou homologia com os cromossomos de *A. ribeirae*, indicando que essa espécie parece ser uma espécie única no gênero. Ações conservacionistas são necessárias para que se preservem os poucos remanescentes de mata Atlântica do Brasil, único habitat deste lambari. Dados sobre a evolução cariotípica do gênero *Astyanax* são discutidos.

Introdução

Segundo CASTRO e MENEZES (1996), as porções superiores da bacia do rio Ribeira do Iguape, ainda contidas em manchas relativamente intactas de floresta costeira Atlântica, apresentam uma rica e pouco estudada fauna de peixes de pequeno porte, associada a riachos correntosos de floresta. Assume-se a existência de 12 famílias e 54 espécies de peixes na bacia do rio Ribeira de Iguape (CASTRO e MENEZES, 1996). Entretanto, estes autores consideram que o número de espécies descritas seja subestimado. Com efeito, ictiólogos estimam que o número total de espécies na região seja em torno de 150. Tal estimativa certamente relaciona-se ao fato de que córregos com mata ciliar mais bem preservada mantêm maior riqueza de espécies de peixes,

em comparação com áreas com cobertura vegetal mais degradada (PINTO *et al.*, 2006b; BURCHER *et al.*, 2008).

Os ecossistemas aquáticos da mata Atlântica brasileira possuem fauna de peixes rica e variada, que está sob ameaça da pressão antrópica causada pela concentração populacional na região. O resultado líquido dessa concentração pode ser evidenciado, por exemplo, pelo fato de a mata Atlântica estar reduzida a 8% de sua cobertura original e figurar entre os 25 “*hotspots*” mundiais, que compreendem as regiões mais ricas e ameaçadas do planeta (MMA, 2000).

A história natural da ictiofauna das drenagens da costa brasileira, região que abriga remanescentes de mata Atlântica, está relacionada com a geomorfologia da região que, segundo ALMEIDA e CARNEIRO (1998), é caracterizada pela presença da Serra do Mar. Na região do vale do rio Ribeira de Iguape, a Serra do Mar, que divide as águas que drenam a bacia do Prata das que drenam a bacia dos rios Costeiros, é interrompida. Neste trecho, a posição de borda limite do planalto, desempenhada até aí pela Serra do Mar, passou a ser desempenhada pela Serra de Paranapiacaba, localizada bem mais para o interior da região (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998).

Regiões montanhosas como essas impõem aos organismos pressões seletivas particulares, devidas principalmente a sua topografia, gerando formas únicas e, muitas vezes, endêmicas de uma pequena área. Entre os peixes de pequeno porte habitantes destes cursos d’água identifica-se a presença dos representantes do gênero *Astyanax*, cuja distribuição vai desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (EIGENMANN, 1921).

Dentre as espécies que ocorrem nesta área, está *Astyanax ribeirae*, que é endêmica da bacia do rio Ribeira de Iguape (OYAKAWA *et al.*, 2006). Embora o gênero

Astyanax seja um dos mais bem estudados da ictiofauna neotropical, esta espécie é desconhecida do ponto de vista citogenético. Levando-se em conta que cerca de 60 artigos já foram publicados sobre dados citogenéticos no gênero *Astyanax*, é possível, a partir das características previamente observadas em outras espécies desse gênero, inserir *A. ribeirae* num contexto evolutivo.

No presente trabalho são discutidos dados obtidos pela aplicação da citogenética molecular em preparações cromossômicas de espécimes de *A. ribeirae* coletados em remanescentes de mata Atlântica, e a relação dessa espécie com as demais espécies do gênero *Astyanax*.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares de *A. ribeirae* provenientes de três diferentes pontos ao longo da bacia do rio Ribeira de Iguape, São Paulo, Brasil. Dezenove indivíduos foram coletados na comunidade de Poço Grande, no município de Iporanga – SP (S 24°32'29" / Wo 48°30'09"), quatro exemplares em um córrego próximo ao município de Registro – SP (S 24°36'01" / Wo 47°52'32") e um exemplar em um açude próximo a Sete Barras – SP (S 24°18'40" / Wo 47°53'31"). Os exemplares foram identificados e estão depositados na coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS, Brasil.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos conforme GOLD *et al.* (1990). A coloração por nitrato de prata (Ag-RON) foi realizada conforme KAVALCO e PAZZA (2004), utilizando microondas. O bandamento C seguiu a metodologia descrita por SUMNER (1972). A localização direta dos cístrons ribossômicos foi feita através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006), com

sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI JR., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI JR., 1999). Adicionalmente, foi aplicada a FISH, usando como sonda um DNA satélite (As-51) isolado a partir de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000).

As preparações cromossômicas foram analisadas com microscópio ótico e capturadas (com 5Mp de resolução) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos foi realizada de acordo com LEVAN *et al.* (1964) e levou em consideração a razão de braços: M-metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM-submetacêntrico (RB=1,71-3,00), ST-subtelocêntrico (RB=3,01-7,00) e A-acrocêntrico (RB maior que 7,00).

Resultados

Não foram observadas diferenças entre indivíduos dos três pontos analisados, nem entre exemplares de sexos distintos. Os espécimes analisados apresentaram $2n=50$ cromossomos, cariótipo composto por $4M+10SM+6ST+30A$ e número fundamental $NF=70$ (Figura 5.1). A coloração com nitrato de prata mostrou RONS simples em cromossomos ST/A (Figura 5.1-detalhe). O bandamento C revelou pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, localizada nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 5.2a). Quatro diminutos sítios de rDNA 18S foram localizados por meio de FISH (Figura 5.2b). Os seis sítios de rDNA 5S observados encontram-se localizados na região distal do braço curto de um par de A medianos e de dois pares A pequenos (Figura 5.2c). A FISH com a sonda do DNA satélite As-51 indicou ausência de homologia com o complemento cromossômico de *A. ribeirae* (Figura 5.2d).

Discussão

A. ribeirae soma-se à maioria das espécies de *Astyanax* com relação ao número diplóide. O número modal observado no gênero é $2n=50$ cromossomos, e inversões paracêntricas e pericêntricas desempenham importante papel na evolução cariotípica do grupo. Entretanto, algumas espécies apresentam $2n=48$, 46 ou 36 cromossomos, demonstrando que rearranjos Robertsonianos também devam ter ocorrido ao longo da evolução cariotípica do gênero (PAZZA e KAVALCO, 2007).

Em *Astyanax*, o primeiro par cromossômico é do tipo metacêntrico grande, característico dos Characidae (SCHEEL, 1973; MORELLI *et al.*, 1983; PORTELA *et al.*, 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005). As RONS são múltiplas e geralmente com sítios pequenos, embora o nitrato de prata tenha afinidade por um par com ativação preferencial em algumas populações (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998a; PAZZA *et al.*, 2006). Em *A. ribeirae* são observados apenas quatro sítios de rDNA 18S; outros sítios podem não ter sido localizados devido a um número reduzido de cópias gênicas. De fato, sítios diminutos de rDNA 18S foram observados previamente no gênero *Astyanax* (FERRO *et al.*, 2001; PAZZA *et al.*, 2006).

Em algumas espécies, sobretudo dos grupos de lambaris com rabo amarelo (*A. altiparanae*, *A. bimaculatus*, *A. lacustris* e *A. scabripinnis*) e vermelho (*A. fasciatus*, *A. parahybae*, *A. bockmanni*, *A. mexicanus*) é observada a presença de um sítio de rDNA 5S em posição intersticial nos cromossomos, um M marcador (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007; Capítulo III, neste volume). Este deve ser um caráter ancestral no gênero, uma vez que é compartilhado com a espécie da América Central *A. mexicanus* (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007). Entretanto, nas espécies de distribuição da costa brasileira, *A. giton*, *A.*

intermedius (KAVALCO *et al.*, 2004), *A. janeiroensis* (VICARI, 2006) e *A. hastatus* (dados não mostrados), este par é ausente, assim como em *A. ribeirae* (Figura 5.3c). É possível que este sítio tenha sido perdido ao longo do tempo, no subgrupo formado por estas espécies costeiras (KAVALCO *et al.*, 2004).

O bandamento C em *Astyanax* mostra tendências heterogêneas. Há grupos com grande quantidade de heterocromatina constitutiva terminal (JUSTI, 1993; HERAS, 1998; MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998b; CENTOFANTE *et al.*, 2003; PAZZA *et al.*, 2008a, b), que podem até resultar em polimorfismo inter e intraindividuais (MANTOVANI *et al.*, 2000), e outras em que esses blocos estão ausentes (JUSTI, 1993; MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998b; KAVALCO *et al.*, 2007; KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007), porém praticamente todas as espécies apresentam bandas pequenas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, além das relacionadas às RONS, assim como ocorre em *A. ribeirae* (Figura 5.2a).

Dados sobre a homologia de um DNA satélite obtido a partir de *A. scabripinnis* e com similaridade com seqüências de elementos transponíveis (MESTRINER *et al.*, 2000), têm mostrado que em algumas espécies essa seqüência teve maior dispersão, como nos grupos *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* (MANTOVANI *et al.*, 2004; ABEL *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2008a; capítulo VI, neste volume), e embora sua origem provavelmente seja anterior à primeira colonização por *Astyanax* na América Central, há 4.5 Ma (STRECKER *et al.*, 2004), esta não é observada em todas as espécies do gênero (KAVALCO *et al.*, 2007; capítulos III e IV, neste volume), como ocorre também em *A. ribeirae* (Figura 5.2d). Tal estimativa pode ser feita por este DNA satélite possuir alguma homologia com regiões do complemento cromossômico do lambari cego *A. mexicanus* (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007), uma espécie de distribuição

restrita a cavernas da América Central, e cuja dispersão se deu há aproximadamente 4.5 Ma (STRECKER *et al.*, 2004).

Estas diferenças podem ser indícios citogenéticos do que já foi sugerido com base em caracteres morfológicos, que indicam que *Astyanax* seja um grupo polifilético (WEITZMAN e MALABARBA, 1998). Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que haja relacionamento filogenético mais estreito entre as espécies que não possuem o DNA satélite As-51, sem que necessariamente o grupo seja polifilético. Tal incerteza é levantada pela descontinuidade entre a evolução cariotípica e a evolução morfológica no grupo, responsável pela presença de espécies crípticas nos grupos *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), *A. fasciatus* (JUSTI, 1993), *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004) e *A. hastatus* (capítulo IV, neste volume).

Embora apresente características citogenéticas compartilhadas com outras espécies do gênero, em *A. ribeirae* estas características estão agrupadas de maneira única, tornando essa espécie diferente das demais. Seus 50 cromossomos estão organizados de forma diferente das demais espécies do gênero (Figura 5.1), com exceção de *A. scabripinnis* do rio Paraíba do Sul (4M+10SM+6ST+30A) (SOUZA e MOREIRA-FILHO, 1995), com a qual compartilha a fórmula cariotípica. É improvável que estes cariótipos pertençam ao mesmo táxon, uma vez que *A. ribeirae* é endêmico da bacia do rio Ribeira de Iguape (OYAKAWA *et al.*, 2006) e não há registros de sua introdução na bacia do rio Paraíba do Sul (ARAUJO e SANTOS, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006a, 2006b). Além disso, o grupo *A. scabripinnis* tem passado por revisões taxonômicas (BERTACO e LUCENA, 2006), e acredita-se que esse seja formado por um grande número de espécies, algumas delas crípticas (MOREIRA-FILHO e

BERTOLLO, 1991). Portanto, é possível que esses cariótipos sejam fruto de convergência.

As demais espécies de *Astyanax* que possuem muitos cromossomos A, como *A. giton* (6M+8SM+8ST+28A), *A. intermedius* (6M+8SM+4ST+32A) (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *A. scabripinnis* do rio Jucu (6M+8SM+36A) (ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993), e os citótipos A (4M+8SM+10ST+28A) e C (6M+8SM+4ST+32A) de *A. hastatus* (capítulo IV, neste volume), apresentam outras fórmulas cariotípicas, e também ocorrem na região costeira do Brasil. Embora algumas pequenas diferenças possam ser devidas a erros de classificação dos tipos cromossômicos, é provável que essa diferenciação seja oriunda de eventos de rearranjos cromossômicos que mantêm o número diplóide, como as inversões, e que as diferenças existentes tenham sido reforçadas por processo de vicariância.

Com efeito, o processo de vicariância tem participação na exuberância da biodiversidade dos organismos da Mata Atlântica, considerada um dos ecossistemas de maior endemismo e riqueza de espécies de todos os biótopos mundiais. Segundo o relatório do Ministério de Meio Ambiente do Brasil, os ecossistemas aquáticos da Mata Atlântica brasileira possuem fauna de peixes rica e variada, associada, de forma íntima, à floresta que lhe proporciona proteção e alimento. O traço marcante dessa fauna é seu grau de endemismo, resultante do processo de evolução histórica das espécies em área geomorfologicamente isolada das demais bacias hidrográficas brasileiras (MMA, 2000). Preservar o maior trecho contínuo e com alto nível de integridade ambiental restante na mata Atlântica, onde está inserida a bacia do rio Ribeira de Iguape, é também garantir a manutenção de espécies únicas e endêmicas, como *A. ribeirae*.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

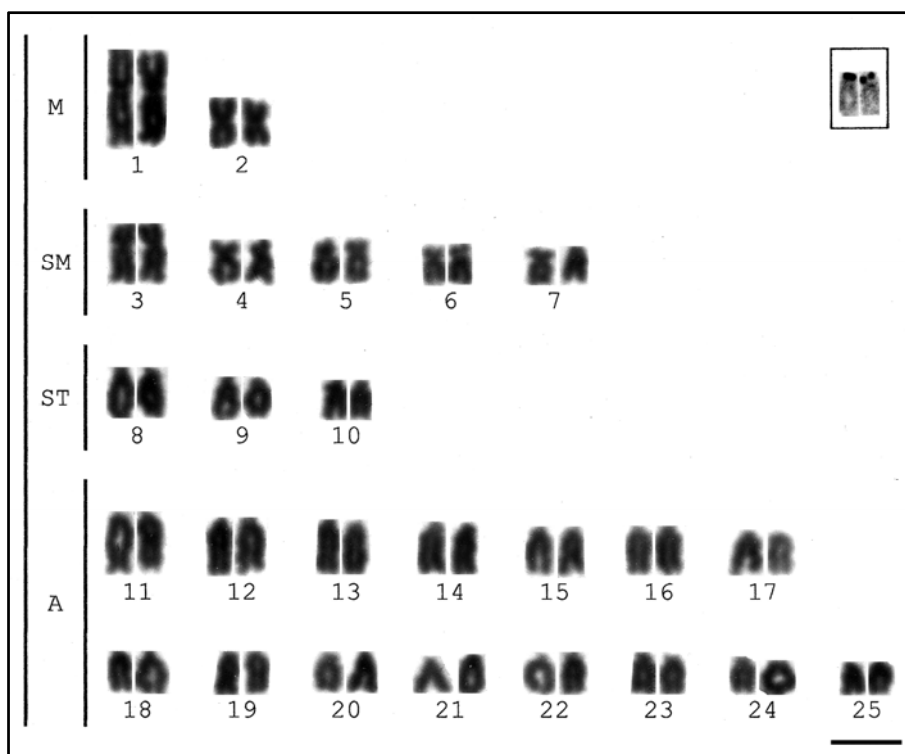


Figura 5.1 – Cariótipo de *A. ribeirae* corado em Giemsa. No detalhe, cromossomos portadores das Ag-RONs. Barra=5 μ m.

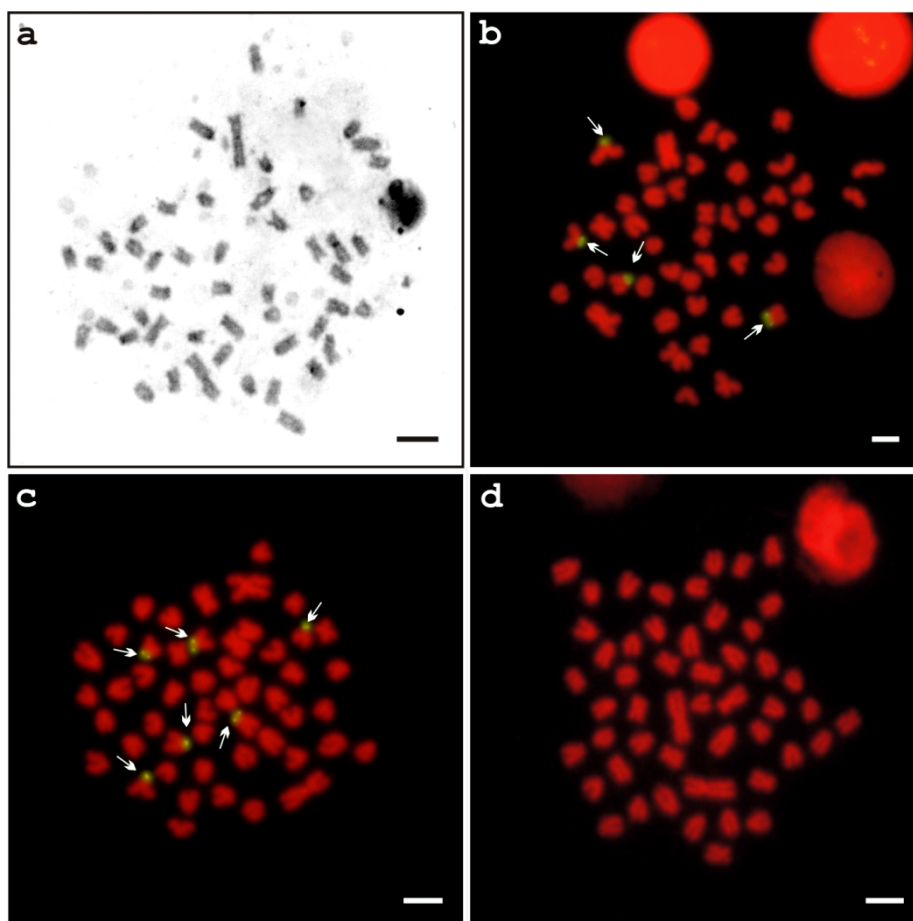
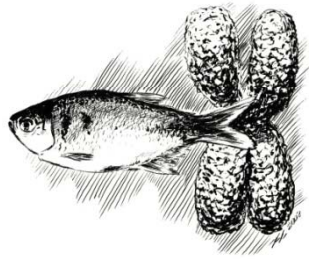


Figura 5.2 – Metáfases de *A. ribeirae*. Em (a) metáfase submetida ao bandamento C. As setas indicam os sítios de FISH com sondas de rDNA 18S (b) e 5S (c). Em (d) ausência de sítios do DNA satélite As-51. Barras=5 μ m.



Capítulo 6

Capítulo VI

Padrão biogeográfico da distribuição cromossômica de um DNA satélite em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) das bacias do Sudeste Brasileiro.¹

Abstract

The As-51 satellite DNA is a transposon-like sequence, formerly described for arthropods, and identifiable by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH). In the present work, we describe the occurrence of this sequence, besides the C-banding and karyotype composition, in populations of the group *Astyanax* aff. *fasciatus* from Mogi-Guaçu (Araras-SP), Paranapanema (Angatuba and Pilar do Sul-SP), Ribeira de Iguape (Sete Barras-SP) and Tietê (Indaiatuba and Salesópolis-SP) river basins. The specimens from Sete Barras (10M+20SM+12ST+6A) and Araras (8M+22SM+12ST+6A) presented 2n=48 chromosomes. The samples from Angatuba, Pilar do Sul and Indaiatuba presented 2n=46 chromosomes (12M+20SM+10ST+4A). The individuals collected in Salesópolis showed three cytotypes, bearing 2n=46 (12M+20SM+10ST+4A), 2n=48 (8M+22SM+12ST+6A), and 2n=50 (8M+16SM+14ST+12A). C-banding revealed large heterochromatic blocks at terminal chromosomal regions in all populations and/or cytotypes. All analyzed populations presented conspicuous blocks carrying the As-51 satellite DNA, although the number of chromosomes bearing this repetitive sequence was variable among them. Such differences were not related to the diploid number of individuals but rather to a biogeographic pattern. Aspects about the karyotype evolution and distribution of this sequence in distinct populations are discussed.

¹ KAVALCO KF, PAZZA R, BRANDÃO KO, ALMEIDA-TOLEDO LF. Biogeographic pattern on the chromosomal distribution of a satellite DNA in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian southeastern basins. Heredity (submitted).

Resumo

O DNA satélite As-51 é uma seqüência que apresenta semelhanças com um elemento transponível descrito para artrópodes, identificável por meio de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH). No presente trabalho descrevemos a ocorrência dessa seqüência e apresentamos as composições cariotípicas e bandamentos C de populações do grupo *Astyanax aff. fasciatus* provenientes das bacias dos rios Mogi-Guaçu (Araras-SP), Paranapanema (Angatuba e Pilar do Sul-SP), Ribeira de Iguape (Sete Barras-SP) e Tietê (Indaiatuba e Salesópolis-SP). Os exemplares de Sete Barras (10M+20SM+12ST+6A) e Araras (8M+22SM+12ST+6A) apresentaram $2n=48$ cromossomos. Os exemplares de Angatuba, Pilar do Sul e Indaiatuba possuem $2n=46$ cromossomos (12M+20SM+10ST+4A). Os indivíduos coletados em Salesópolis apresentaram três diferentes citótipos, com $2n=46$ (12M+20SM+10ST+4A), $2n=48$ (8M+22SM+12ST+6A), e $2n=50$ (8M+16SM+14ST+12A) cromossomos. O bandamento C revelou a existência de grandes blocos heterocromáticos nas regiões distais dos cromossomos de todas as populações e/ou citótipos. Todas as populações possuem blocos conspícuos do satélite As-51, porém com diferenças interpopulacionais no número de cromossomos portadores deste DNA repetitivo. Tais diferenças não se mostraram relacionadas ao número diplóide dos indivíduos, mas a um padrão biogeográfico. Aspectos da evolução cariotípica e da distribuição desta seqüência em diferentes populações são discutidos.

Introdução

Os rios que compõem o sistema de drenagem do Leste correm exclusivamente em território brasileiro, e se estendem da foz do rio São Francisco até o rio Itajaí (PAIVA, 1982). Podem ser identificadas três principais drenagens na região costeira:

do rio Paraíba do Sul; do rio Ribeira de Iguape e o conjunto de drenagens atlânticas independentes, ou Rios Costeiros. A região é conhecida por seu alto grau de endemismo, que é estimado em 95% (BIZERRIL, 1994).

A história natural da ictiofauna das drenagens da costa brasileira está relacionada com a geomorfologia da região, caracterizada pela presença da Serra do Mar, um conjunto de escarpas festonadas com cerca de 1.000 km de extensão, que se estende do Estado do Rio de Janeiro até norte do Estado de Santa Catarina (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998). No Estado do Paraná configura uma cadeia de montanhas com cimos elevados até a 1.800 m de altitude, e em São Paulo, impõe-se como típica borda de planalto, freqüentemente nivelada pelo topo em altitudes de 800 a 1.200 m (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998). Esta formação geológica é um importante divisor de águas entre a drenagem costeira e os rios que drenam para o continente, como os componentes da bacia dos rios Tietê, Grande e Paranapanema, formadores do sistema do rio Paraná. Certas extensões da Serra do Mar atuam também como divisoras das águas das sub-bacias continentais, como a Serra de Paranapiacaba, que separa as drenagens do Rio Ribeira de Iguape e do rio Paranapanema (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998).

Padrões biogeográficos interessantes são observados com relação à ictiofauna de água doce no escudo cristalino brasileiro e nas drenagens da costa. Os padrões sugerem que os eventos cladogênicos entre estas estruturas vêm ocorrendo de maneira repetida por longas distâncias ao longo do tempo, originando padrões filogenéticos entre grupos-irmãos, os quais ocorreram em diferentes fases (RIBEIRO, 2006).

Estima-se que a freqüência de fauna compartilhada entre as bacias dos rios costeiros e dos rios Paraná e São Francisco seja de 17 e 11%, respectivamente (BIZERRIL, 1994). Entretanto, é preciso levar em conta que muitas espécies constituem

“complexos de espécies”, e compõem grupos de espécies sinonimizadas ou crípticas, como *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), *A. altiparanae* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004) e *A. fasciatus* (PAZZA *et al.*, 2006), podendo, assim, também constituir exemplos deste padrão biogeográfico. Além disso, há pelo menos um caso bem caracterizado de mistura faunística, produzido pela transposição de um rio que anteriormente drenava para o rio Grande (Alto Paraná) e que passou a drenar para a bacia do rio São Francisco (MOREIRA-FILHO e BUCKUP, 2005).

A. fasciatus é descrito como habitante dos rios do Brasil, e análises citogenéticas têm fornecido pistas de que os exemplares da bacia do Alto rio Paraná podem fazer parte de um grupo mais diverso de peixes que estão organizados sob um mesmo táxon (PAZZA *et al.*, 2006). O objetivo do presente trabalho é analisar dados cromossômicos da distribuição da heterocromatina constitutiva e do DNA satélite As-51 de espécies do grupo *A. aff. fasciatus* e correlacioná-los com tendências de evolução cariotípica previamente observadas no grupo, observando possíveis relações biogeográficas.

Material e Métodos

Foram analisados exemplares de *Astyanax aff. fasciatus* provenientes de quatro diferentes bacias do sudeste brasileiro: 8 exemplares do rio Mogi-Guaçu (região de Araras-SP – S 22°22'59" / Wo 47°25'49"), 14 exemplares do rio Paranapanema, sendo 12 de Angatuba (S 23°32'59" / Wo 48°30'44") e 2 de Pilar do Sul-SP (S 23°48'45" / Wo 47°42'31"), 9 exemplares do rio Ribeira de Iguape (Sete Barras-SP – S 24°18'40" / Wo 47°53'31") e 49 exemplares do rio Tietê, sendo 47 exemplares provenientes de Salesópolis-SP (S 23°31'24" / Wo 45°51'42") e 2 provenientes de Indaiatuba-SP (S

23°05'39" / Wo 47°15'38"). Os exemplares encontram-se tombados junto à coleção ictiológica do Museu de Tecnologia da PUC-RS.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo GOLD *et al.* (1990) e o bandamento C seguiu SUMNER (1972). Foi realizada hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006) utilizando-se uma sonda de DNA satélite denominada As-51, isolada a partir de uma população de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000), em pelo menos dois exemplares de cada citótipo. As hibridações foram realizadas com todas as lâminas simultaneamente, com o fim de evitar artefatos.

As preparações foram analisadas em microscópio ótico e capturadas (utilizando-se 5Mp de definição) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e com o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos levou em consideração a razão de braços (RB), classificando os cromossomos em quatro tipos: M - metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM - submetacêntrico (RB= 1,71-3,00), ST - subtelocêntrico (RB= 3,01-7,00) e A - acrocêntrico (RB= maior que 7,00), de acordo com LEVAN *et al.* (1964).

Resultados

Foram identificados diferentes números diplóides e fórmulas cariotípicas nas diferentes bacias hidrográficas analisadas (Figura 6.1). Os resultados e os dados da literatura encontram-se sumarizados na Tabela 6.1. Não foram observadas diferenças nos cariótipos com relação ao sexo dos indivíduos analisados.

Os exemplares provenientes de Sete Barras apresentaram $2n=48$ cromossomos (10M+20SM+12ST+6A) (Figura 6.2a). A população proveniente de Salesópolis apresentou três diferentes citótipos, com $2n=46$ (12M+20SM+10ST+4A)

(Figura 6.2c), $2n=48$ (8M+22SM+12ST+6A) (Figura 6.2e), e $2n=50$ cromossomos (8M+16SM+14ST+12A) (Figura 6.2g). Os exemplares de Indaiatuba, Pilar do Sul e Angatuba apresentaram $2n=46$ cromossomos e mesma fórmula cariotípica (12M+20SM+10ST+4A) (Figuras 6.3a, c, e, respectivamente). Já os exemplares provenientes de Araras apresentaram $2n=48$ cromossomos (8M+23SM+12ST+6A) (Figura 6.3g). Em todas as populações os cariótipos apresentaram blocos conspícuos de heterocromatina constitutiva, com exceção dos exemplares provenientes de Sete Barras/SP, onde a heterocromatina localiza-se preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 6.4). O estudo da localização das Bandas-C das populações de Angatuba e Araras foi previamente realizado e discutido por Pazza *et al.* (2008b).

O satDNA As-51 mostrou-se presente em todas as populações (Figura 6.2 e 6.3), ocorrendo diferenças quanto ao número de cromossomos portadores deste DNA repetitivo. Tais diferenças não se mostraram relacionadas ao número diplóide dos indivíduos, mas relacionam-se claramente às bacias onde os exemplares foram coletados.

A população de Sete Barras apresentou um único par cromossômico com homologia com a sonda As-51, sendo o sítio presente na região intersticial distal de par de cromossomos acrocêntricos (Figura 6.2b). Os citótipos provenientes de Salesópolis e com $2n=46$ e 48 apresentaram dois pares de cromossomos acrocêntricos portadores deste DNA satélite (Figuras 6.2d, f). O citótipo de $2n=50$ cromossomos apresentou adicionalmente um par ST marcado, além de um heteromorfismo de tamanho no sítio do par A de número 20 (Figura 6.2h). Por sua vez, os exemplares provenientes de Indaiatuba apresentaram dez cromossomos marcados pela sonda do DNA satélite As-51, sendo um cromossomo ST portador de

dois sítios sintênicos (Figura 6.3b). Os exemplares provenientes de Pilar do Sul apresentaram 17 sítios (Figura 6.3d). A população de Angatuba possui 14 cromossomos portadores do DNA satélite As-51 (Figura 6.3f), e a população de Araras mostrou 18 marcações (Figura 6.3h).

Discussão

Vários exemplos de variações cromossômicas em populações naturais já foram reportados em peixes Neotropicais, e fissões e fusões cêntricas, inversões e presença de cromossomos supranumerários parecem ser os eventos mais comuns, seguidos por alguns casos de poliploidia.

As primeiras análises citogenéticas de *A. aff. fasciatus* foram realizadas nos anos 70 (JIN e TOLEDO, 1975), e desde esta época este grupo tem sido amplamente estudado. O grupo de espécies *A. fasciatus* é considerado um dos mais diversificados no gênero *Astyanax*, dada a expressiva variação nos números diplóides, que vão de $2n=45$ a $2n=48$ cromossomos (JIN e TOLEDO, 1975; MORELLI *et al.*, 1983; PAGANELLI, 1990; JUSTI, 1993; DANIEL-SILVA, 1996; PAZZA *et al.*, 2006). Mesmo em citótipos com o mesmo número cromossômico, há diferenças nas fórmulas cariotípicas, e ocorrência de cromossomos ímpares, os quais não possuem homólogos semelhantes em forma (PAZZA *et al.*, 2006). Além disso, casos de triploidia natural também já foram registrados no grupo (GROSS *et al.*, 2004).

Ampliando o polimorfismo conhecido para *A. aff. fasciatus*, no presente estudo foram verificados os cariótipos padrão com $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos nas bacias do Tietê ($2n=46$), Paranapanema ($2n=46$) e Mogi-Guaçu ($2n=48$). Foi identificado um novo citótipo entre os exemplares provenientes do rio Ribeira de Iguape ($2n=48$), além de um polimorfismo numérico na população no Alto rio Tietê. Nesta, além das

formas padrão foram encontrados exemplares com $2n=50$ cromossomos (Figura 6.2) (Capítulo VI, neste volume), número diplóide incomum para o grupo.

O padrão de bandamento-C em *Astyanax* é muito variável, inclusive com a presença de polimorfismos intrapopulacionais (MANTOVANI *et al.*, 2000). Em *A. aff. fasciatus*, é possível a identificação de dois principais tipos de heterocromatinas. Um deles, localizado nas regiões distais nos cromossomos, ocorre em populações do alto rio Paraná (JUSTI, 1993; HERAS, 1998; CENTOFANTE *et al.*, 2003; PAZZA *et al.*, 2008a), nas populações ora analisadas (Figura 6.4) e em duas populações provenientes do rio Piumhi – MG (PERES *et al.*, 2006). Esta população do rio Piumhi provavelmente origina-se de uma população introduzida a partir dos estoques do rio Grande, pela transposição deste rio para a bacia do rio São Francisco, ocorrida na década de 60 (MOREIRA-FILHO e BUCKUP, 2005). O outro padrão, verificado apenas em indivíduos provenientes da bacia do rio São Francisco e do rio Ribeira de Iguape, é caracterizado pela ocorrência de bandas-C localizadas preferencialmente na região pericentromérica de vários cromossomos (JUSTI, 1993; Figura 6.4), ou em região distal de apenas um par cromossômico (PERES *et al.*, 2006). Portanto, é possível que a distribuição da heterocromatina neste grupo possa ser um importante marcador para estudos entre diferentes populações, podendo inclusive indicar que as populações das bacias do rio São Francisco e do rio Paraná não correspondam ao mesmo táxon (PAZZA *et al.*, 2008a).

A expressiva variação no grupo *A. aff. fasciatus* deve estar ligada a características genômicas, como a presença do DNA satélite As-51, uma vez que tal variação é observada em diferentes bacias hidrográficas. Este DNA repetitivo apresenta grande semelhança com a seqüência de um elemento transponível descrito

para artrópodes e seu acúmulo poderia ser considerado uma tendência (MESTRINER *et al.*, 2000).

VOLFF (2005) destaca que em teleósteos, a diversidade de elementos transponíveis tem se mostrado muito mais expressiva do que nos genomas de mamíferos, mesmo em grupos com pequena quantidade de seqüências repetitivas, como os baiacus (Tetraodontidae). Não há dúvidas de que elementos transponíveis interfiram na evolução dos genomas (KAZAZIAN, 2004), e estes têm sido relacionados com rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução de uma grande variedade de organismos.

Uma vez que elementos transponíveis podem contribuir para o isolamento reprodutivo e são normalmente ativos nas linhagens germinativas, pode-se inferir que estejam ligados ao processo de especiação (VOLFF, 2005). Embora análises filogenéticas de vários retrotransposons de diversas espécies de peixes tenham revelado a presença de múltiplas ocorrências de retrotransposições, as quais podem ser associadas a eventos de especiação (VOLFF *et al.*, 2001), no grupo *A. aff. fasciatus* o isolamento reprodutivo não é ainda efetivo, ao menos para o grupo proveniente do rio Mogi-Guaçu e portador de grande quantidade do DNA As-51, uma vez que é ainda observado certo fluxo gênico entre diferentes citótipos (PAZZA *et al.*, 2007). Ainda, dado que os citótipos híbridos com $2n=45$, 46 e 47 são viáveis e aparentemente férteis, e não correspondem à F1 dos citótipos padrão (PAZZA *et al.*, 2007), pode-se inferir que a presença do DNA As-51 não está gerando isolamento reprodutivo total neste grupo.

As diferentes populações analisadas no presente trabalho mostram um panorama interessante em relação à localização cromossômica do DNA satélite As-51 nos diferentes citótipos de *A. aff. fasciatus*, com relação às bacias onde se encontram.

A população localizada na bacia do rio Ribeira de Iguape (Sete Barras), da drenagem dos rios Litorâneos, possui apenas um par portador do DNA repetitivo (Figura 6.2b). Por sua vez, os citótipos provenientes da cabeceira do rio Tietê (Salesópolis), que se encontram também na borda oriental do continente, possuem poucos pares cromossômicos portadores do DNA As-51 (Figuras 6.2d, f, h). Estes citótipos destoam dos encontrados nas bacias interioranas, como as do rio Paranapanema (Pilar do Sul e Angatuba – Figuras 6.3d, f), do médio rio Tietê (Indaiatuba – Figura 6.3b) e do rio Mogi-Guaçu (Araras – Figura 6.3h), onde vários sítios puderam ser identificados por meio da hibridação fluorescente *in situ*. É interessante que essas populações portadoras de pouco satDNA As-51 possuam uma distribuição marginal na costa brasileira, dadas as informações da história geológica da região. Estas populações podem ter sido formadas em decorrência de eventos de vicariância a partir do paleo rio Atlântico, que no passado drenava os rios da região costeira brasileira, até ser invadido pelo oceano Atlântico (AB’SABER, 1957).

Dados da literatura reforçam este panorama, uma vez que uma população de *A. parahybae* proveniente da bacia do rio Paraíba do Sul (drenagem costeira), também apresenta apenas 4-5 sítios portadores do DNA satélite As-51, com a presença de heteromorfismo em um dos pares (KAVALCO *et al.*, 2007). Além disso, os presentes dados reforçam a proximidade de *A. parahybae* e os citótipos de *A. aff. fasciatus* do alto rio Tietê. *A. parahybae* era considerada anteriormente subespécie de *A. fasciatus* (MELO, 2001), com a qual compartilha muitas semelhanças cromossômicas, como o número diplóide de 48 cromossomos e cariótipo constituído por muitos cromossomos submetacêntricos (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). Segundo KAVALCO *et al.* (2007), *A. scabripinnis* do rio Paraíba do Sul também apresenta reduzido número de sítios em relação às populações do rio Paranapanema analisadas por

MANTOVANI *et al.* (2004) e ABEL *et al.* (2006). Além disso, as drenagens dos altos rios Tietê e Paraíba do Sul têm uma antiga história geológica, onde eventos como a captura da cabeceira do rio Tietê pelo rio Paraíba do Sul parece ter ocorrido (AB'SABER, 1957). Conseqüentemente, é esperada certa semelhança entre espécies ou grupos de espécies próximas destas duas drenagens, embora, atualmente, as mesmas drenem em sentido oposto.

Por sua vez, as populações de *A. aff. fasciatus* previamente analisadas e provenientes das bacias interioranas do atual sistema de drenagem do rio Paraná apresentam grande quantidade de sítios do DNA satélite As-51 em seus cromossomos (ABEL *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2008a). A presença de cromossomos com sintenia de dois sítios do DNA satélite As-51 foi previamente descrita em um citótipo de $2n=47$ cromossomos do rio Mogi-Guaçu (PAZZA *et al.*, 2008a), porém no presente trabalho foi observada marcação em apenas um dos homólogos (Figura 6.3b). Os dados obtidos no presente trabalho reforçam a hipótese sugerida anteriormente para a distribuição dos citótipos de *A. aff. fasciatus* na bacia do rio Paraná (PAZZA *et al.*, 2006). Semelhantemente ao observado na população proveniente de Salesópolis, onde foram observados $2n=46$, 48 e 50 cromossomos (Figura 6.2), PAZZA *et al.* (2006) encontraram um polimorfismo cromossômico na região de Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu. Neste caso foi detectada uma frequência muito elevada de indivíduos com $2n=46$ cromossomos, oposto do observado à montante e à jusante do rio Mogi-Guaçu, o que sugeriria um efeito característico de espécie invasora para o citótipo $2n=46$, sendo o citótipo $2n=48$ residente da bacia (PAZZA *et al.*, 2006). A presença desta inversão paracêntrica e de 46 cromossomos em exemplares provenientes do médio rio Tietê (região de Indaiatuba) reforça a idéia de que pode ter havido

introdução de fauna no rio Mogi-Guaçu a partir de afluentes do rio Tietê, e que, portanto, este citótipo atue como uma espécie invasora.

De forma semelhante, os dados disponíveis para as populações provenientes da bacia do rio São Francisco mostram uma gradação na quantidade do DNA satélite As-51 (Tabela 6.1), uma vez que na medida em que se afasta da região limítrofe com a bacia do alto rio Paraná, a quantidade de sítios do DNA As-51 diminui (PERES *et al.*, 2006). Portanto, as drenagens dos rios Grande, Tietê e Paranapanema constituem uma área onde o DNA satélite As-51 está em maior quantidade e mais disperso nos cromossomos de *A. aff. fasciatus* do que nas drenagens marginais a esta distribuição (região das bacias Costeiras e médio rio São Francisco).

Uma hipótese que poderia explicar este fato seria a introgressão posterior desta seqüência nas populações provenientes das bacias marginais à bacia do rio Paraná (São Francisco e região costeira), já que uma tendência normalmente vista para elementos transponíveis é a dispersão pelo genoma do hospedeiro. Adicionalmente, as populações que se encontram no Planalto Central da Bacia do Paraná, como as de Angatuba e Pilar do Sul (na bacia do rio Paranapanema), Araras (na bacia do rio Mogi-Guaçu) e Indaiatuba (bacia do médio rio Tietê), podem constituir estoques mais antigos, uma vez que o Planalto Central localiza-se no Escudo Brasileiro, onde se encontram as rochas mais antigas da região. A dispersão posterior da espécie em outras bacias pode ser resultado de movimentos geológicos e mudanças nos rios, além de eventos de vicariância, comuns em faunas de cabeceiras, como citado por CASTRO (1999). RIBEIRO (2006) relata que um padrão bastante recente de vicariância entre as faunas do escudo cristalino e das drenagens costeiras pode ser verificado pelas evidências de intercâmbio de espécies, inclusive com a formação de zonas reais de hibridismo. Entretanto, não é possível concluir com

certeza quando surgiu este DNA satélite no complemento das espécies de *Astyanax*. Pode-se apenas supor que seja anterior a 4.5 Ma, data estimada para a primeira colonização de *A. mexicanus* na América Central (STRECKER *et al.*, 2004), uma vez que esta espécie apresenta sinais que indicam ao menos homologia parcial com o satélite As-51 (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007).

Pode-se concluir que, embora todos estes citótipos estejam agrupados no grupo de espécies *A. aff. fasciatus*, a despeito de suas diferenças quanto aos números diplóides e fórmulas cariotípicas, características intrínsecas do genoma das populações de cada grande conjunto de drenagens (bacias do rio Paraná, do rio São Francisco e dos rios Litorâneos) estão levando estas espécies à diferenciação cromossômica, que pode culminar com o isolamento reprodutivo definitivo, caso este ainda não exista entre populações de diferentes bacias brasileiras. Estes dados, portanto, indicam que é provável que *A. fasciatus* seja um grupo composto por um grande número de espécies crípticas, cada uma com características cromossômicas próprias.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

Tabela 6.1 – Dados da distribuição do DNA satélite As-51 no gênero *Astyanax* e indicação do ponto no mapa das populações de *A. fasciatus*.

Espécie	Mapa	Procedência	2n	Marcações	Sistema Hidrográfico	Observações	Ref
<i>A. altiparanae</i>	--	Indaiatuba (SP)	50		Médio Tietê		
	--	Salesópolis (SP)	50	2 ST	Alto Tietê	(8M+20SM+10ST+12A)	
	--	Pilar do Sul (SP)	50	5 M/SM/A	Paranapanema	(8M+22SM+14ST+6A)	11
<i>A. aff. bimaculatus</i>	--	Sete Barras (SP)	50	0	Ribeira de Iguape	(8M+24SM+12ST+6A)	
	--	Cachoeiras de Macacu (RJ)	50	2 ST	Guapimirim	(8M+24SM+12ST+6A)	
<i>A. bockmanni</i>	--	São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul (SP)	50	0	Paranapanema	(10M+12SM+12ST+16A)	8
<i>A. fasciatus</i>	h	Rio Piracicaba – Piracicaba (SP)	46	14 ST/A	Médio Tietê	(12M+20SM+10ST+4A)	2
	e	Rio Mogi-Guaçu – Cachoeira de Emas (SP)	45 46 47 48	±16 ST/A	Paraná	2n=48 (8M+22SM+12ST+6A), 2n=46 (12M+20SM+10ST+4A), 2n=45, 2n=46 variante e quatro citótipos de 2n=47	
	g	Rio Mogi-Guaçu – Ouro Fino (MG)	46 48	±16 ST/A	Paraná	2n=48 (8M+22SM+12ST+6A), 2n=46 (12M+20SM+10ST+4A)	7
	d	Rio Pardo (SP)	46 48	±16 ST/A	Paraná	2n=48 (8M+22SM+12ST+6A), 2n=46 (12M+20SM+10ST+4A)	
	c	Rio Grande - Represa de Furnas (MG)	48	8 a 14 ST/A	Paraná	(8M+20SM+16ST+4A)	
	a	Córrego Minhoca – Rio Piumhi (MG)	48	8 a 14 ST/A	São Francisco	(8M+20SM+16ST+4A)	3

Continua...

Tabela 6.1 – Continuação...

Espécie	Mapa	Proveniência	2n	Marcações	Sistema Hidrográfico	Observações	Ref
<i>A. fasciatus</i>	a	Rio São Francisco – Foz rio Piumhi (MG)	48	8 a 14 ST/A	São Francisco	(8M+20SM+16ST+4A)	3
	b	Córrego Araras (MG)	48	2 ST/A	São Francisco	(8M+20SM+16ST+4A)	
	b	Córrego Pimenta (MG)	48	2 ST/A	São Francisco	(8M+20SM+16ST+4A)	
	f	Rio Mogi-Guaçu – Araras (SP)	48	18 ST/A	Paraná	(8M+22SM+12ST+6A)	12
	k	Angatuba (SP)	46	16 ST/A	Paranapanema	(12M+20SM+10ST+4A)	
	l	Pilar do Sul (SP)	46	17 ST/A	Paranapanema	(12M+20SM+10ST+4A)	
	m	Sete Barras (SP)	48	2 ST/A	Ribeira de Iguape	(10M+20SM+12ST+6A)	
	j	Salesópolis (SP)	46 48 50	4-5 ST/A	Ato Tietê	2n=46 (12M+20SM+10ST+4A), 2n=48 (8M+22SM+12ST+6A), 2n=50 (8M+16SM+14ST+12A) heteromorfismo em um par A no citótipo de 2n=50	
	i	Indaiatuba (SP)	46	10 ST/A	Médio Tietê	(12M+20SM+10ST+4A) Presença de um cromossomo com dois sítios	
<i>A. giton</i>	--	Córrego Jacu e Rio Paraitinga – Cunha (SP)	50	0	Paraíba do Sul	(6M+8SM+8ST+28A)	5
<i>A. hastatus</i>	--	Distrito Ypiranga (RJ)	50	0	Rios Costeiros	(4M+8SM+10ST+28A)	9
	--	Santana do Japuíba (RJ)	50	0	Rios Costeiros	(8M+10SM+14ST+18A)	
	--	Cachoeiras de Macacu (RJ)	50	0	Rios Costeiros	(6M+8SM+4ST+32A)	

Continua...

Tabela 6.1 – Continuação...

Espécie	Mapa	Proveniência	2n	Marcações	Sistema Hidrográfico	Observações	Ref
<i>A. intermedius</i>	--	Rio Paraitinga – Cunha (SP)	50	0	Paraíba do Sul	(6M+8SM+4ST+32A)	5
<i>A. janeiroensis</i>	--	Castro e São Luiz do Purunã (PR)	50	13	Ribeira de Iguape	(6M+14SM+14ST+16A)	4
<i>A. mexicanus</i>	--	Piscicultura - México	50	±4 ST/A	América Central	(8M+18SM+12ST+12A) Marcações sutis	6
<i>A. parahybae</i>	--	Rio Paraitinga – Cunha (SP)	48	4 ST/A	Paraíba do Sul	(8M+18SM+12ST+10A) Par adicional esporádico com marcação intersticial	5
<i>A. ribeirae</i>	--	Iporanga, Registro e Sete Barras (SP)	50	0	Ribeira de Iguape	4M+10SM+6ST+30A	10
<i>A. scabripinnis</i>	--	Córrego Centenário – Maringá (PR)	50	±16 ST/A	Paranapanema	(6M+20SM+8ST+16A) Variação intra-individual de blocos	1,2
	--	Córrego Marrecas – Londrina (PR)	48	±16 ST/A	Paranapanema	(8M+20SM+12ST+10A) Variação intra-individual de blocos	
	--	Córrego Viveiro de Mudas – Três Marias (MG)	50	±2 ST/A	São Francisco	(6M+30SM+8ST+6A) Pequenas marcações em outros cromossomos	2
	--	Córrego Curral das Éguas – São Gonçalo do Abaeté (MG)	46	0	São Francisco	(6M+22SM+8ST+14A)	
	--	Córrego dos Macacos – Cunha (SP)	50	6 ST/A	Paraíba do Sul	(8M+20SM+8ST+14A)	5

1 – MANTOVANI *et al.*, 2004; 2 – ABEL *et al.*, 2006; 3 – PERES *et al.*, 2006; 4- VICARI (2006); 5 – KAVALCO *et al.*, 2007; 6 – KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007; 7 – PAZZA *et al.*, 2008; 8- Capítulo III; 9 – Capítulo IV; 10 – Capítulo V; 11 – Capítulo VIII; 12 - Presente trabalho.

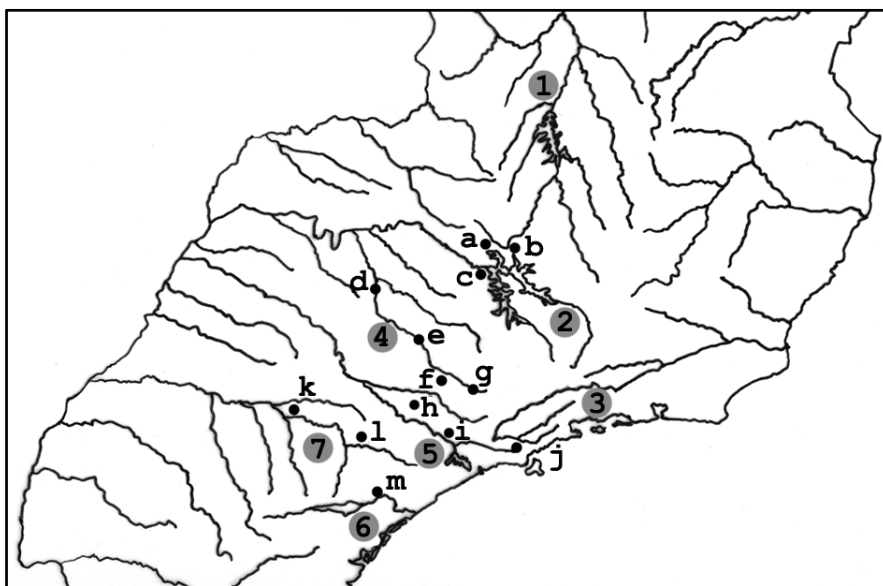


Figura 6.1 – Mapa da região sudeste do Brasil indicando os principais sistemas hidrográficos: 1) rio São Francisco; 2) rio Grande; 3) rio Paraíba do Sul; 4) rio Mogi-Guaçu; 5) rio Tietê; 6) rio Ribeira de Iguape; 7) rio Paranapanema. As letras identificam os pontos amostrados na literatura (a, b, c, d, e, g, h,) e no presente trabalho (f, i, j, k, l, m) (ver Tabela 6.1).

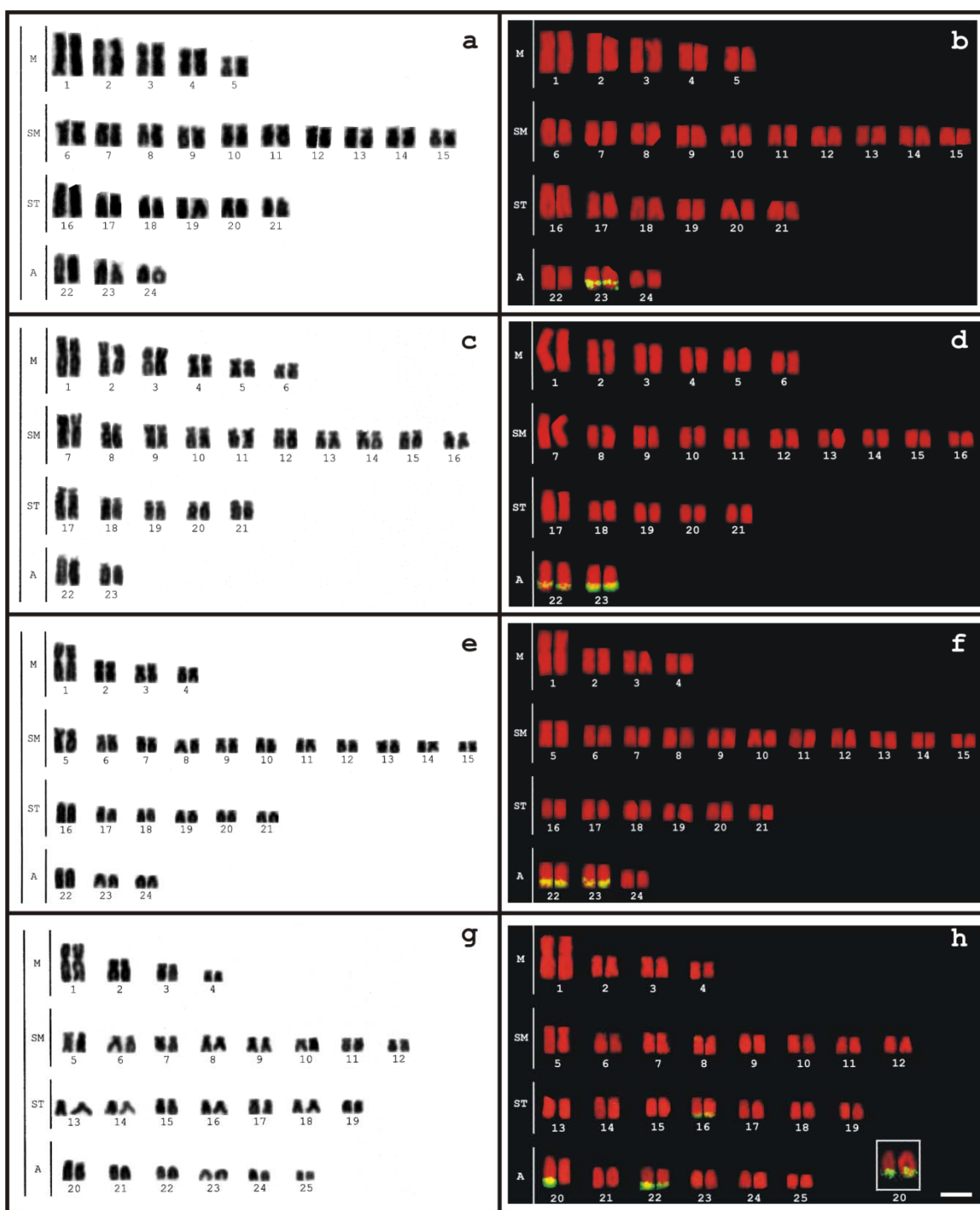


Figura 6.2 – Cariótipos de *A. aff. fasciatus* corados em Giemsa e após FISH com sonda do satDNA As-51. Exemplos provenientes de Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (a-b); e Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [$2n=46$ (c-d); $2n=48$ (e-f); $2n=50$ (g-h)]. Em destaque par número 20 do citótipo de $2n=50$ cromossomos, portador de sítios homomórficos do satDNA As-51. Barra=5µm.



Figura 6.3 – Cariótipos de *A. aff. fasciatus* corados em Giemsa e após FISH com sonda do satDNA As-51. Exemplos provenientes de Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (a-b); Pilar do Sul/SP – bacia do rio Paranapanema (c-d); Angatuba/SP – bacia do rio Paranapanema (e-f); e Araras/SP – bacia do rio Mogi-Guaçu (g-h). Barra=5µm.

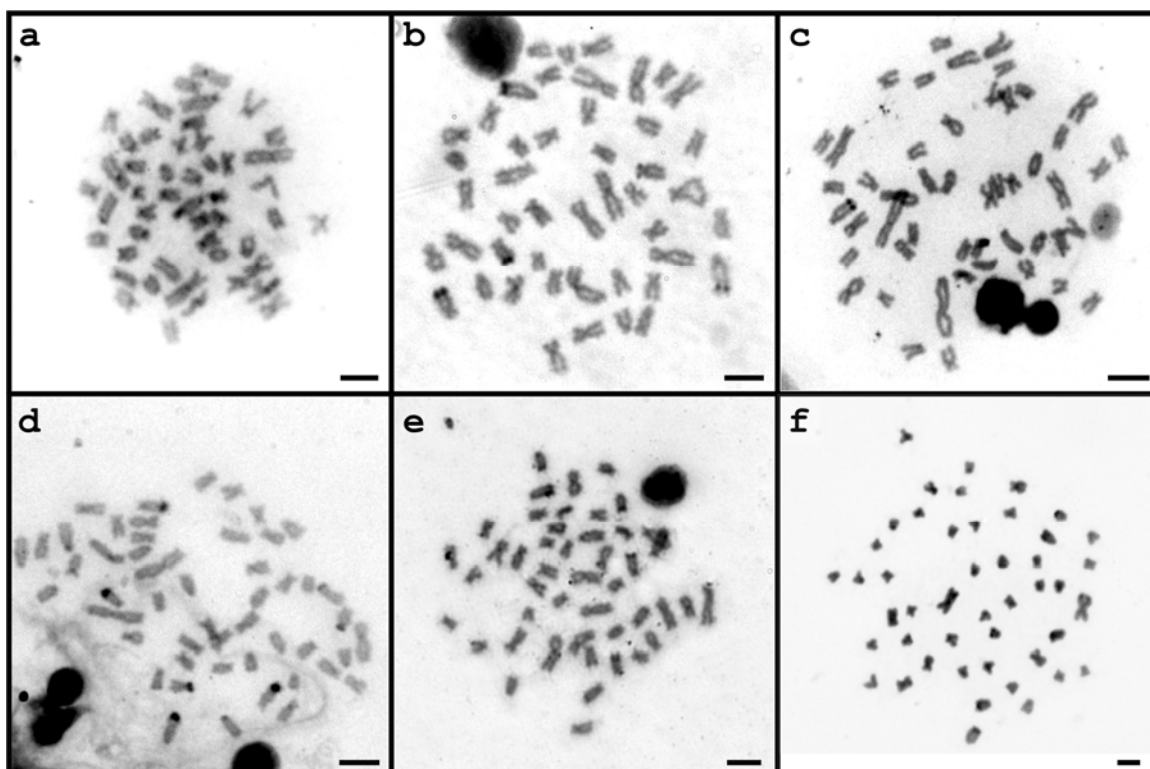
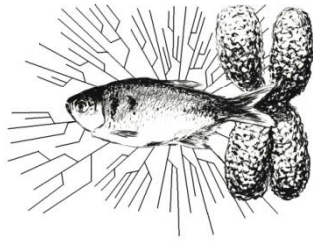


Figura 6.4 – Metáfases de *A. aff. fasciatus* após bandamento-C. Exemplos provenientes de Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (a); Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [$2n=46$ (b); $2n=48$ (c); $2n=50$ (d)]; Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (e); Pilar do Sul/SP – bacia do rio Paranapanema (f). Barras=5 μ m.



Capítulo 7

Capítulo VII

Astyanax aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae) do Sudeste do Brasil: análises citogenéticas e filogeográficas¹

Abstract

Comprising a large number of species, the genus *Astyanax* has been intensively studied under several approaches in order to elucidate its evolutionary relationships. Such studies have allowed verifying that many nominal species are, actually, artificial clusters where distinct taxa are grouped under a same denomination. The peculiar environment inhabited by the species of this genus turn them especially susceptible to independent and distinct evolutionary processes, leading to a remarkable variability, detected through morphology, as well as biochemical, genetic and chromosomal features. *A. aff. fasciatus* stands out amongst the groups of species characterized by a high karyotypic diversity, once the cytogenetic studies have reported three standard cytotypes (2n=46, 48 and 50 chromosomes), besides cases of sympatry between cytotypes, variant cytotypes and B chromosomes. In the present work, we attempted to evaluate the reliability of the chromosomal differences in face of sequence analysis in the ATPase6/8 mitochondrial DNA, in order to provide subsidies to the evolutionary reconstruction of this group. Nine populations from four distinct hydrographic basins along Southeastern Brazil were analyzed, and, for four populations, these represent the first cytogenetic data. The occurrence of three sympatric standard cytotypes was reported for the first time in the population of Salesópolis, Tietê River basin. The genetic distance was low among the studied populations and some aspects of the evolutionary relationships among distinct cytotypes/populations could be ascertained.

¹ Kavalco KF, Pazzia R, Brandão KO, Garcia C, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF. *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Southeastern Brazil: cytogenetic and phylogeographic analysis (em preparação).

Resumo

Apresentando um elevado número de espécies, o gênero *Astyanax* tem sido alvo de estudos sob diversas abordagens, visando elucidar suas relações evolutivas. Tais estudos têm permitido verificar que muitas espécies nominais são, na realidade, agrupamentos artificiais, ocorrendo diferentes taxa sob a mesma denominação. O ambiente singular habitado pelas espécies do gênero os torna vulneráveis a processos evolutivos independentes e distintos, resultando em uma variabilidade acentuada, que tem sido observada tanto no nível morfológico, como nos níveis bioquímico, genético e cromossômico. Entre o grupo de espécies que abrigam uma maior diversidade cariotípica está *A. aff. fasciatus*, cujos estudos citogenéticos documentam três citótipos padrão ($2n=46, 48$ e 50 cromossomos), além de casos de simpatria entre citótipos, citótipos variantes e cromossomo B. No presente trabalho, buscou-se avaliar a robustez das diferenças cromossômicas face a seqüência do DNA mitocondrial ATPase6/8, com a finalidade de fornecer subsídios para a reconstrução da história evolutiva desse grupo. Foram analisadas nove populações pertencentes a quatro bacias hidrográficas do Sudeste do Brasil, sendo que para quatro populações são apresentados os primeiros relatos citogenéticos. Pela primeira vez foi registrada a ocorrência em simpatria de três citótipos padrão, que foram identificados na população de Salesópolis, bacia do rio Tietê. A distância genética foi pequena entre as populações estudadas e algumas relações evolutivas entre diferentes citótipos/populações puderam ser discutidas.

Introdução

Os peixes destacam-se dentre os vertebrados por sua grande diversificação, com mais de 24 mil espécies válidas nos diferentes ambientes de água doce e salgada, sendo aproximadamente seis mil espécies de água doce na região Neotropical (NELSON, 1994).

Estima-se que esta diversidade na região Neotropical seja ainda maior, alcançando as 13 mil espécies (REIS *et al.*, 2003). Além dos contínuos esforços para revisar espécies tombadas em museus internacionais e descritas há muito tempo através dos aspectos morfológicos dos exemplares, as análises citogenéticas e de marcadores moleculares, especialmente mitocondriais, têm contribuído de modo efetivo no considerável aumento do conhecimento da diversidade da ictiofauna neotropical. Os estudos citogenéticos permitiram o diagnóstico de espécies crípticas dentro de diferentes grupos de peixes, por exemplo, nas Ordens Characiformes (MOREIRA FILHO e BERTOLLO, 1991; BERTOLLO *et al.*, 2000) e Gymnotiformes (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1988).

No gênero *Astyanax* (*Incertae Sedis* na família Characidae, Characiformes), a despeito das cerca de 100 espécies descritas (LIMA *et al.*, 2003), os dados citogenéticos encontram-se concentrados no grupo *A. aff. scabripinnis*, com mais de 50% das populações estudadas no gênero (PAZZA e KAVALCO, 2007). Esse grupo destaca-se por apresentar grande variação cariotípica interpopulacional, sendo o número diplóide mais comumente encontrado 50 cromossomos, embora populações com $2n=46$ e 48 também já tenham sido descritas (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; entre outros), bem como diversos casos de presença de cromossomos B e triploidias naturais (para revisão ver PAZZA e KAVALCO, 2007).

Em relação aos dados genéticos observados no grupo *A. fasciatus*, é possível identificar três citótipos padrão com base no pareamento dos cromossomos homólogos, sendo $2n=46$, 48 e 50, com pequenas diferenças cariotípicas populacionais dentro de cada citótipo. O citótipo $2n=46$ cromossomos prevalece na bacia do Alto Rio Paraná, especialmente na bacia do rio Paranaíba (JIN e TOLEDO, 1975; TORRES-MARIANO e MORELLI, 2006), no trecho médio do rio Tietê (ABEL *et al.*, 2006), na bacia do rio Paranapanema (PAZZA *et al.*, 2008b) e no rio Mogi-Guaçu (PAZZA *et al.*, 2006). O citótipo $2n=48$

cromossomos encontra-se distribuído pelas bacias do rio Grande (CENTOFANTE *et al.*, 2003) e Mogi-Guaçu (PAZZA *et al.*, 2006; 2008b), pertencentes ao Alto Rio Paraná, bem como no rio Tibagi (afluente do rio Paranapanema) (ARTONI *et al.*, 2006), em drenagens costeiras na bacia do rio Ribeira do Iguape (MORELLI *et al.*, 1983) e no rio de Contas e riachos costeiros do Estado da Bahia (Brasil) (MEDRADO *et al.*, 2008). Por sua vez, o citótipo $2n=50$ cromossomos até o momento foi detectado apenas no rio Tibagi (ARTONI *et al.*, 2006). Diferentemente de *A. scabripinnis*, além dos diferentes citótipos padrão, citótipos variantes não relacionados com cromossomos B também já foram identificados apresentando $2n=45, 46, 47$ (PAZZA *et al.*, 2006) e 49 cromossomos (ARTONI *et al.*, 2006). Estudos associando dados cromossômicos e morfométricos têm permitido observar um princípio de estruturação entre diferentes populações/citótipos analisados (ARTONI *et al.*, 2006; MEDRADO *et al.*, 2008; PAZZA *et al.*, 2008), embora marcadores moleculares (RAPD e ISSR) apontem para uma diferenciação recente e possível introgressão, em especial nos exemplares do rio Mogi-Guaçu (PAZZA *et al.*, 2007).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo fornecer subsídios para um melhor entendimento da história evolutiva de *Astyanax fasciatus*, através do seqüenciamento de uma região do genoma mitocondrial (ATPase 6/8) associada com os estudos citogenéticos em populações de diversas bacias hidrográficas do sudeste brasileiro.

Material e Métodos

Os exemplares de *A. aff. fasciatus* analisados no presente trabalho são provenientes de nove diferentes pontos, distribuídos ao longo de várias bacias hidrográficas, como indicado na Figura 7.1 e na Tabela 7.1. Depois dos procedimentos citogenéticos e da retirada de tecido para a extração do DNA os exemplares foram fixados

em formol 10% e mantidos em etanol 70%, identificados e depositados na coleção ictiológica do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS/Brasil.

Estudos cromossômicos

As preparações cromossômicas seguiram GOLD *et al.* (1990). A localização indireta das regiões organizadoras de nucléolos foi feita através de coloração por nitrato de prata (Ag-RON), realizada conforme KAVALCO e PAZZA (2004). A localização direta dos cístrons ribossômicos foi feita através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006), com sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI JR., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI JR., 1999).

As preparações cromossômicas foram analisadas com microscópio ótico e capturadas (com 5Mp de resolução) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos considerou a razão de braços: M-metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM-submetacêntrico (RB=1,71-3,00), ST-subtelocêntrico (RB=3,01-7,00) e A-acrocêntrico (RB maior que 7,00) como proposto por LEVAN *et al.* (1964).

Seqüenciamento e análise do DNA mitocondrial

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Wizard (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA foi quantificado utilizando-se gel de agarose e Ladder Low Mass (Invitrogen) e diluído em solução de uso com concentração de 10 ng/ μ L.

Foram utilizados cinco indivíduos representativos de cada ponto amostrado, quando possível. Optou-se pela utilização dos segmentos mitocondriais das subunidades 6 e 8 da ATPase. Para as reações de polimerase em cadeia (PCRs) foram utilizados os pares de primers ATP8.2-L8331 (5'-AAAGCRTTRGCCTTTTAAAGC-3') e CO3.2-H9236 (5'-

GTTAGTGGTCAGGGCTTGGRTC-3') (SIVASUNDAR *et al.*, 2001), que amplificam um segmento de aproximadamente 910pb.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, perfazendo um volume total de 25 μ L, contendo 15 ng de DNA molde, Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, 2.5 μ M de cada *primer*, 0.1 mM de cada dNTP e 2.5 U *Taq*-polimerase. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, hibridação a 56°C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 minutos a 72°C e de um passo de extensão final por 10 minutos a 72°C (PRIOLI *et al.*, 2002). Após checagem da amplificação via gel de agarose 1%, parte dos produtos de PCR foi purificada usando-se o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up – Invitrogen, e parte serviu diretamente de molde para as reações de sequenciamento. Estas foram realizadas utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 10 ng de DNA molde 5 pmol de cada primer foram adicionados em cada reação de seqüenciamento. As amostras foram submetidas a 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C e precipitadas para posterior seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram visualizadas e editadas através do programa Chromas Lite v2.01, e posteriormente verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa “Blastn”. Em seguida foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994) pelo software MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007), aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (20) e extensão de *gaps* (6,66).

A verificação do nível de saturação das substituições nas seqüências analisadas foi realizada com o auxílio do programa DAMBE v5.0.16, através do algoritmo de XIA *et al.*

(2003). O valor do parâmetro α da distribuição gama utilizado para os cálculos de distância foi estimado pelo programa PAUP* v4.0 (SWOFFORD, 2001), usando o modelo de substituição de TAMURA e NEI (1993) no qual as taxas dos dois tipos de substituições (entre purinas e entre pirimidinas) são consideradas separadamente levando em consideração as frequências desiguais dos quatro nucleotídeos.

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007), utilizando-se o método da máxima parcimônia com o algoritmo CNI (NEI e KUMAR, 2000) e calculados os índices de retenção, de consistência e de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) (1000 réplicas); as árvores de distância de Neighbour-Joining (SAITOU e NEI, 1987) foram obtidas através do método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) (TAMURA *et al.*, 2004), através do modelo de substituição de TAMURA e NEI (1993); o padrão de substituição dos nucleotídeos foi estimado pelo método da MCL através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007). Os dados estatísticos foram obtidos com o auxílio dos programas DAMBE v5.0.16, DNAsp v4.50 (ROZAS *et al.*, 2003) e MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007).

Resultados

Análises cromossômicas

A população amostrada em Salesópolis, bacia do rio Tietê, apresentou quatro distintos citótipos: $2n=46$, composto de $12M+20SM+10ST+4A$, $NF=88$ (Figura 7.2a); $2n=48$, composto de $8+22+12+6$, $NF=90$ (Figura 7.2b); $2n=49$, idêntico ao citótipo $2n=48$, mas com a presença de um cromossomo B de tamanho médio do tipo SM em todas as metáfases do indivíduo, $NF=92$ (Figura 7.2c); $2n=50$, composto de $8M+16SM+14ST+12A$, $NF=88$ (Figura 7.2d). A população de Sete Barras, bacia do rio Ribeira de Iguape,

apresentou cariótipo com $2n=48$ cromossomos, composto de $10M+20SM+12ST+6A$, $NF=90$ (Figura 7.2e). As populações de Indaiatuba (bacia do rio Tietê) e Pilar do Sul (bacia do rio Paranapanema) apresentaram cariótipo com $2n=46$ cromossomos, composto de $12M+20SM+10ST+4A$, $NF=88$ (Figura 7.2f e 7.2g, respectivamente). Os citótipos $2n=46$ cromossomos apresentaram pequena diferença em relação ao tamanho relativo do segundo par de cromossomos acrocêntricos, sendo semelhante ao primeiro par de acrocêntricos na população de Salesópolis e de tamanho destacadamente menor nas populações de Indaiatuba e Pilar do Sul.

A impregnação por nitrato de prata evidenciou múltiplos sítios Ag-RON positivos, sendo mais freqüentemente localizado no braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos (Figura 7.2h) em todos os citótipos analisados.

A FISH-18S evidenciou a existência de dois a sete cromossomos marcados na região terminal dos cromossomos, sendo caracterizados por blocos conspícuos em algumas populações até marcações diminutas vistas na população de Sete Barras (Figura 7.3a-g). A FISH-5S evidenciou dois pares de cromossomos portadores sendo um deles localizado na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos e o outro localizado na região pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos, exceto na população de Sete Barras, que apresentou um sítio na região pericentromérica de um par de cromossomos acrocêntricos além dos quatro cromossomos presentes nas demais populações.

Estudos moleculares

Foram analisados 818 pb sendo 218 variáveis e 98 informativos para Parcimônia. A freqüência nucleotídica foi: 0,298 (A); 0,294 (T/U); 0,279 (C); e 0,129 (G). A razão de transições/tranversões foi $k_1=6,91$ (purinas) e $k_2=5,875$ (pirimidinas). O desvio total das

transições/tranversões foi de $R=2,52$. O parâmetro alfa da distribuição gama foi $\alpha=0,5$. As distâncias evolutivas entre e dentro dos indivíduos agrupados por bacia hidrográfica encontram-se na Tabela 7.2.

A medida da saturação das substituições (XIA *et al.*, 2003) mostrou $I_{ss} < I_{ss.c}$ ($p=0.000$), indicando que esta seqüência teve pouca saturação e mostra-se útil na reconstrução filogenética.

Todos os indivíduos que apresentaram seqüências de boa qualidade foram mantidos na análise pela existência de haplótipos que não correspondem a agrupamentos por bacia hidrográfica, ou seja, há haplótipos próximos compartilhados por populações diferentes, dependendo do conjunto de dados analisado. Ainda, foi observado mais de um haplótipo por ponto amostrado. Foi utilizado como grupo externo um indivíduo de *A. mexicanus*.

A árvore consenso de MP (CI=0,648649; RI=0,763636) apresentou valores de *bootstrap* (1000 réplicas) baixos para a maioria dos nós mais externos (Figura 7.4). Apesar disso foi possível identificar quatro clados: A) clado formado exclusivamente por indivíduos da bacia do rio Mogi-Guaçu, de diferentes localidades e fórmulas cariotípicas padrão e variantes; B) clado formado por indivíduos com $2n=48$ cromossomos e formas variantes, com um subclado formado pela população de Salesópolis e outro por exemplares da bacia do rio Mogi-Guaçu, suportados por elevados valores de *bootstrap*; C) clado formado por um subclado com razoável suporte estruturando a população de Angatuba (bacia do rio Paranapanema) com $2n=46$ cromossomos e outro formado por indivíduos de Sete Barras (bacia do Ribeira de Iguape) e um indivíduo de Barrinha (rio Mogi-Guaçu), todos com $2n=48$ cromossomos, mas características cariotípicas distintas; D) clado formado por indivíduos de Salesópolis (rio Tietê) com $2n=46$ cromossomos além de um indivíduo da mesma população com $2n=48$ cromossomos.

A árvore de NJ-MCL é mostrada em duas formas, uma delas em escala e outra apenas com a topologia (Figuras 7.5a e 7.5b, respectivamente) para melhor evidenciar o agrupamento formado por indivíduos pertencentes a diferentes bacias hidrográficas. A população de Salesópolis apresentou dois grupos distintos, um deles com todos os indivíduos de $2n=46$, um indivíduo de $2n=48$ cromossomos e o indivíduo de $2n=50$ cromossomos e o outro com indivíduos de $2n=48$ e $2n=49$ cromossomos. As populações da bacia do rio Mogi-Guaçu não apresentaram estruturação relacionada com citótipos ou com pontos de coleta. As populações de Sete Barras e Angatuba foram agrupadas separadamente.

Discussão

A ocorrência em simpatria de diferentes citótipos de *A. aff. fasciatus* já havia sido detectada em outras ocasiões, particularmente na região de Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu, onde os citótipos padrão $2n=46$ e 48 cromossomos foram encontrados em simpatria com mais cinco citótipos variantes apresentando de 45 a 47 cromossomos (PAZZA *et al.*, 2006). No rio Tibagi, os citótipos padrão $2n=48$ e 50 também foram encontrados em simpatria, além de um possível caso de hibridismo (indivíduo apresentando $2n=49$ cromossomos) (ARTONI *et al.*, 2006). No presente trabalho foram identificados quatro citótipos distintos, todos simpátricos, coletados no rio Tietê, próximo à sua nascente em Salesópolis (SP). Os citótipos padrão $2n=46$, 48 e 50 , cromossomos além de um variante apresentando 49 cromossomos, aparentemente formado pelo cariótipo padrão $2n=48$ acrescido de um cromossomo B (Figura 7.2a, b, c, d). Cromossomos B já foram detectados em *A. aff. fasciatus* de outra população, e são encontrados em algumas outras espécies do gênero (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001), em especial em *A. aff. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004). No gênero *Astyanax* a

ocorrência simpátrica de diferentes citótipos de espécies nominais também é observada em *A. aff. scabripinnis* do rio Ivaí (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2005) e no córrego Tamanduá (MAISTRO *et al.*, 2000), ambos pertencentes à bacia do Alto rio Paraná.

Apesar da diferença macrocariotípica marcante entre estes três citótipos padrão de ocorrência simpátrica observados em Salesópolis (rio Tietê), algumas características compartilhadas podem ser observadas, como a distribuição dos genes ribossômicos 5S e 18S (Figura 7.3a, b, c, d). Notadamente, a outra população estudada na mesma bacia hidrográfica (Indaiatuba/SP) apresentou cariótipo com $2n=46$ cromossomos e mesma fórmula cariotípica (Figura 7.2g). Entretanto, é possível observar a diferença de tamanho relativo entre os dois pares de cromossomos acrocêntricos. Na população de Salesópolis (Figura 7.2a), eles têm tamanho muito similar; na população de Indaiatuba, o par 23 é cerca de 50% do tamanho do par 22 (Figura 7.2g). Esta característica da população de Indaiatuba é compartilhada com outras populações com $2n=46$ cromossomos, como a população proveniente de Pilar do Sul/SP (Figura 7.2f) e as já descritas das bacias dos rios Tietê (ABEL *et al.*, 2006), Mogi-Guaçu (PAZZA *et al.*, 2006), e Paranapanema (PAZZA *et al.*, 2008a). Outra característica compartilhada entre estas populações é a localização do DNA satélite As-51 disperso em muitos cromossomos, ao contrário da população de Salesópolis que apresenta apenas um par de cromossomos portador de tal satélite (PAZZA *et al.*, 2008b; Capítulo VI, neste volume). Estas evidências sugerem que tais diferenças sejam mais do que divergências interpopulacionais, podendo tratar-se de unidades taxonômicas independentes.

Entre os citótipos de $2n=48$ cromossomos, presentes em diferentes bacias hidrográficas, o mais divergente pertence à população de Sete Barras (Ribeira de Iguape) (Figura 7.2e), com fórmula cariotípica bastante diferente daquelas observadas no Alto rio Paraná (PAZZA *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2008b; presente trabalho) e de populações

costeiras no nordeste do Brasil (MEDRADO *et al.*, 2008). Adicionalmente, embora o número cromossômico encontrado seja o mesmo, a população analisada pode divergir na fórmula cariotípica, como observado por MORELLI *et al.* (1983) em outra população da bacia do Ribeira de Iguape.

Além da macroestrutura cariotípica bastante divergente, a distribuição do DNA ribossômico 5S também merece destaque. No gênero *Astyanax* quatro cromossomos portadores desses genes, com a presença de um sítio na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos, é a situação mais freqüente (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004), assim como o observado nas populações dos rios Tietê e Paranapanema neste trabalho (Figura 7.3h). A população de Sete Barras, por sua vez, apresenta seis cromossomos portadores do DNAr 5S, com a presença do cromossomo metacêntrico marcador, uma situação observada apenas em *A. mexicanus* (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007) e nesta população proveniente da bacia do rio Ribeira de Iguape (Figura 7.3i).

O DNAr 18S acompanhou a tendência do gênero de apresentar-se localizado na região terminal de vários cromossomos (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; PAZZA *et al.*, 2006) sendo mais freqüentemente observado um par portador de Regiões Organizadoras de Nucléolo ativas na intérfase precedente. Estas podem ser localizadas através da impregnação por nitrato de prata, e apresentam nestes peixes um padrão de ativação preferencial (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998a; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; PAZZA *et al.*, 2006; Capítulo VIII, neste volume). A população de Sete Barras (Ribeira de Iguape) apresentou distribuição mais divergente do gene ribossômico 18S, com seis sítios diminutos e nenhum bloco expressivo (Figura 7.3e).

A despeito de toda a variação cariotípica observada neste e nos demais estudos, a seqüência do gene mitocondrial da ATPase6/8 mostrou-se pouco variável, sugerindo uma divergência recente para este grupo. Apesar de baixos valores de *bootstrap*, relacionados com a pequena distância genética entre os haplótipos, é possível visualizar alguns agrupamentos interessantes. No filograma de Neighbour-Joining (Figura 7.5) observa-se que tanto a população de Salesópolis quanto do rio Mogi-Guaçu mostrou-se subdividida. Com exceção de um haplótipo compartilhado (no grupo Salesópolis A) os citótipos de $2n=46$ e $2n=48/2n=50$ encontraram-se devidamente estruturados. Também é possível observar neste grupo a maior distância entre o citótipo $2n=50$ e os demais. O mesmo pode ser observado no cladograma de Máxima Parcimônia entre os clados B e D. Neste último é possível observar que o citótipo $2n=50$ de Salesópolis mostrou-se parafilético com relação aos demais, o que está de acordo com a distância genética observada. Com relação aos indivíduos do rio Mogi-Guaçu é possível observar três grupos principais no filograma de Neighbour-Joining (Figura 7.5). O primeiro deles (Mogi-Guaçu A) é composto por exemplares de Cachoeira de Emas com $2n=48$ cromossomos e variantes, além de exemplares de Ouro Fino ($2n=48$ cromossomos). O segundo grupo (Mogi-Guaçu B) é formado por exemplares com $2n=48$ cromossomos de três locais diferentes (Barrinha, Cachoeira de Emas e Araras), exemplares com $2n=46$ cromossomos de Barrinha e Cachoeira de Emas e indivíduos variantes de Cachoeira de Emas. O terceiro grupo (Mogi-Guaçu C) é formado principalmente por exemplares com $2n=46$ cromossomos, exceto aquele proveniente da população de Araras ($2n=48$). Estes dados são congruentes com os observados através de marcadores moleculares RAPD e ISSR (PAZZA *et al.*, 2007), apesar de os marcadores nucleares terem demonstrado maiores valores de distância genética entre as populações/citótipos. PAZZA *et al.* (2006) sugeriram que o citótipo $2n=46$ cromossomos presente no rio Mogi-Guaçu possa ser um invasor

proveniente da bacia do rio Tietê, reforçado pela distância genética estimada pelos marcadores moleculares nucleares entre os dois citótipos apesar do fluxo gênico (PAZZA *et al.*, 2007), que pode ser o responsável pelos citótipos variantes, e pelo compartilhamento de haplótipos evidenciado através de RFLP (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002) e de seqüenciamento de mtDNA .

A estruturação da população de Angatuba (Paranapanema), especialmente com relação aos exemplares de Araras, observada tanto na árvore de MP quanto na de NJ-MCL, é congruente com o observado a partir de características morfométricas (PAZZA *et al.*, 2008b). Isso ocorre apesar da pequena distância genética entre estas populações (Tabela 7.2), e da similaridade desta com os dados cariotípicos do citótipo padrão $2n=46$ observado em Cachoeira de Emas (PAZZA *et al.*, 2006).

Apesar da grande divergência em relação ao cariótipo e à distribuição dos sítios do gene ribossômico 5S (Figura 7.3), as populações de Ribeira de Iguape e Angatuba apresentam baixa distância genética (Tabela 7.2) e estão agrupadas no Clado C da árvore de MP (Figura 7.4).

Por fim, é interessante observar que o Clado B da árvore de MP é composto por exemplares com citótipo $2n=48$ cromossomos dos rios Tietê e Mogi-Guaçu além de indivíduos variantes, embora formem subclados distintos que refletem as diferenças cariotípicas, especialmente em relação à distribuição do DNA satélite As-51 (PAZZA *et al.*, 2008a; Capítulo VI, neste volume), uma vez que a população de Salesópolis possui apenas um par de cromossomos portadores desta seqüência enquanto a população do rio Mogi-Guaçu apresenta cerca de sete pares.

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para elucidar a extensão do grupo *A. aff. fasciatus*, estabelecido após revisão de EIGENMANN (1921). Através de análises morfológicas algumas subespécies já foram reavaliadas e elevadas ao status de espécie,

como *A. parahybae* (MELO, 2001) e *A. henseli* (MELO e BUCKUP, 2006). Análises morfométricas permitiram observar princípios de diferenciação morfológica entre populações diferentes com citótipos variados na bacia do rio Tibagi (ARTONI *et al.*, 2006), entre os dois citótipos padrão $2n=46$ (Angatuba, bacia do rio Paranapanema) e $2n=48$ (Araras, bacia do rio Mogi-Guaçu) (PAZZA *et al.*, 2008b) e entre diferentes populações com $2n=48$ cromossomos (MEDRADO *et al.*, 2008). Análises de marcadores moleculares mostraram a presença de haplótipos de RFLP compartilhados entre populações do rio Tietê e do rio Mogi-Guaçu (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002), enquanto o marcador ISSR demonstrou uma discreta estruturação entre citótipos padrão do rio Mogi-Guaçu, embora com certo fluxo gênico entre elas (PAZZA *et al.*, 2007).

Paralelamente a estes estudos estão discussões sobre os diferentes métodos de delimitar uma espécie, baseados em diferentes conceitos de espécie (SITES JR. e MARSHALL, 2004), e a preocupação com o aumento no número de espécies e sua influência em práticas conservacionistas, uma vez que muitos dos planejamentos conservacionistas dependem do número de espécies, riqueza refletida, endemismo, diversidade, ameaça e outros atributos que podem ser comparados entre diferentes localidades ou taxa (ISAAC *et al.*, 2004).

Seqüências de DNA mitocondrial têm sido utilizadas para inferir filogenias e padrões filogeográficos para as mais diversas espécies de peixes (BERMINGHAM e MARTIN, 1998; INOUE *et al.*, 2001; SIVASUNDAR *et al.*, 2001; PERDICES *et al.*, 2002; KON *et al.*, 2007; entre outros). VÖLKER *et al.* (2007) verificaram uma baixa diferenciação haplotípica associada a elevada diferenciação cariotípica em *Chromaphyosemion bivittatum* (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), semelhante ao observado entre as populações de *A. aff. fasciatus*. Os dados cariotípicos aqui apresentados, somados aos da literatura, bem como a maior distância genética já observada entre diferentes citótipos através de

marcadores nucleares, sugerem que a taxa de mutação cromossômica seja mais elevada neste grupo do que a variação mitocondrial, talvez impulsionada por introgressões causadas por contato secundário e que minimizam as diferenças devido às características do genoma mitocondrial (ausência de recombinação e transferência materna).

Assim, sugere-se que estudos mais abrangentes e com amostragem mais ampla devam ser realizados baseando-se nos dados cariotípicos, na análise de marcadores moleculares nucleares, bem como o seqüenciamento de regiões variáveis nucleares, a fim de melhor avaliar a história evolutiva deste grupo.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

Tabela 7.1 – Populações de *A. aff. fasciatus* amostradas no presente trabalho.

Proveniência/ Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula Cariotípica	Nome do Ponto (pop)	Coordenadas
	46	12M+20SM+10ST+4A		
^Δ Salesópolis/SP	48	8M+22SM+12ST+6A	sa	S 23°31'23"
Alto rio Tietê	49	9M+22SM+12ST+6A		Wo 45°51'42"
	50	8M+16SM+14ST+12A		
^Δ Pilar do Sul/SP Paranapanema	46	12M+20SM+10ST+4A	ps	S 23°48'45" Wo 47°42'30"
[§] Araras/SP Mogi-Guaçu/ Paraná	48	8M+22SM+12ST+6A	ar	S 22°22'59" Wo 47°25'49"
[§] Angatuba/SP Paranapanema	46	12M+20SM+10ST+4A	ag	S 23°32'59" Wo 48°30'44"
^Δ Sete Barras/SP Ribeira de Iguape	48	10M+20SM+12ST+6A	ad	S 24°18'39" Wo 47°53'30"
^{Δ*} Indaiatuba/SP Médio rio Tietê	46	12M+20SM+10ST+4A	--	S 23°05'39" Wo 47°15'37"
^ε Ouro Fino/MG Mogi-Guaçu/ Paraná	48	8M+22SM+12ST+6A	of	S 22°16'58" Wo 46°22'08"
	45	12M+20SM+10ST+3A		
^ε Cachoeiras de Emas/SP	46	12M+20SM+10ST+4A	ce	S 21°59'45"
Mogi-Guaçu/ Paraná	47	quatro diferentes tipos		Wo 47°25'33"
	48	8M+22SM+12ST+6A		
^ε Barrinha/SP	46	12M+20SM+10ST+4A	ba	S 21°11'38"
Mogi-Guaçu/ Paraná	48	8M+22SM+12ST+6A		Wo 48°09'50"

^ΔDados citogenéticos apresentados neste trabalho; ^{*}Ausência de dados de seqüenciamento. Populações previamente estudadas por: ^εPAZZA *et al.*, 2006; [§]PAZZA *et al.*, 2008b.

Tabela 7.2 - Distâncias genéticas entre populações de *A. aff. fasciatus*, computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL).

	1	2	3	4	5	6	7	d (TN)
1								0,02238
2	0,02130							0,01577
3	0,01753	0,01143						0,00159
4	0,01729	0,01204	0,01050					0,00857
5	0,01680	0,01049	0,00995	0,00642				0,00532
6	0,01495	0,01204	0,00884	0,00721	0,00747			0
7	0,01833	0,01506	0,01213	0,01047	0,01074	0,00638		0
8	0,24729	0,25755	0,25381	0,24835	0,24505	0,24817	0,24182	n/c

1 - Salesópolis/SP; 2 - Cachoeira de Emas/SP; 3 - Ouro Fino/MG; 4 - Barrinha/SP; 5 - Araras/SP; 6 - rio Paranapanema; 7 - rio Ribeira de Iguape; 8 - Grupo externo.

d(TN) = distância intrapopulacional estimada pelo método de TAMURA e NEI (1993); n/c = não computado.

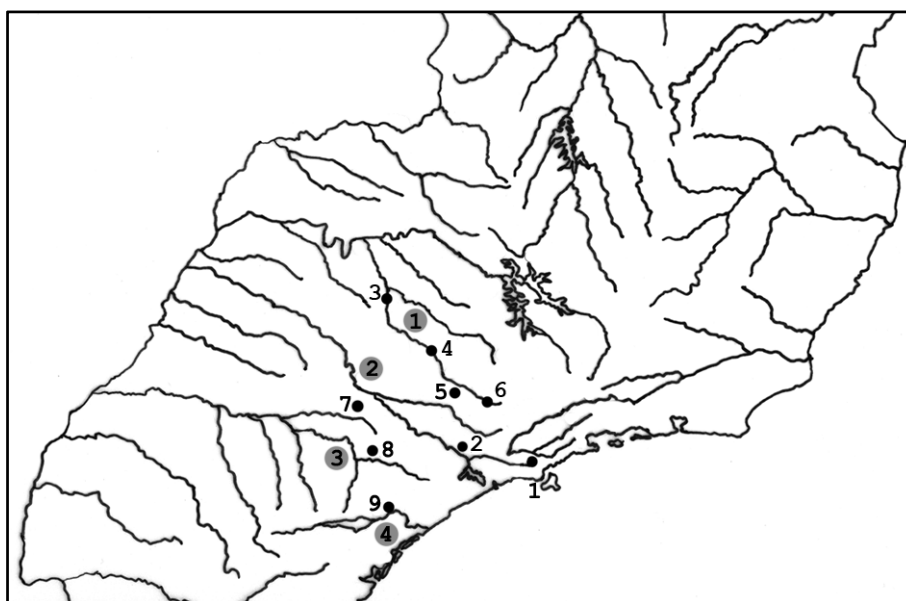


Figura 7.1 – Mapa indicando as populações de *A. aff. fasciatus* sob estudo. Algarismos dentro dos círculos indicam algumas das principais bacias hidrográficas do sudeste brasileiro: 1) rio Mogi-Guaçu; 2) rio Tietê; 3) rio Paranapanema; 4) rio Ribeira de Iguape. Demais algarismos indicam os pontos de coleta: 1) Salesópolis/SP; 2) Indaiatuba/SP; 3) Barrinha/SP; 4) Cachoeira de Emas/SP; 5) Araras/SP; 6) Ouro Fino/MG; 7) Angatuba/SP; 8) Pilar do Sul/SP; 9) Sete Barras/SP.

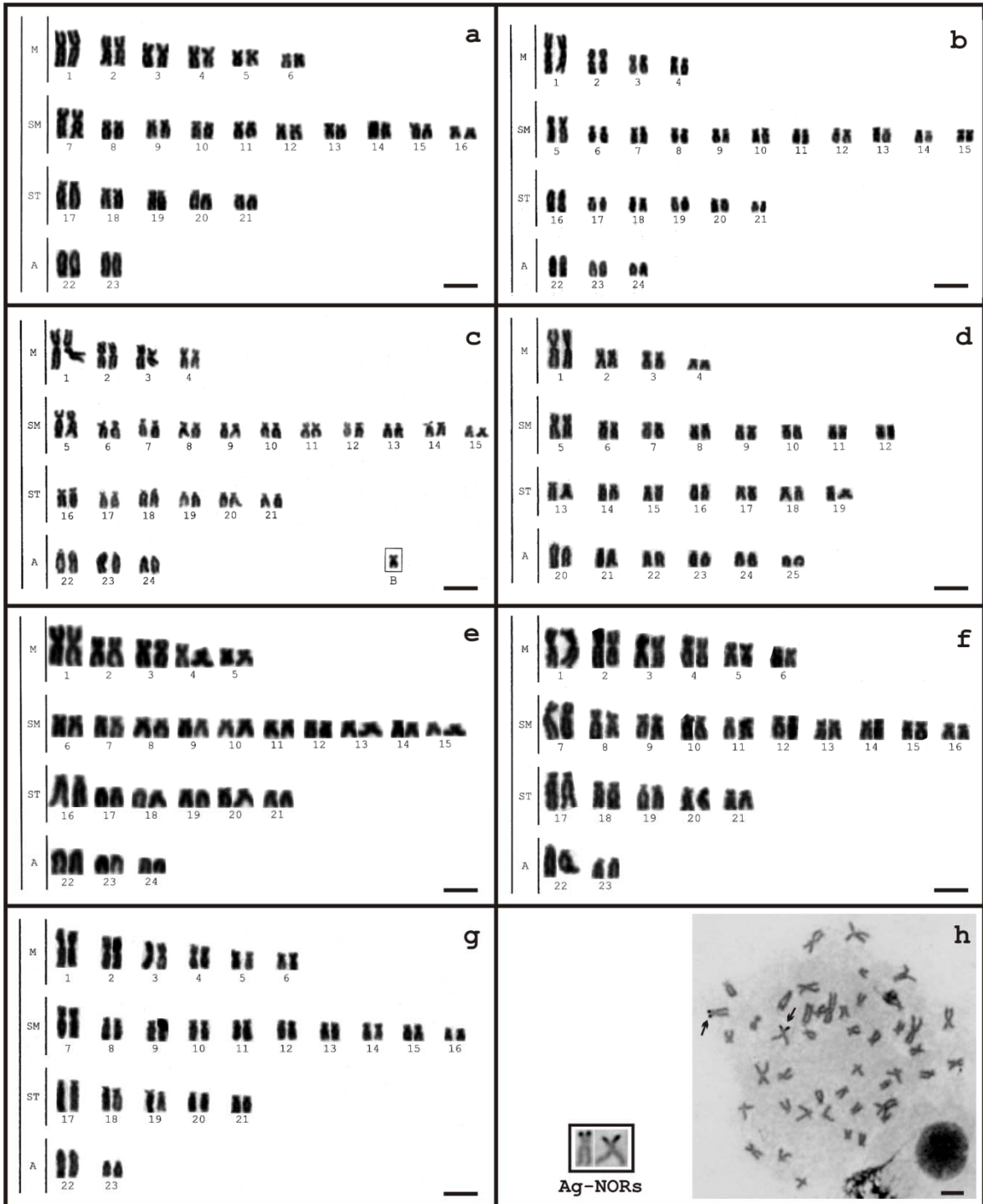


Figura 7.2 – Cariótipos corados em Giemsa e Ag-RONs de *A. aff. fasciatus*. Exemplos provenientes de Salesópolis/SP – bacia do rio Tietê [2n=46 (a); 2n=48 (b); 2n=49 (c); 2n=50 (d)]; Sete Barras/SP – bacia do rio Ribeira de Iguape (e); Pilar do Sul/SP - bacia do rio Paranapanema (f); Indaiatuba/SP – bacia do rio Tietê (g); Em (h) Ag-RONs mostrando sítios de ativação preferencial. Barras=5µm.

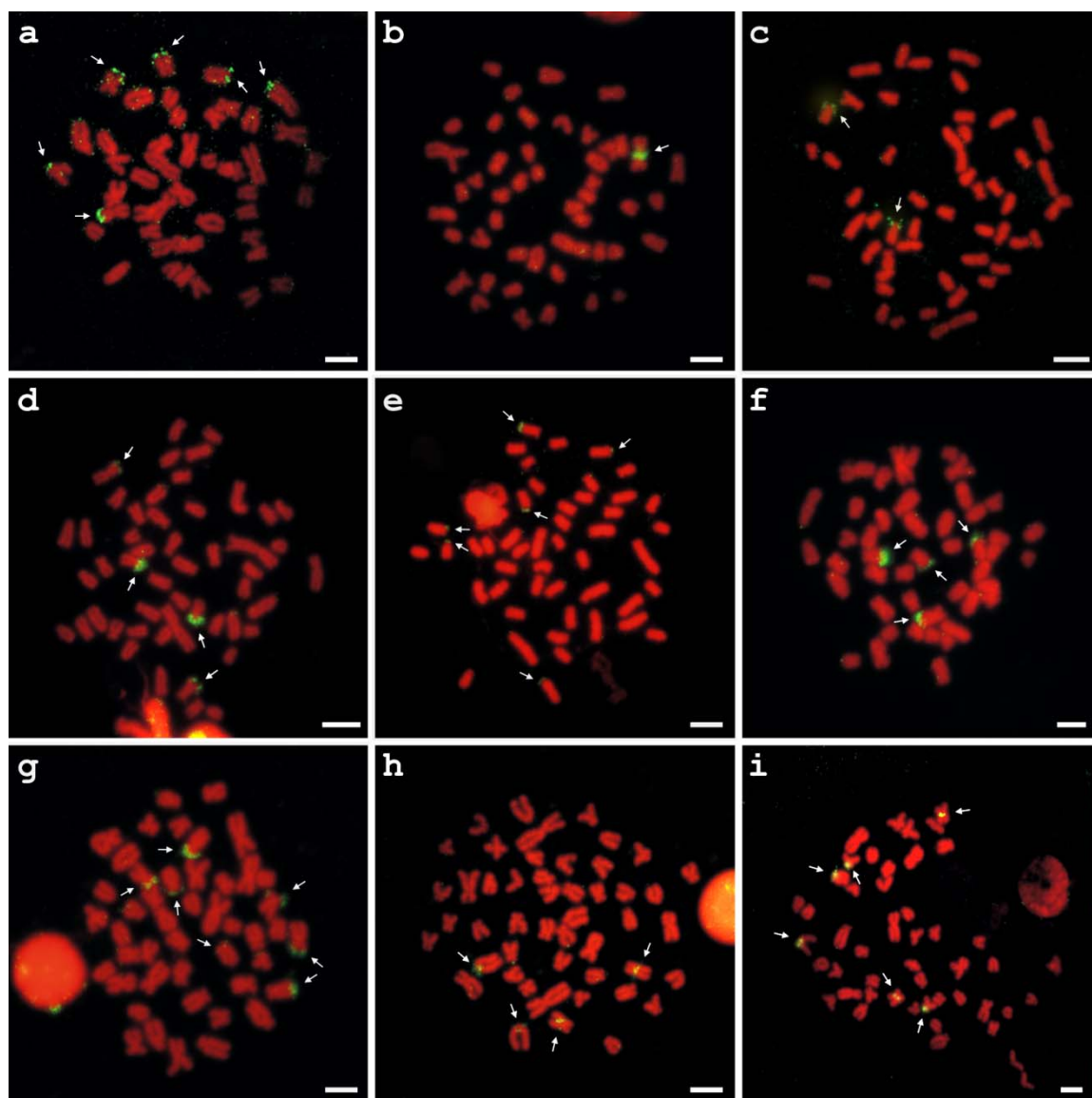


Figura 7.3 – Metáfases de *A. aff. fasciatus* mostrando sítios de rDNA 18S (a-g) e 5S (h-i) indicados pelas setas. Padrão do rDNA 18S de exemplares provenientes de Salesópolis/SP [$2n=46$ (a); $2n=48$ (b); $2n=49$ (c); $2n=50$ (d)]; Sete Barras/SP (e); Pilar do Sul/SP (f); Indaiatuba/SP (g); Padrão do rDNA 5S observado nos exemplares provenientes de Salesópolis/SP, Indaiatuba/SP e Pilar do Sul/SP (h); Padrão do rDNA 5S observado nos exemplares provenientes de Sete

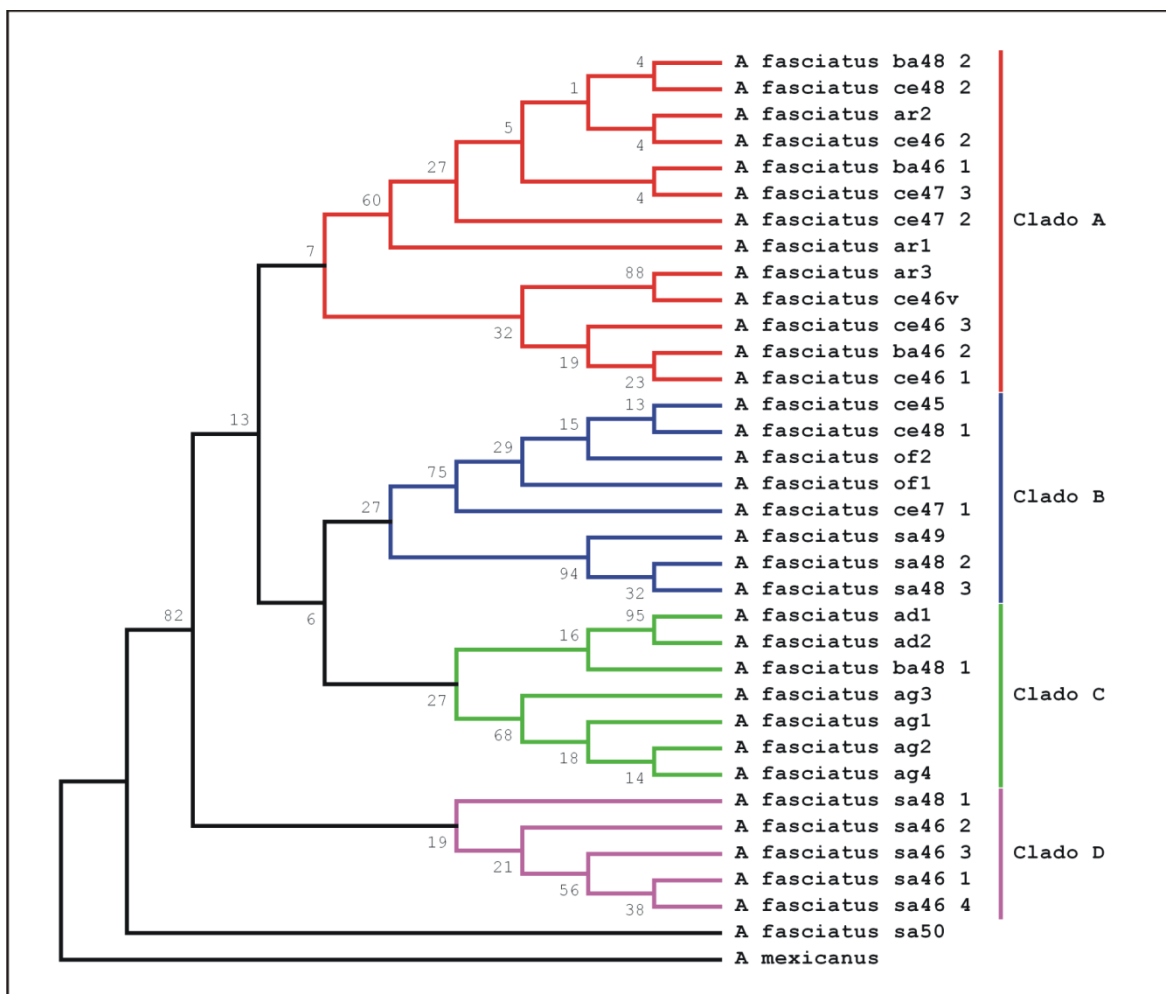
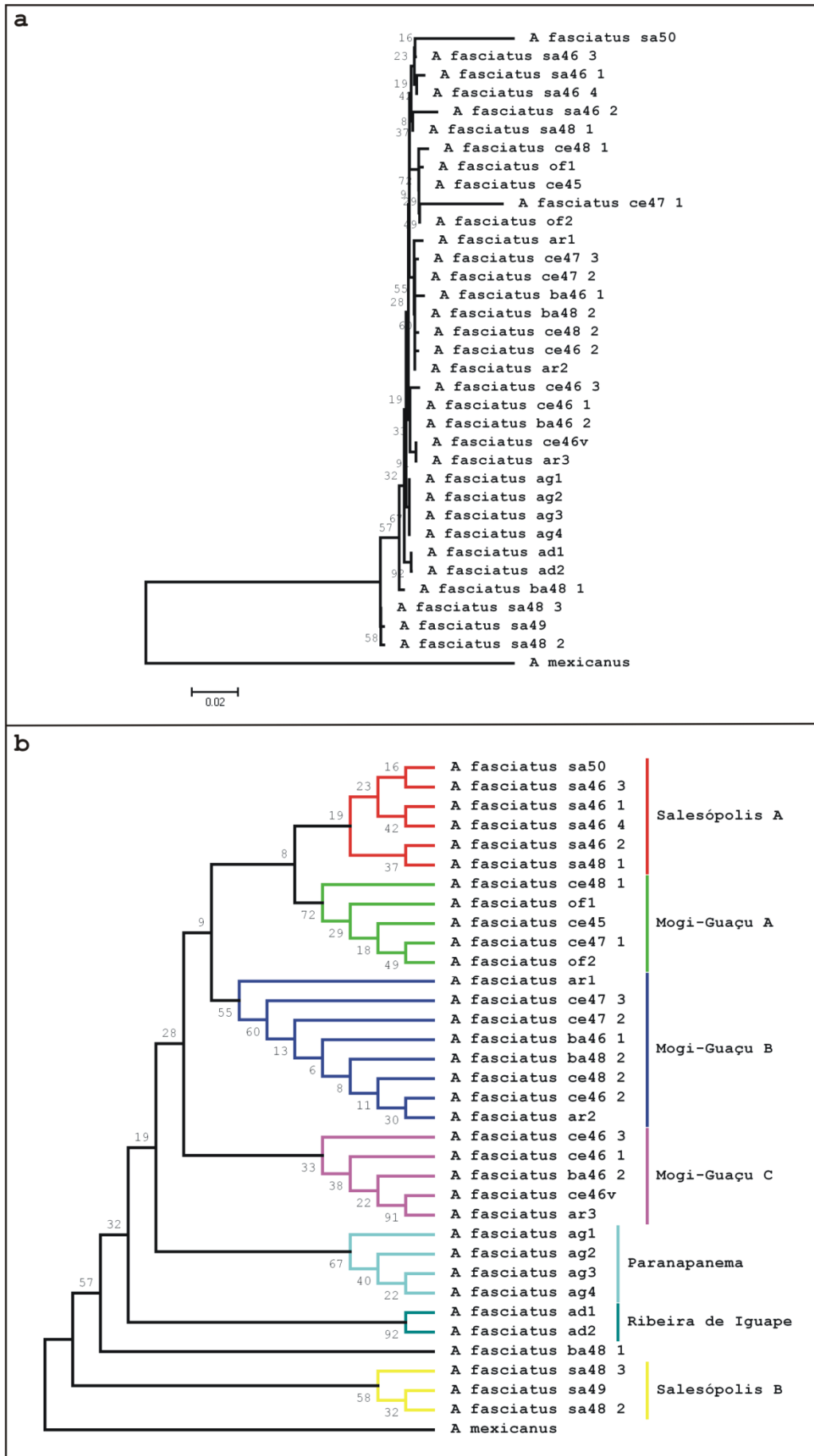
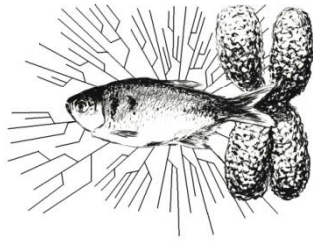


Figura 7.4 - Árvore consenso de 314 mais parcimoniosas, construída pelo método de máxima parcimônia (MP) (número de passos = 244), mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 35 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,648649; Índice de Retenção (IR) = 0,763636. Os Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os *gaps* foram tratados como *missing data*.

Figura 7.5 (pg. 115)- Árvores inferidas pelo método de Neighbor-Joining (NJ). a) Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. b) Árvore mostrando apenas topologia. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,5$). Os *gaps* foram tratados como *missing data* e eliminados nas comparações par-a-par (*Pairwise deletion option*). A soma do comprimento dos ramos foi de 0,408.





Capítulo 8

Capítulo VIII

Citogenética comparativa e filogeografia molecular no grupo *Astyanax altiparanae-bimaculatus* (Teleostei, Characidae)¹

Abstract

Astyanax comprises small characin fish of the Neotropical region. Within this genus, the so-called “yellow-tailed characins” compose one of the most widely distributed groups. Two species, *A. altiparanae* and *A. bimaculatus*, are commonly found in several Brazilian hydrographic basins and share evolutionary relationships, as shown by morphological and genetic studies. In the present work, chromosomal data in specimens of *A. altiparanae* and *A. aff bimaculatus* from four distinct hydrographic basins from the states of São Paulo (Upper Tietê River, Paranapanema, Ribeira de Iguape) and Rio de Janeiro (Guapimirim). All specimens presented 50 chromosomes, organized into three karyotype formulae. Differences related to the distribution of both constitutive heterochromatin and sequences of a satellite DNA present in some *Astyanax* species were observed though. Although all populations presented single Ag-NORs, different numbers of 18S rDNA sites were identified. The four populations showed a conservative chromosomal location of the 5S rRNA gene. The sequencing of two regions, comprising 1.314 bp, of the mtDNA, of eight populations in both species groups, from three major hydrographic basins provided a preliminary scenario about the phylogeographic relationships in these fish, suggesting a correlation between chromosomal (nuclear) and molecular (mitochondrial) data in these characins. Besides the four populations included in the chromosomal analyses, the molecular

¹ KAVALCO KF, PAZZA R, BRANDÃO KO, GARCIA C, ALMEIDA-TOLEDO LF. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae-bimaculatus* (Teleostei, Characidae) (em preparação).

studies also comprised specimens from Middle and Lower Tietê and two additional collection sites in the Paranapanema and Ribeira de Iguape rivers.

Resumo

Os *Astyanax* são pequenos caracídeos da região Neotropical. Nesse gênero, um dos grupos mais amplamente distribuídos é o que abrange os peixes identificados como “lambaris de rabo amarelo”. Duas espécies, *A. altiparanae* e *A. bimaculatus*, são comumente encontrados em várias bacias brasileiras e apresentam relações evolutivas evidenciadas por estudos morfológicos e genéticos. No presente trabalho são apresentados dados cromossômicos de exemplares de *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* provenientes de quatro diferentes bacias hidrográficas dos Estados de São Paulo (Alto rio Tietê, Paranapanema, Ribeira de Iguape) e Rio de Janeiro (Guapimirim). Todos os exemplares apresentaram 50 cromossomos, organizados em três diferentes fórmulas cariotípicas. Também foram identificadas diferenças quanto à distribuição da heterocromatina constitutiva e de seqüências de um tipo de DNA satélite que ocorre em algumas espécies de *Astyanax*. Embora todas as populações tenham apresentado Ag-RONs simples, diferentes números de sítios de rDNA 18S foram localizados. As quatro populações apresentaram localização cromossômica conservada para o gene de rDNA 5S. O seqüenciamento de duas regiões, compreendendo 1.314 pb do mtDNA, de oito populações dos dois grupos de espécies, provenientes de três grandes bacias hidrográficas, pôde fornecer um panorama preliminar sobre as relações filogeográficas desses peixes, e estabelecer uma correlação entre dados cromossômicos (nucleares) e moleculares (mitocondriais) nesses lambaris. Além das quatro populações com estudos cromossômicos, foram

incluídos nas análises moleculares exemplares provenientes do Médio e Baixo Tietê, e de dois pontos adicionais nos rios Paranapanema e Ribeira de Iguape.

Introdução

O gênero *Astyanax*, e em especial os lambaris que compõem o grupo *A. altiparanae-bimaculatus* (conhecidos popularmente por “lambaris do rabo amarelo”), é composto por peixes com grande capacidade de se ajustar a condições ambientais diferenciadas e com amplo espectro de interação nas assembléias de peixes, devido a sua estrutura e densidade populacional (ORSI *et al.*, 2004). O reflexo disso é a ampla distribuição geográfica do grupo, que se estende por praticamente toda a região Neotropical (EIGENMANN, 1921) e é composto por cerca de 100 espécies consideradas válidas atualmente (LIMA *et al.*, 2003). Entretanto, esse número está subestimado, uma vez que várias novas espécies têm sido descritas (HALUCH e ABILHOA, 2005; BERTACO e LUCINDA, 2005; BERTACO e LUCENA, 2006; MELO e BUCKUP, 2006; VARI e CASTRO, 2007), seja por constituírem táxons ainda desconhecidos ou por fazerem parte de grupos maiores, mas com diferenciação morfológica, e que têm passado por revisões taxonômicas. *A. altiparane*, por exemplo, é uma designação recente, dada às populações do Alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

Segundo GARUTTI (1995) o gênero *Astyanax* tem uma distribuição estruturada, sugerindo um grande nível de endemismo: mesmo dentro de uma mesma bacia hidrográfica há múltiplas formas com distribuição geográfica relativamente restrita. Em vista disso, supõe-se que os lambaris não formem um grupo uniforme, havendo variações de população para população, provavelmente por este grupo habitar uma

grande variedade de microambientes (GARUTTI e BRITSKI, 2000), embora seja mais bem sucedido em habitats melhor preservados (ORSI *et al.*, 2004). Portanto, espera-se que populações destes lambaris apresentem estruturação genética ao longo de um rio (LEUZZI *et al.*, 2004), embora estudos anteriores tenham indicado baixa variabilidade entre populações dos rios Paraná e Iguazu, devendo essas ser mantidas no mesmo grupo, sob uma mesma denominação específica (PRIOLI *et al.*, 2002).

Essa estruturação populacional foi previamente inferida para os *Astyanax* do rabo amarelo por meio de marcadores genéticos nucleares e mitocondriais, além dos estudos cromossômicos. Marcadores de RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) identificaram haplótipos população-específicos para oito de nove populações de *A. altiparanae* analisadas, dados também verificados para outras espécies do gênero *Astyanax* (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002).

De forma semelhante, os estudos cromossômicos mostram variação interpopulacional nas fórmulas cariotípicas e números fundamentais, e em alguns casos, cariótipos população-específicos (Tabela 8.1). Nas aproximadamente 15 populações de *A. altiparanae* estudadas, é observado o mesmo número diplóide ($2n=50$ cromossomos), com pequenas variações com relação às fórmulas cromossômicas, embora haja manutenção de um maior número de cromossomos de dois braços, em sua maioria, submetacêntricos (PAZZA e KAVALCO, 2007).

PAZZA e KAVALCO (2007) consideram que a evolução cariotípica no gênero *Astyanax* seja devida, principalmente, à existência de rearranjos como inversões cromossômicas, que garantem a manutenção do número diplóide, embora as fórmulas cariotípicas variem, e isso é facilmente verificado no grupo *A. altiparanae*. Em vista dessa variação cariotípica foi proposta a existência de um complexo de espécies,

que estariam sob a denominação comum "*A. altiparane*" (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). Entretanto, por se tratar de formas estruturadas e facilmente diferenciadas por parâmetros biológicos (estudos cariotípicos) sugere-se que os *A. altiparanae* possam ser tratados como um grupo de espécies crípticas (Capítulo IV, neste volume).

Apesar do importante papel das inversões cromossômicas na evolução cariotípica do grupo, já foram identificados rearranjos Robertsonianos nos *Astyanax*, os quais são sugeridos para explicar o padrão homeólogo de bandamentos-R nos cromossomos de *A. altiparanae* ($2n=50$) e *A. schubarti* ($2n=36$) (DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2005). Os cromossomos das duas espécies são claramente relacionados, apesar da expressiva diferença entre seus números diplóides.

Embora estudos prévios tenham caracterizado várias populações de *A. altiparanae* residentes do Alto rio Paraná, ainda são ausentes as análises de exemplares provenientes da bacia dos rios Costeiros, bem como a abordagem filogeográfica de diferentes bacias hidrográficas. Além disso, um panorama sobre a correspondência dos dados cromossômicos e moleculares pode ser fornecido se analisados os conjuntos de dados para as mesmas populações.

No presente trabalho apresentamos dados citogenéticos de quatro diferentes populações do grupo dos lambaris de rabo amarelo, sendo duas de *A. altiparanae* dos rios Tietê e Paranapanema, e duas de *A. aff. bimaculatus*, provenientes da bacia dos rios Ribeira de Iguape e Guapimirim, ambos constituintes do sistema de drenagem do Leste brasileiro. Adicionalmente, o padrão filogeográfico destas populações e de mais quatro ao longo do sistema hidrográfico do Alto rio Paraná foi inferido, através do seqüenciamento de duas regiões do genoma mitocondrial.

Material e Métodos

Os exemplares de *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* analisados no presente trabalho são provenientes de oito diferentes pontos, como identificado na Figura 8.1 e na Tabela 8.2. Os exemplares foram coletados no período de maio de 2004 a julho de 2007 e depois dos procedimentos citogenéticos e da retirada de tecido para a extração do DNA foram fixados em formol 10% e mantidos em etanol 70%. Esses foram identificados e depositados na coleção ictiológica do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS/Brasil.

Estudos cromossômicos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos conforme GOLD *et al.* (1990). A coloração por nitrato de prata (Ag-RON) foi realizada conforme KAVALCO e PAZZA (2004). O bandamento C seguiu a metodologia descrita por SUMNER (1972). A localização direta dos cístrons ribossômicos foi feita através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL *et al.*, 1986; PAZZA *et al.*, 2006), com sondas de rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI JR., 2004) e 5S (MARTINS e GALETTI JR., 1999). Adicionalmente, foi aplicada a FISH, usando como sonda um DNA satélite (As-51) isolado a partir de *A. scabripinnis* (MESTRINER *et al.*, 2000).

As preparações cromossômicas foram analisadas com microscópio ótico e capturadas (com 5Mp de resolução) com o sistema de análise de imagens CoolSnap Pro e o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). A classificação dos tipos cromossômicos foi realizada de acordo com LEVAN *et al.* (1964) e levou em consideração a razão de braços: M-metacêntrico (RB=1,00-1,70), SM-submetacêntrico

(RB=1,71-3,00), ST-subtelocêntrico (RB=3,01-7,00) e A-acrocêntrico (RB maior que 7,00).

Seqüenciamento e análise do DNA mitocondrial

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Wizard (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA foi quantificado utilizando-se gel de agarose e Ladder Low Mass (Invitrogen) e diluído em solução de uso com concentração de 10 ng/μL.

Foram utilizados cinco indivíduos representativos de cada ponto amostrado, quando possível. Optou-se pela utilização de dois segmentos mitocondriais, totalizando aproximadamente 1.314 pb. Os seguintes pares de primers foram utilizados:

- Met-L4437 (5'-AAGCTTTCGGGCCCATACC-3') + DN2-H4980 (5'-ATTTTTTCGTAGTTGGGTTTGRTT-3') (MACEY *et al.*, 1997), que geram fragmentos de cerca de 550pb referentes às seqüências parciais do RNA trasportador da metionina (tRNA^{MET}) e da subunidade 2 do gene da NADH-desidrogenase (ND2).
- ATP8.2-L8331 (5'-AAAGCRTTRGCCTTTTAAAGC-3') + CO3.2-H9236 (5'-GTTAGTGGTCAGGGCTTGGRTC-3') (SIVASUNDAR *et al.*, 2001), que amplificam um segmento de aproximadamente 910pb, correspondente às seqüências integrais das subunidades 6 e 8 do gene da ATPase e à seqüência parcial da subunidade 3 do gene da citocromo-oxidase (CO3).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, perfazendo um volume total de 25 μL, contendo 15 ng de DNA molde, Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 μM de cada *primer*, 0.1 mM de cada dNTP e 2.5 U *Taq*-polimerase. As condições da reação foram:

desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, hibridação a 56°C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 minutos a 72°C e de um passo de extensão final por 10 minutos a 72°C (PRIOLI *et al.*, 2002). Após checagem da amplificação via gel de agarose 1%, parte dos produtos de PCR foi purificada usando-se o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up – Invitrogen, e parte serviu diretamente de molde para as reações de sequenciamento. Estas foram realizadas utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 10 ng de DNA molde 5 pmol de cada primer foram adicionados em cada reação de seqüenciamento. As amostras foram submetidas a 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C e precipitadas para posterior seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o programa Chromas Lite v2.01, e verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa “Blastn”, confirmando sua similaridade com seqüências mitocondriais de outros peixes. Em seguida as seqüências de DNA foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994) pelo software Mega v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007), utilizando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos para abertura de *gaps* (20) e extensão de *gaps* (6,66).

Buscando evitar artefatos na reconstrução filogenética, as seqüências que não se mostraram com alta qualidade foram retiradas da análise, tanto na análise das matrizes de dados para cada gene quanto na análise da matriz de dados concatenados (Tabela 8.2).

A verificação do nível de saturação das substituições nas seqüências analisadas foi realizada com o auxílio do programa DAMBE v5.0.16, através do algoritmo de Xia *et al.* (2003). O valor do parâmetro α da distribuição gama utilizado para os cálculos de distância foi estimado pelo programa PAUP* v4.0 (SWOFFORD, 2001), através do modelo de substituição de TAMURA e NEI (1993).

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007), utilizando-se o método da máxima parcimônia com o algoritmo CNI (NEI e KUMAR, 2000) e calculados os índices de retenção, de consistência e de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) (1000 réplicas); as árvores de distância de Neighbour-Joining foram obtidas através do método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) (TAMURA *et al.*, 2004), através do modelo de substituição de TAMURA e NEI (1993), no qual as taxas dos dois tipos de substituições (entre purinas e entre pirimidinas) são consideradas separadamente levando em consideração as freqüências desiguais dos quatro nucleotídeos; o padrão de substituição dos nucleotídeos foram estimados pelo método da MCL através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007). Para o estabelecimento de comparações com a literatura foi estimada distância p , utilizando-se para tal o programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007).

Os dados estatísticos foram obtidos com o auxílio dos programas DAMBE v5.0.16, DNAsp v4.50 (ROZAS *et al.*, 2003) e MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007).

Resultados

Análises cromossômicas

Todas as populações apresentaram $2n=50$ cromossomos, porém três citótipos foram observados, não estando relacionados aos sexos dos indivíduos. As populações de *A. altiparanae* puderam ser caracterizadas por citótipos específicos para cada bacia hidrográfica. A população do Alto Tietê (Salesópolis/SP) apresentou $8M+20SM+10ST+12A$ (Figura 8.2a), enquanto a população do rio Paranapanema apresentou fórmula cariotípica composta por $8M+22SM+14ST+6A$ (Figura 8.2b). As duas populações de *A. aff. bimaculatus* apresentaram a mesma composição cariotípica, $8M+24SM+12ST+6A$ (Figura 8.2c, d). Pequenas diferenças na simetria dos cariótipos entre as duas populações da bacia dos Rios Costeiros puderam ser identificadas. Esta variação refere-se aos tamanhos diferentes, embora o tipo cromossômico seja o mesmo, de alguns cromossomos que, provavelmente, seriam homeólogos. Por exemplo, pode-se verificar a expressiva diferença de tamanho dos pares A 23, 24 e 25 entre as populações provenientes de Sete Barras/SP e Cachoeiras de Macacu/RJ (Figura 8.2c, d).

A impregnação por nitrato de prata permitiu a identificação de Ag-RONs simples, localizadas na porção terminal dos braços longos ou curtos de cromossomos ST-A (Figura 8.3a, d, g). A FISH-18S identificou um mínimo de duas (Figura 8.3k) e um máximo de quatro marcações (Figura 8.3e), todas localizadas na porção terminal em cromossomos ST-A, com exceção de um sítio em um dos cromossomos do primeiro par M da população de Pilar do Sul/SP (Figura 8.2e). A FISH-5S identificou em todas as populações dois sítios desse rDNA, localizados intersticialmente em um cromossomo M-SM (Figura 8.3c, f, i, l).

As populações de Salesópolis/SP e Pilar do Sul/SP apresentaram poucos blocos heterocromáticos localizados em posição terminal e vários blocos localizados em posição intersticial nos cromossomos (Figura 8.4a, c). Já nas populações de *A. aff. bimaculatus* provenientes de Cachoeiras de Macacu/RJ e Sete Barras/SP, a heterocromatina foi identificada preferencialmente nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 8.4e, g).

A hibridação com a sonda de satDNA As-51 mostrou regiões de homologia com os cromossomos do complemento de quatro das cinco populações estudadas, estando ausentes as marcações no complemento cromossômico dos exemplares de Sete Barras/SP (Figura 8.4f). Os exemplares de Salesópolis/SP e Cachoeiras de Macacu/RJ apresentaram apenas um par SM marcado em seu braço curto (Figura 8.4b, h). Os exemplares de Pilar do Sul/SP apresentaram marcações terminais sutis em cinco cromossomos, inclusive em um dos cromossomos do maior par M (Figura 8.4d).

Estudos moleculares

Foram analisados 1.314 pb, dos quais 373 mostraram-se variáveis e 124 foram informativos para Parcimônia. A região do gene ND2 contribuiu com 554 sítios, sendo 161 variáveis e 57 informativos. A região das subunidades 6 e 8 do gene da ATPase contribuiu com 854 sítios, sendo 218 variáveis e 98 informativos. Nos dados concatenados foram observadas 36 *InDels* e 15 diferentes haplótipos ($H_d=0,99$). As frequências nucleotídicas dos dados concatenados foram: 0,288 (A); 0,289 (T/U); 0,276 (C); e 0,147 (G). A razão de transições/transversões foi $k_1=10,847$ (purinas) e $k_2=6,009$ (pirimidinas). O desvio total das transições/transversões foi de $R=3,257$. O

parâmetro alfa da distribuição gama foi $\alpha=0,311$. As distâncias evolutivas entre e dentro dos indivíduos agrupados por bacia hidrográfica encontram-se na Tabela 8.3.

A plotagem do número de transições e transversões versus a distância genética revelou saturação apenas da seqüência do gene da ATPase quando analisada separadamente. A plotagem dos dados para o gene da ND2 e dos dados concatenados mostraram $I_{ss} < I_{ss.c}$ (pouca saturação), indicando que são úteis na reconstrução filogenética.

Todos os indivíduos que apresentaram seqüências de boa qualidade foram mantidos na análise pela existência de haplótipos que não correspondem a agrupamentos por bacia hidrográfica, ou seja, há haplótipos próximos compartilhados por populações diferentes, dependendo do conjunto de dados analisado. Ainda, foi observado mais de um haplótipo por ponto amostrado. Foi utilizado como grupo externo um indivíduo de *A. mexicanus*.

As árvores evolutivas obtidas indicam que esse grupo de *Astyanax* seria monofilético e que dois clados principais são formados, um compartilhando as linhagens de *A. altiparanae* e outro em que figuram os haplótipos de *A. aff. bimaculatus* (Figuras 8.5 e 8.6). As árvores de NJ-MCL para cada região em separado recuperaram topologia congruente com a das árvores de MP e, portanto, foram omitidas. Ainda, com relação ao grupo externo utilizado nas análises (*A. mexicanus*), o grupo dos “lambaris de rabo amarelo” compartilha como característica apomórfica a presença de apenas um par cromossômico portando o rDNA 5S.

Uma possível parafilia dos *A. altiparanae* do rio Tietê, que compartilha haplótipos agrupados com os haplótipos provenientes da bacia do Paranapanema, foi indicada pela análise dos dados da região ND2 e manteve-se na árvore gerada pela

análise das duas regiões seqüenciadas (Figuras 8.5a e 8.6). Na árvore de MP para a região ND2 pode ainda ser identificado um nó que poderia indicar o evento de perda do satDNA As-51 na população de Sete Barras/SP (pp) (Figura 8.5a).

O grupo de *A. altiparanae* dos rios Paranapanema e do Alto Tietê mostrou ser monofilético quando analisados todos os 1.314 pb seqüenciados, tendo por grupo irmão os *A. aff. bimaculatus* dos rios Costeiros, grupo também monofilético (Figuras 8.5 e 8.6). Os dados concatenados apresentaram altos valores de *bootstrap* nos clados principais da árvore de MP (Figura 8.6a). Na árvore de NJ-MCL dos dados concatenados, o *bootstrap* também é alto em alguns ramos (Figura 8.6b). A análise das árvores geradas pelas seqüências mitocondriais, plotando-se os dados cromossômicos obtidos, indicou a existência de subclados com características citogenéticas compartilhadas por linhagens de uma mesma área geográfica, porém apenas o nó que indicaria o evento de aumento da quantidade do satDNA As-51 na população proveniente de Pilar do Sul/SP (rio Paranapanema) pôde ser definido com base na totalidade dos dados aqui apresentados. O subclado observado na árvore de MP da região ND2, que indicaria a perda do satDNA As-51 não se manteve na análise dos 1.314 caracteres (Figura 8.6a).

Discussão

Os estudos cariotípicos no grupo *A. altiparanae* iniciaram-se juntamente com as primeiras pesquisas realizadas por grupos brasileiros envolvendo cromossomos de peixes. As primeiras citações, entretanto, usam a denominação *A. aff. bimaculatus* para as populações do Alto rio Paraná (JIN e TOLEDO, 1975; MORELLI *et al.*, 1983), uma

vez que a denominação *A. altiparanae* fora criada apenas anos mais tarde (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

Levando em consideração o relacionamento evolutivo do grupo, a formação de populações estruturadas e a existência de diferentes citótipos de *A. altiparanae* descritos para diferentes sub-bacias, optou-se por incluir nas análises dados de seqüências de dois genes considerados pouco conservados (ATPase e ND2) (CHANG *et al.*, 1994), uma vez que o grupo deve apresentar divergência recente. De forma geral, assume-se que a escolha da região a ser seqüenciada tem mais influência na topologia da árvore final do que o método de análise empregado na reconstrução filogenética (Russo, 2001).

FUNK e OMLAND (2003) ressaltam que mesmo o mtDNA pode exibir variação insuficiente para a reconstrução de grupos com radiação filogenética muito recente, gerando artefatos. Por outro lado, regiões que evoluem muito rapidamente podem estar saturadas e produzir árvores com alto grau de homoplasias. Segundo estes autores, dependendo dos valores da medida de suporte (*bootstrap*, por exemplo), situações de polifilia podem refletir a árvore real para o gene mitocondrial utilizado, e não um simples artefato causado por dados inadequados. No presente trabalho, a única seqüência que mostrou saturação quando analisa separadamente (ATPase) também foi a que gerou árvores com menores valores de *bootstrap* (Figura 8.5b). Os valores de *bootstrap* baixos para os nós mais internos das demais árvores podem ser devidos à alta similaridade genética entre os diferentes haplótipos (PRIOLI *et al.*, 2002), uma vez que a distância genética estimada dentro dos grupos foi relativamente baixa (Tabela 8.3)

Entretanto, não são apenas regiões gênicas inadequadas para a análise da evolução molecular de determinado grupo que geram árvores polifiléticas. Espécies crípticas ou com identificação taxonômica confusa representam potencialmente um problema na resolução de árvores evolutivas, levando à polifilia (FUNK e OMLAND, 2003).

Não estão disponíveis filogenias para as espécies do gênero *Astyanax*, mas acredita-se que algumas espécies de lambaris com rabo amarelo e mancha umeral ovalada possam ser relacionadas por suas semelhanças morfológicas (GARUTTI, 1999). Este grupo é bastante grande, e assume-se a existência de diversas subespécies e formas assemelhadas a *A. bimaculatus* (EIGENMANN, 1921), algumas das quais já foram elevadas ao status de espécie, como *A. altiparanae* (GARUTTI e BRITSKI, 2000) e *A. rupununi* (GARUTTI, 2003).

A partir do estudo citogenético de diferentes populações ao longo da bacia do Alto rio Paraná, e da observação de diversas fórmulas cariotípicas no grupo *A. altiparanae*, foi sugerido que esse poderia tratar-se de um “complexo de espécies” (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004). Embora essa variação tenha sido observada ao longo de uma ampla bacia, os números diplóides das diversas populações de *A. altiparanae* estudadas permanecem constantes, diferente do que ocorre nos grupos *A. fasciatus* e *A. scabripinnis* (para revisão veja PAZZA e KAVALCO, 2007).

Ainda que o número diplóide se mantenha constante, pode-se assumir que estes citótipos diferentes atuem como OTUs (unidades taxonômicas operacionais), uma vez que não é registrada a ocorrência de hibridismo entre diferentes citótipos. Além disso, a biologia dos *A. altiparanae*, que naturalmente forma grupos estruturados (GARUTTI e BRITSKI, 2000), favorece processos evolutivos como a

vicariância, considerada responsável pela diversidade de espécies de peixes neotropicais, sobretudo os de pequeno porte e habitantes de pequenos rios, como os integrantes do gênero *Astyanax* (CASTRO, 1999). Portanto, as diferenças cromossômicas (Tabela 8.1) e genéticas (MOYSÉS e ALMEIDA-TOLEDO, 2002; LEUZZI *et al.*, 2004) observadas, além do reconhecimento da estruturação das populações naturais (GARUTTI, 1995) e da ausência de hibridismos entre citótipos, evidenciam que os *A. altiparanae* podem ser tratados como um grupo de espécies diferentes, embora constituam um grupo com caracteres morfológicos de difícil diferenciação, ou seja, corresponderiam a espécies crípticas. Os dados do presente trabalho fornecem evidências mitocondriais para esta hipótese, uma vez que é identificada estruturação genética relacionada com citótipos específicos para cada bacia, tanto com relação aos *A. altiparanae* quanto com relação aos *A. aff. bimaculatus*, embora estes últimos pareçam ser um grupo mais homogêneo no tocante às fórmulas cariotípicas (Figura 8.2).

A análise das árvores obtidas no presente trabalho indica não só a monofilia desse grupo dos “lambaris de rabo amarelo”, mas a presença de haplótipos população-específicos, suportados por altos valores de *bootstrap*. Também observa-se a existência de estruturação dentro da mesma bacia hidrográfica com relação aos grupos *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* (Figura 8.6). Entretanto, a totalidade dos sítios analisados (1.314 sítios) indica a existência de haplótipos muito próximos em bacias diferentes, ainda que pertencentes ao mesmo sistema hidrográfico (Alto Paraná e Rios Costeiros) (Figura 8.6). A monofilia deste grande grupo de peixes e o relacionamento mais próximo entre os exemplares provenientes da drenagem costeira e entre o grupo da drenagem do Alto rio Paraná parece estar em

concordância com a redefinição nominal dada a este último por GARUTTI e BRITSKI (2000). Entretanto, maior número de populações, ao longo de toda a drenagem do Alto rio Paraná, bem como das drenagens circunvizinhas precisa ser avaliado antes de sugerir-se a monofilia dos *A. altiparanae*.

As populações ora estudadas não se mostraram geneticamente muito distantes ou internamente diversas (Tabela 8.3), apresentando valores de distância relativamente semelhantes às populações do rio Paranapanema estudadas por LEUZZI *et al.* (2004). As distâncias genéticas aqui observadas mostram-se maiores que as obtidas para *A. altiparanae* dos rios Paraná e Iguazu (PRIOLI *et al.*, 2002), porém a diversidade entre haplótipos de um mesmo ponto também foi baixa, sobretudo nos exemplares de *A. aff. bimaculatus*. Embora não muito expressiva, a diversidade mitocondrial observada pode ser relacionada às bacias hidrográficas de origem dos exemplares, uma vez que as populações da drenagem costeira são mais semelhantes entre si. Tal quadro também é observado entre as populações da drenagem do Alto rio Paraná (Tabela 8.3).

A existência de haplótipos mitocondriais próximos em indivíduos de diferentes bacias (por exemplo, Paranapanema e Tietê) e que apresentam cariótipos distintos não enfraquece a hipótese de que estes grupos correspondam a espécies diferentes. Segundo FUNK e OMLAND (2003), espécies que têm o fluxo gênico cessado podem não compartilhar mais haplótipos ao longo do tempo (pelas mutações pós-introgressão), embora ainda apresentem haplótipos muito próximos, que se agrupam na árvore filogenética. Entretanto, entre espécies com maior tempo de divergência desde a introgressão, as linhagens alélicas persistentes devem representar a condição filogenética basal. Nesta situação, é menos provável que estas apresentem qualquer

relação geográfica com a população a partir da qual sofreram a introgressão, devido aos eventos aleatórios a cada espécie está suscetível (FUNK e OMLAND, 2003).

O gênero *Astyanax* é considerado recente, e várias de suas espécies possuem polimorfismos cromossômicos em variados graus (PAZZA e KAVALCO, 2007). Apesar de diferenças cromossômicas poderem gerar isolamento reprodutivo, em alguns destes peixes parece que mesmo polimorfismos acentuados ainda não se mostram suficientes para o estabelecimento definitivo de barreiras ao fluxo gênico (PAZZA *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo sendo um grupo para o qual polimorfismos em grande extensão não foram ainda descritos, entre as diferentes populações/citótipos de *A. altiparanae* não é observada a existência de híbridos detectados pelos estudos citogenéticos (Tabela 8.1). Portanto, a conservação de algumas características cariotípicas nestes peixes não indica necessariamente que se tratem da mesma espécie.

Com a maioria das demais espécies do gênero *Astyanax*, o grupo *A. altiparanae-bimaculatus* compartilha a presença de um metacêntrico grande, o que é considerado um traço simplesiomórfico dos Characidae (SCHEEL, 1973; MORELLI *et al.*, 1983; PORTELA *et al.*, 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; 2005), e o número diplóide de 50 cromossomos (PAZZA e KAVALCO, 2007). Outra característica comum neste gênero é a presença de múltiplos sítios argirofílicos (Ag-RONs) portadores do rDNA 18S. Embora várias espécies de *Astyanax* apresentem sítios de rDNA 18S de difícil identificação por seus tamanhos reduzidos (FERRO *et al.*, 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), algumas possuem ao menos dois cromossomos com sítios grandes (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006a, 2006b; PAZZA *et al.*, 2006), considerados os sítios preferenciais de ativação (PAZZA *et al.*, 2006). Estes sítios

grandes de regiões organizadoras de nucléolos são também observados nos exemplares analisados no presente trabalho, uma vez que para todas as Ag-RONs identificadas foram observados apenas dois cromossomos marcados (Figura 8.3).

Dois pares cromossômicos portadores do rDNA 5S consistem no fenótipo mais comum entre Characiformes (MARTINS e GALETTI JR., 2001) e entre os *Astyanax* [*A. bockmanni* (Capítulo III, neste volume), *A. fasciatus* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; PAZZA *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2008b; Capítulo VII, neste volume), *A. paraguayae* (KAVALCO *et al.*, 2004), *A. scabripinnis* (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004; VICARI *et al.*, 2008) e *A. schubarti* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002)], o que pode sugerir que a existência de apenas um par cromossômico portador deste DNA ribossômico em *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* seja uma condição derivada. As árvores evolutivas obtidas marcam o evento de diminuição do número de sítios de rDNA 5S no grupo *A. altiparanae-bimaculatus* na base do clado (Figuras 8.5 e 8.6), uma vez que esta característica é comum a todo este grupo e ausente no grupo externo, *A. mexicanus*, que apresenta seis cromossomos portadores do rDNA 5S (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007).

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva é considerado um caráter conservado nos *A. altiparanae*, sendo caracterizado pela presença de blocos pericentroméricos e intersticiais (DANIEL-SILVA e ALMEIDA TOLEDO, 2001; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2007). Blocos terminais, como observadas nos exemplares provenientes de Salesópolis e Pilar do Sul (Figura 8.4a, c), não são comuns neste grupo de peixes. O padrão normalmente observado no grupo foi encontrado apenas nos exemplares de *A. aff. bimaculatus* da drenagem Costeira (Figura 8.4e, g).

Quanto à distribuição do satDNA As-51 também foram observadas diferenças entre as populações ora estudadas. Embora este marcador não tenha sido empregado anteriormente em populações do grupo *A. altiparanae-bimaculatus*, o estudo de seu padrão de distribuição em outras espécies com $2n=50$ cromossomos pode fornecer base para comparações. Até o momento, o satDNA As-51 não foi observado entre as espécies com 50 cromossomos e distribuição na bacia dos rios Costeiros [*A. giton* (KAVALCO *et al.*, 2007), *A. hastatus* (Capítulo IV, neste volume), *A. intermedius* (KAVALCO *et al.*, 2007) e *A. ribeirae* (Capítulo V, neste volume)], com exceção de *A. janeiroensis*, em que vários cromossomos possuem sítios com homologia com a sonda As-51 (VICARI, 2006).

A presença de cinco pequenos sítios deste DNA satélite na população de Pilar do Sul parece constituir um evento único no grupo (Figura 8.4d), e deve ter surgido no ancestral desta população, que aparece como um grupo estruturado nas árvores filogenéticas de MP e NJ-MCL, com base na integridade dos dados de mtDNA obtidos (Figura 8.6). De forma semelhante, a ausência do satDNA As-51 na população proveniente da bacia do rio Ribeira de Iguape (Figura 8.4f) pode constituir uma apomorfia compartilhada por um subgrupo da drenagem costeira, uma vez que tal evento pode ser localizado na árvore de MP do gene ND2 (Figura 8.5a). Este padrão segue o que foi previamente observado para as outras espécies com distribuição costeira (Capítulo VI, neste volume).

Poucos trabalhos referentes a peixes têm associado estudos cromossômicos e filogenéticos. Um destes estudos refere-se a espécies de *Chromaphyosemion* (Cyprinodontiformes), em que diferenças cromossômicas são observadas em indivíduos com mesmo haplótipo (VÖLKER *et al.*, 2007). Do mesmo modo, nas

populações de *A. altiparanae* e *A. aff bimaculatus* ora estudadas foram observados indivíduos com diferentes cariótipos compartilhando haplótipos muito semelhantes. Porém, os grupos haplotípicos seguiram a distribuição das populações ao longo das grandes drenagens das quais fazem parte (Alto Paraná e Rios Costeiros) (Figura 8.6b). A formação de um subclado para as populações da drenagem costeira segue a tendência de divergência citogenética observada em outras espécies desta região, que parecem ser mais semelhantes entre si do que com as espécies de distribuição continental (Capítulos IV e V, neste volume).

Os dados do presente trabalho corroboram dados prévios da biologia dos “lambaris de rabo amarelo” com relação à formação de agregados populacionais ao longo das bacias hidrográficas (GARUTTI, 1995), com a vantagem de que árvores de haplótipos testam hipóteses filogeográficas com maior robustez (TEMPLETON, 2004). Entretanto, não se pode excluir a hipótese de que processos como *bottleneck* seguido de dispersão geográfica tenham participação na estruturação observada, até pelo fato de existirem haplótipos muito semelhantes em bacias próximas. Desta forma, tanto processos estocásticos como seletivos podem estar gerando estas diferenciações, embora a observação da concordância dos dados cromossômicos e moleculares possa indicar maior tendência a processos seletivos como agentes principais da diferenciação genética das populações do grupo *A. altiparanae-bimaculatus*. Traçar uma direção na evolução deste grupo ainda não é possível, embora a associação de marcadores nucleares (cromossômicos) e mitocondriais tenha mostrado uma faceta importante da biologia evolutiva destes peixes.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

Tabela 8.1 – Dados citogenéticos das espécies *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* publicados.

Espécie	Local de Coletas - Bacia Hidrográfica	2n	Tipos cromossômicos				Referência
			M	SM	ST	A	
<i>A. altiparanae</i>	*Rio Meia Ponte (Goiânia – GO) – Rio Paranaíba	50	-	26	-	24	JIN e TOLEDO (1975)
	*Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga – SP) – Alto Rio Paraná	50	10	24	4	12	MORELLI <i>et al.</i> (1983)
	Rio Claro (Tamarana – PR) – Rio Paranapanema	50	10	26	4	10	PACHECO <i>et al.</i> (2001)
			10	24	4	12	
	Rio Paranapanema (Salto Grande – SP) – Alto Rio Paraná	50	10	22	6	12	DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO (2001, 2005)
			10	22	4	14	
	Rio Mogi-Guaçu – Alto Rio Paraná	50	32		18	ALMEIDA-TOLEDO <i>et al.</i> (2002)	
	Rio dos Índios – Rio Ivaí	50	6	30	4	10	FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2004)
	Rio Paraná (Porto Rico – PR) – Alto Rio Paraná	50	6	26	6	12	FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2006b)
	Rio Paraná – Alto Rio Paraná	50	6	26	6	12	
	Córrego Tatupeba – Alto Rio Paraná	50	6	26	6	12	
	Córrego Keçaba – Alto Rio Paraná	50	6	26	6	12	DOMINGUES <i>et al.</i> (2007)
	Córrego Maringá – Alto Rio Paraná	50	6	26	6	12	
	Lagoa Tarumã (Ponta Grossa – PR) – Rio Tibagi	50	6	28	8	8	Presente trabalho
Rio Iraí (Curitiba – PR) – Rio Iguaçu	50	6	30	8	6		
Rio Paraitinga (Salesópolis – SP) – Alto rio Tietê	50	8	20	10	12		
Pilar do Sul – SP – Rio Paranapanema	50	8	22	14	6	Presente trabalho	
<i>A. aff. bimaculatus</i>	Sete Barras – SP – Rio Ribeira de Iguape	50	8	24	12		6
	Cachoeiras de Macacu – RJ – Rio Guapimirim/Rios Costeiros	50	8	24	12	6	

* Citados originalmente como *A. bimaculatus*.

Tabela 8.2 – Espécies e pontos de coleta amostrados no presente trabalho.

Espécie	Proveniência/ Bacia Hidrográfica	Nome do Ponto/Mapa	Coordenadas	N
<i>A. altiparanae</i> *	Salesópolis/SP Alto rio Tietê	sa	S 23°31'23" Wo 45°51'42"	21
<i>A. altiparanae</i> *	Pilar do Sul/SP Paranapanema	ps	S 23°48'45" Wo 47°42'30"	6
<i>A. aff. bimaculatus</i> *§	Sete Barras/SP Ribeira de Iguape	ad	S 24°18'39" Wo 47°53'30"	7
<i>A. aff. bimaculatus</i> *	Cachoeiras de Macacu/RJ Guapimirim/Rios Costeiros	gp	S 22°38'12" Wo 42°42'42"	6
<i>A. aff. bimaculatus</i>	Registro/SP Ribeira de Iguape	pp	S 24°36'01" Wo 47°52'32"	3
<i>A. altiparanae</i> §	Indaiatuba/SP Médio rio Tietê	in	S 23°05'39" Wo 47°15'37"	3
<i>A. altiparanae</i> §	Penápolis - SP Baixo rio Tietê	pe	S 21°25'11" Wo 50°04'39"	1
<i>A. altiparanae</i> §	Avaré - SP Paranapanema	rc	S 23°05'55" Wo 48°55'32"	3

N = número de exemplares analisados. * Exemplares com dados cromossômicos apresentados no presente trabalho. § Populações para as quais não foram obtidas seqüências de qualidade da região ND2.

Tabela 8.3 – Distâncias genéticas entre haplótipos do grupo *A. altiparanae-bimaculatus* estimadas para cada ponto amostrado.

	Guapimirim	Tietê	Paranapanema	Ribeira de Iguape	Grupo Externo	d(TN)	d(p)
Guapimirim	--	0,06467	0,06030	0,02995	0,22263	0,00928	0,00882
Tietê	0,08212	--	0,03182	0,06777	0,21396	0,03006	0,02547
Paranapanema	0,07512	0,03643	--	0,06175	0,21583	0,01226	0,01160
Ribeira de Iguape	0,03499	0,08842	0,07899	--	0,22789	0,04626	0,03923
Grupo externo	0,58821	0,55987	0,56895	0,62334	--	n/c	n/c

Valores abaixo da diagonal correspondem à distância obtida pelo método de TAMURA e NEI (1993). Valores acima da diagonal correspondem à distância p (não corrigida). d(TN) = distância intrapopulacional determinada pelo método de TAMURA e NEI (1993). d(p) = distância intrapopulacional estimada com base na distância p .

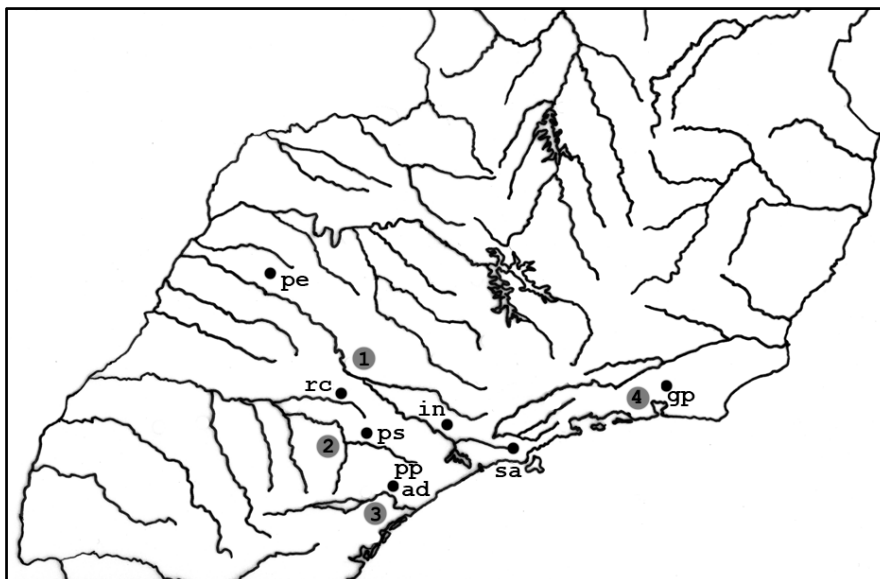


Figura 8.1 - Mapa mostrando as populações de *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus* sob estudo. Algarismos dentro dos círculos indicam as principais bacias hidrográficas do sudeste brasileiro: 1) rio Tietê; 2) rio Paranapanema; 3) rio Ribeira de Iguape; 4) rio Guapimirim. Letras indicam os pontos de coleta: Penápolis/SP (pe); Indaiatuba/SP (in); Salesópolis/SP (sa); Avaré/SP (rc); Pilar do Sul/SP (ps); Sete Barras/SP (pp, ad); Cachoeiras de Macacu/RJ (gp).

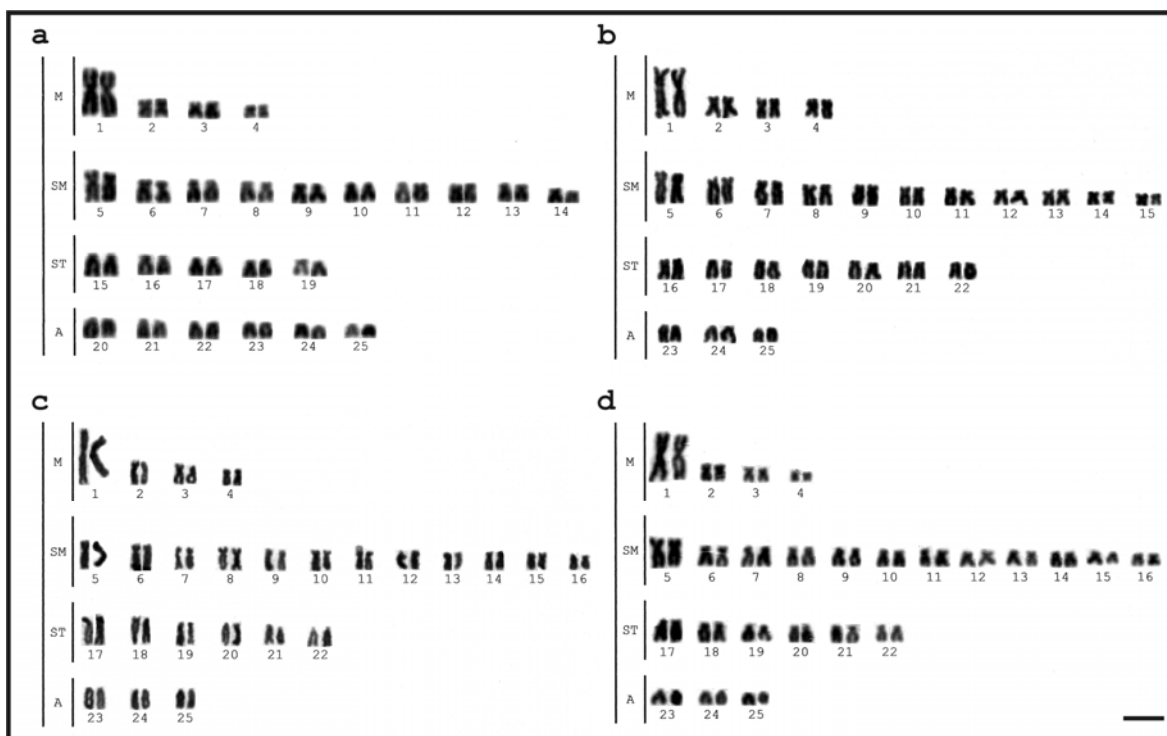


Figura 8.2 - Cariótipos de *A. altiparanae* (a-b) e *A. aff. bimaculatus* (c-d) corados em Giemsa. Populações provenientes de Salesópolis/SP (a), Pilar do Sul/SP (b), Sete Barras/SP (c) e Cachoeiras de Macacu/RJ (d). Barra=5µm.

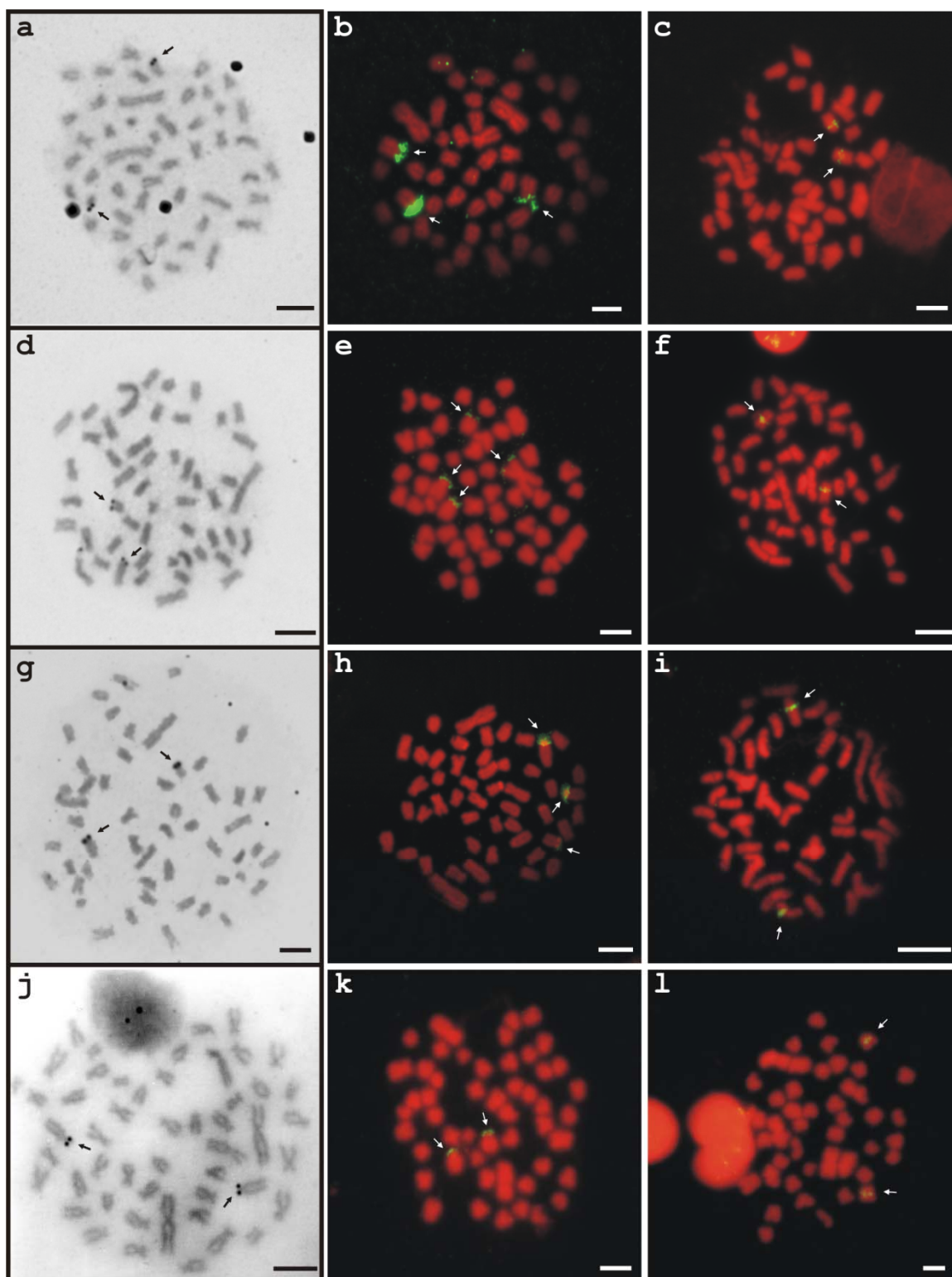


Figura 8.3 – Metáfases de *A. altiparanae* (a-f) e *A. aff. bimaculatus* (g-l). Ag-RONs (primeira coluna), FISH-18S (segunda coluna) e FISH-5S (terceira coluna) das populações provenientes de Salesópolis/SP (a, b, c), Pilar do Sul/SP (d, e, f), Sete Barras/SP (g, h, i) e Cachoeiras de Macacu/RJ (j, k, l). Barra=5 μ m.

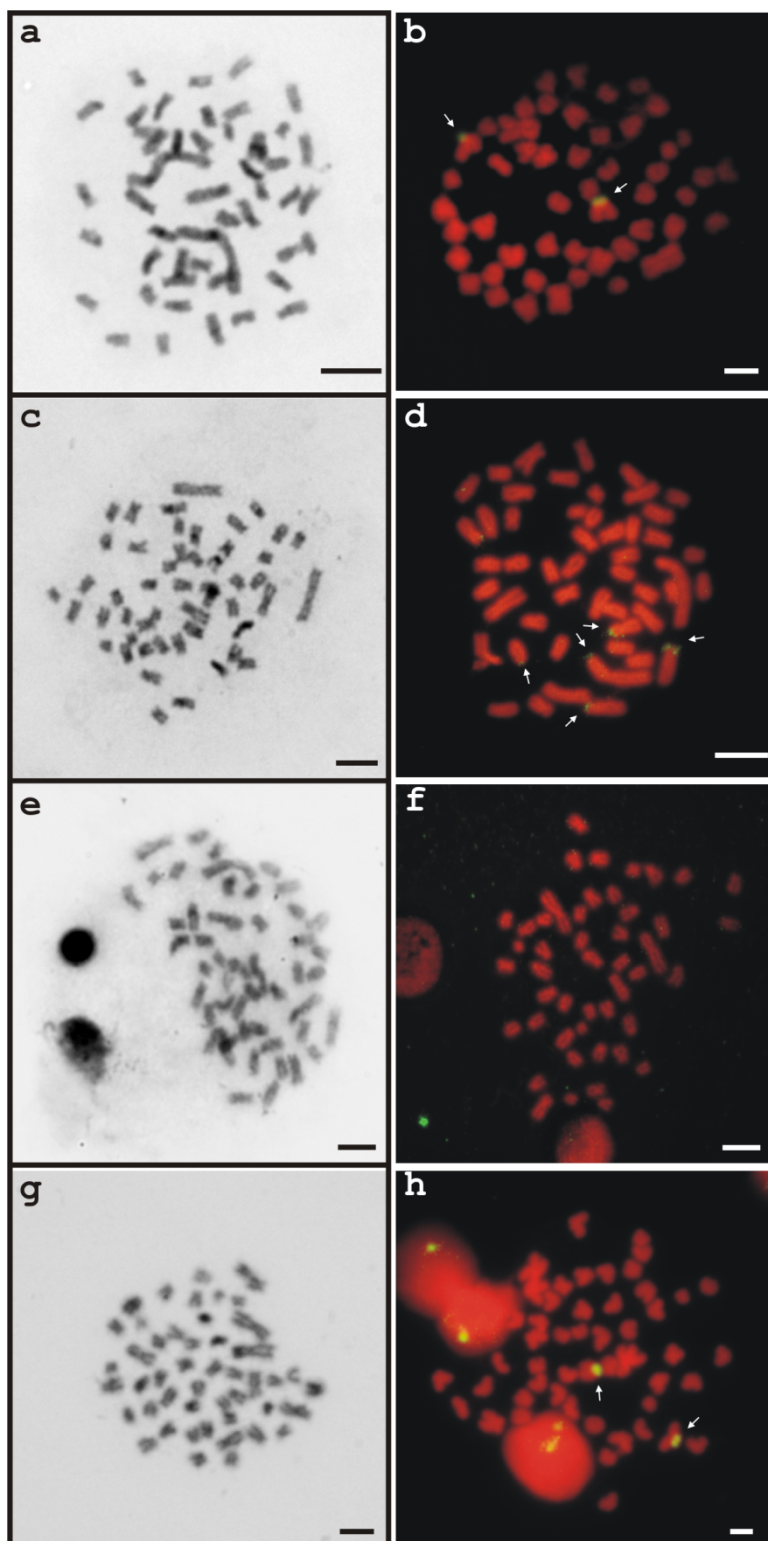


Figura 8.4 – Metáfases de *A. altiparanae* (a-d) e *A. aff. bimaculatus* (e-h) submetidas ao bandamento-C (primeira coluna) e FISH com sonda do satDNA As-51 (segunda coluna). Populações provenientes de Salesópolis/SP (a, b), Pilar do Sul/SP (c, d), Sete Barras/SP (e, f) e Cachoeiras de Macacu/RJ (g, h). Barras=5 μ m.

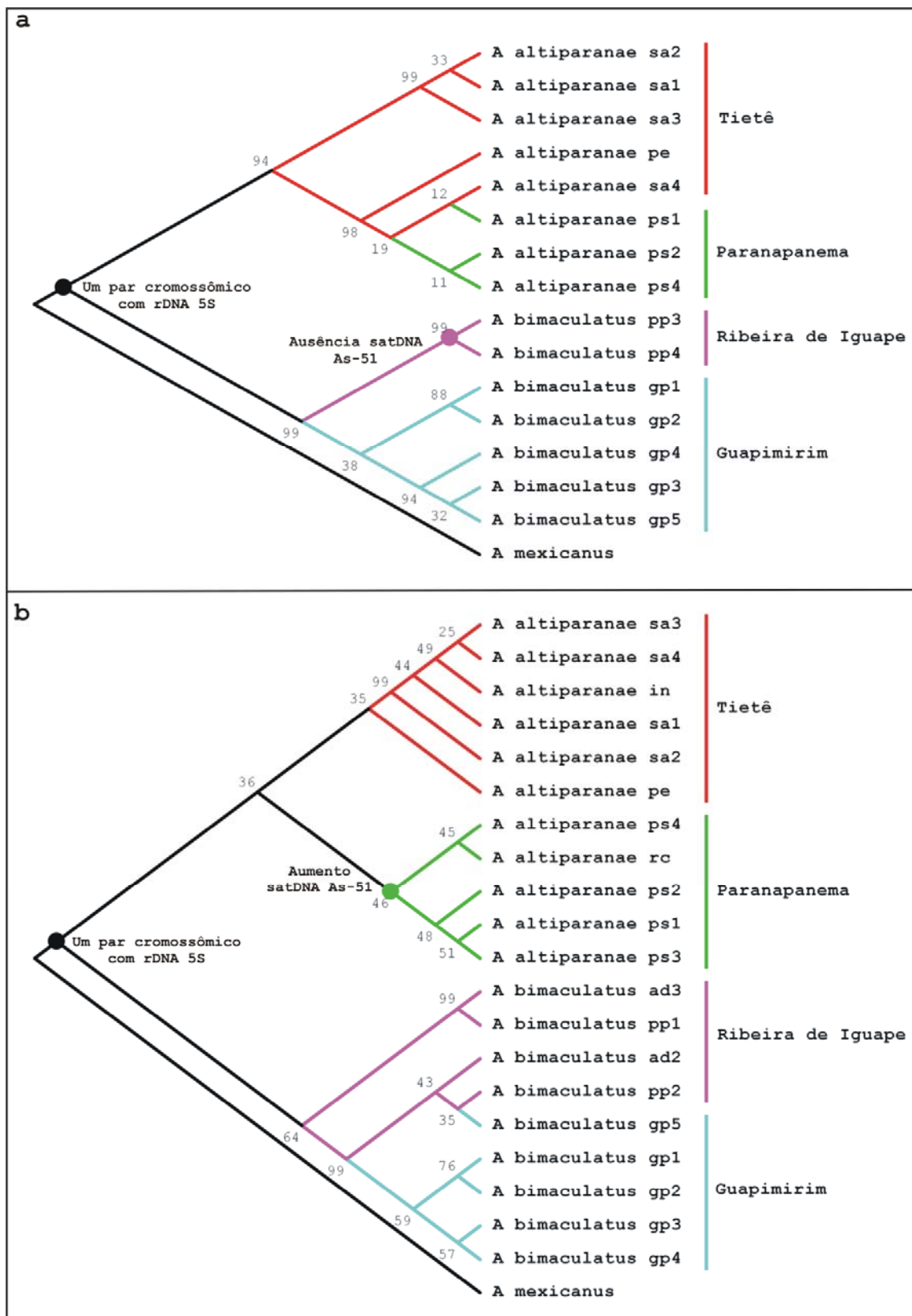
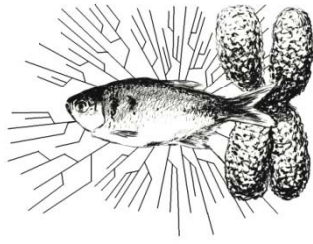


Figura 8.5 – Árvores construídas pelo método de máxima parcimônia (MP). Os Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os *gaps* foram tratados como *missing data*. a) Árvore consenso de 43 mais parcimoniosas (número de passos = 310) mostrando as relações evolutivas da região tRNA^{met}+ND2 entre 17 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,929078; Índice de Retenção (IR) = 0,967742. b) Árvore consenso de 22 mais parcimoniosas (número de passos = 285) mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 21 indivíduos: IC = 0,577922; IR = 0,813754.



Figura 8.6 – Árvores dos dados concatenados de 16 indivíduos usando 1.314 posições. Os Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) estão próximos dos ramos. Os *gaps* foram tratados como *missing data* e eliminados apenas nas comparações par-a-par no método NJ-MCL (*Pairwise deletion option*). a) Árvore construída pelo método de máxima parcimônia (MP). Árvore consenso de 5 mais parcimoniosas (número de passos = 589) mostrando as relações evolutivas das regiões tRNA^{met}+ND2 e ATPase8/6: Índice de Consistência (IC) = 0,802410; Índice de Retenção (IR) = 0,884017. b) Árvore concatenada inferida pelo método de Neighbor-Joining (NJ), linearizada e em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,61$). A soma do comprimento dos ramos foi de 0,857.



Capítulo 9

Capítulo IX

Relações evolutivas entre espécies do gênero *Astyanax*: análises cromossômicas e moleculares.¹

Abstract

Sequences of the regions comprising the subunits 5 and 8 of the ATPase (totalizing 874 analyzed characters) were used to infer the evolutionary relationships among species and cytotypes of *Astyanax* from the hydrographic basins of Coastal, Iguaçú, Ribeira de Iguape, Paranapanema, Tietê, Paraíba do Sul, Mogi-Guaçu, Grande and São Francisco rivers, representing some of the main Brazilian hydrographic systems. Additionally, a species from Central America, *A. mexicanus*, was also included. The sequences were obtained for 118 specimens of several species within this genus and outgroups. In case of groups composed of cryptic species according to chromosomal studies, such as *A. aff. bimaculatus*, *A. aff. fasciatus* and *A. hastatus*, more than a single population was included in the analysis. We verified the occurrence of 110 haplotypes, with a haplotype diversity (Hd) = 0.99. Structured branches supported by high bootstrap values discriminate the coastal species *A. giton*, *A. hastatus*, *A. intermedius*, and *A. ribeirae* from the remaining ones, following the trend observed by the chromosomal evolution. Other two relatively well structured clusters separate the yellow-tailed characins (comprising *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus* and *A. lacustris*) from red-tailed characins (comprising *A. bockmanni*, *A. aff. fasciatus* and *A. sp. B*). However, among and within these groups, several cases of paraphyly and polyphyly are observed in relation to haplotypes from the same geographic area. The data

¹ KAVALCO KF, PAZZA R, GARCIA C, BRANDÃO O, ALMEIDA-TOLEDO LF. Evolutionary relationships between species of the genus *Astyanax*: chromosomal and molecular analysis (em preparação).

analysis about the ATPase6/8 region reveals that the genus *Astyanax* comprises artificial taxonomic groups, mainly observed within groups characterized by a remarkable karyotypic diversity. Moreover, some clusters suggested by cytogenetic characters could be confirmed based on the phylogenetic tree obtained, particularly in relation to the chromosomal distribution of the 5S ribosomal gene.

Resumo

Seqüências da região das subunidades 6 e 8 da ATPase (totalizando 874 caracteres analisados) foram usadas para inferir as relações evolutivas entre espécies e citótipos de *Astyanax* provenientes das bacias dos rios Costeiros, Iguaçu, Ribeira de Iguape, Paranapanema, Tietê, Paraíba do Sul, Mogi-Guaçu, Grande e São Francisco, representado alguns dos principais sistemas hidrográficos brasileiros. Adicionalmente, foi incluída na análise a espécie da América Central, *A. mexicanus*. As seqüências foram obtidas para 118 exemplares de diversas espécies do gênero e grupos externos. Para grupos compostos por espécies crípticas determinadas por estudos cromossômicos, como *A. aff. bimaculatus*, *A. aff. fasciatus* e *A. hastatus*, foi incluída mais de uma população na análise. Foi verificada a existência de 110 haplótipos, com diversidade haplotípica (H_d) = 0,99. Ramos estruturados e com altos valores de *bootstrap* separam das demais espécies do gênero as de distribuição costeira: *A. giton*, *A. hastatus*, *A. intermedius*, *A. ribeirae*, acompanhando as tendências observadas pela evolução cromossômica. Outros dois agrupamentos relativamente bem estruturados separam os grupos dos “lambaris de rabo amarelo” (compreendendo *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus* e *A. lacustris*) e dos “lambaris de rabo vermelho” (compreendendo *A. bockmanni*, *A. aff. fasciatus* e *A. sp. B*), entretanto,

dentro e entre estes grupos são observadas várias situações de parafilia e polifilia com relação a haplótipos provenientes de uma mesma área geográfica. A análise dos dados da região da ATPase6/8 demonstra que o gênero *Astyanax* possui agrupamentos taxonômicos artificiais, sobretudo para os grupos com grande diversidade citogenética. Adicionalmente, alguns agrupamentos sugeridos por caracteres citogenéticos puderam ser confirmados pela árvore evolutiva obtida, sobretudo com relação à distribuição cromossômica do gene ribossômico 5S.

Introdução

O gênero *Astyanax* BAIRD e GIRARD é um dos grupos mais especiosos e também de taxonomia mais confusa dentre os integrantes da família Characidae. Atualmente encontra-se “*insertae sedis*”, e conta com aproximadamente 100 espécies válidas (LIMA *et al.*, 2003). Embora atualmente várias espécies novas tenham sido descritas (CASTRO e VARI, 2004; LIMA e ZUANON, 2004; HALUCH e ABILHOA, 2005; BERTACO e LUCINDA, 2005; BERTACO e LUCENA, 2006; VARI e CASTRO, 2007), a última revisão taxonômica realizada no gênero *Astyanax* data do começo do século XX (EIGENMANN, 1917).

O grupo é reconhecidamente de difícil identificação taxonômica (LOWE-McCONNELL, 1999), e distribui-se por praticamente toda a extensão da região Neotropical (EIGENMANN, 1921). Seus exemplares apresentam tamanho reduzido, tendo como principais características morfológicas: nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão, e

escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (BRITSKI *et al.*, 1988).

A ampla distribuição das espécies de *Astyanax* tem influência direta nos processos evolutivos do grupo e em sua exuberante diversidade. A existência de estruturação populacional ao longo de um mesmo rio (GARUTTI, 1995; LEUZZI *et al.*, 2004) e a capacidade de explorar grande variedade de micro habitats, formando pequenas populações com dispersão relativamente restrita, levaram GARUTTI e BRITSKI (2000) a sugerir que estes peixes não formam um grupo uniforme, e que apresentam variações de população para população.

Os estudos citogenéticos no grupo têm sugerido situação semelhante. Embora poucas espécies nominais diferentes tenham passado por estudos cromossômicos, grupos como *A. altiparanae*, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis* demonstram grande diversidade com relação a números diplóides e/ou fórmulas cariotípicas (PAZZA e KAVALCO, 2007). Sugere-se que a especiação alopátrica seja um dos mecanismos proeminentes na evolução deste grupo de peixes (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), e a existência de pelo menos quatro grupos de espécies crípticas é sugerida com base em dados cromossômicos (Capítulo IV, neste volume).

Embora possua grupos nos quais tendências da evolução cromossômica são de difícil delineamento, como os anteriormente citados, algumas espécies do gênero *Astyanax* apresentam características cariotípicas que as diferenciam das demais. Espécies provenientes de bacias como a drenagem dos rios Costeiros e do rio Iguaçu, conhecidas por seu alto grau de endemismo (CASTRO e MENEZES, 1996; JÚLIO JR. *et al.*, 1997), por exemplo, possuem citótipos únicos (CARVALHO *et al.*, 2002; FAZOLI *et al.*, 2003; KANTEK *et al.*, 2003, 2007; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; Capítulos III, IV e V,

neste volume). A ausência de descrição de polimorfismos cromossômicos nos peixes desta distribuição, entretanto, pode ser devida ao pequeno número de populações estudadas e não necessariamente à falta de variação intra-específica (PAZZA e KAVALCO, 2007).

O presente trabalho inclui a análise filogenética de exemplares de *Astyanax* provenientes das bacias sul-americanas dos rios Costeiros, Iguaçu, Ribeira de Iguape, Paranapanema, Tietê, Paraíba do Sul, Mogi-Guaçu, Grande e São Francisco, além de exemplares de *A. mexicanus* importados da América Central (Tabela 9.1). São utilizados como grupos externos *Roeboides occidentalis*, *Bryconamericus iheringii* e *Mimagoniates microlepis*. Os dados obtidos a partir do seqüenciamento de uma região do mtDNA destes peixes são analisados sob a luz dos dados cromossômicos disponíveis, integralizando diferentes abordagens na tentativa de elucidar algumas questões da biologia evolutiva do gênero *Astyanax*.

Material e Métodos

Os exemplares de *Astyanax* analisados no presente trabalho são provenientes várias bacias hidrográficas e encontram-se listados na Tabela 9.1. Após a retirada de tecido para a extração do DNA os exemplares foram fixados em formol 10% e mantidos em etanol 70%. Esses foram identificados e depositados na coleção ictiológica do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS/Brasil.

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit Wizard (Promega), conforme instruções do fabricante e quantificado utilizando-se gel de agarose e Ladder Low Mass (Invitrogen). Após análise de sua qualidade este foi diluído em solução de uso com concentração final de 10 ng/μL. Foram utilizados cinco indivíduos

representativos de cada ponto amostrado ou citótipo, quando possível. Optou-se pela utilização do segmento mitocondrial da ATPase6/8, totalizando 874 pb analisados. Os pares de primers utilizados foram: ATP8.2-L8331 (5'-AAAGCRTTRGCCTTTTAAAGC-3') + CO3.2-H9236 (5'-GTTAGTGGTCAGGGCTTGGRTC-3') (SIVASUNDAR *et al.*, 2001).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, perfazendo um volume total de 25 µL, contendo 15 ng de DNA molde, Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 µM de cada *primer*, 0.1 mM de cada dNTP e 2.5 U *Taq*-polimerase. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, hibridação a 56°C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 minutos a 72°C e de um passo de extensão final por 10 minutos a 72°C (PRIOLI *et al.*, 2002). Após checagem da amplificação via gel de agarose 1%, parte dos produtos de PCR foi purificada usando-se o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up - Invitrogen, e parte serviu diretamente de molde para as reações de sequenciamento. Estas foram realizadas utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 - Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 10 ng de DNA molde 5 pmol de cada primer foram adicionados em cada reação de seqüenciamento. As amostras foram submetidas a 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C e precipitadas. As amostras foram então armazenadas em freezer -20°C até o momento do seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o programa Chromas Lite v2.01, e verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através

do programa "Blastn", para confirmação de sua similaridade com seqüências mitocondriais de outros peixes. As seqüências de DNA foram então alinhadas, utilizando o algoritmo ClustalW v1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994) integrado pelo software MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007). Foram computadas penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos para abertura de *gaps* (20) e extensão de *gaps* (6,66).

Buscando evitar artefatos, as seqüências que não se mostraram com alta qualidade foram excluídas da análise filogenética. O valor do parâmetro α da distribuição gama utilizado para os cálculos de distância foi estimado pelo programa PAUP* v4.0 (SWOFFORD, 2001), através do modelo de substituição de TAMURA e NEI (1993). A verificação do nível de saturação das substituições nas seqüências analisadas foi realizada através do algoritmo de XIA *et al.* (2003), com o auxílio do programa DAMBE v5.0.16. Os dados estatísticos foram obtidos com o auxílio dos programas DAMBE v5.0.16, DNAsp v4.50 (ROZAS *et al.*, 2003) e MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007).

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007), utilizando-se o método da máxima parcimônia com o algoritmo CNI (NEI e KUMAR, 2000) e calculados os índices de retenção, de consistência e de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) (1000 réplicas); as árvores de distância de Neighbour-Joining foram obtidas através do método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) (TAMURA *et al.*, 2004), através do modelo de substituição de TAMURA-NEI (1993), no qual as taxas dos dois tipos de substituições (entre purinas e entre pirimidinas) são consideradas separadamente levando em consideração as freqüências desiguais dos quatro nucleotídeos; o padrão de substituição dos nucleotídeos foi estimado pelo

método da MCL através do programa MEGA v4.1 (TAMURA *et al.*, 2007). A calibração do relógio molecular foi realizada de acordo com as estimativas de PORTER *et al.* (2007).

Resultados

Foram analisados 874 pb da região das subunidades 6 e 8 da ATPase, dos quais 442 mostraram-se informativos para Parcimônia. Foram observadas 110 diferentes haplótipos ($Hd=0,99$), tendo sido utilizados 118 taxa. As frequências nucleotídicas foram: 0,287 (A); 0,300 (T/U); 0,275 (C); e 0,138 (G). A razão de transições/transversões foi $k_1=5,662$ (purinas) e $k_2=5,502$ (pirimidinas). O desvio total das transições/transversões foi de $R=2,324$. O parâmetro alfa da distribuição gama foi $\alpha=0,73$. A plotagem do número de transições e transversões versus a distância genética revelou $Iss < Iss.c$ ($p=0.000$), indicando pouca saturação. As distâncias evolutivas entre e dentro dos indivíduos agrupados por espécie nominal encontram-se na Tabela 9.2.

As árvores de MP e NJ-MCL mostraram topologia essencialmente similar, indicando a monofilia do gênero com relação às espécies e grupos externos analisados, tendo sido identificados três agrupamentos principais: clado 1 - espécies predominantemente de rabo vermelho; clado 2 - espécies predominantemente de rabo amarelo; clado 3 - espécies da drenagem costeira. Algumas espécies com a cor da cauda diferente foram observadas intercalando estes grupos, entretanto os três agrupamentos principais são mantidos com altos valores de *bootstrap* (Figuras 9.1, 9.2). Em alguns casos, mais de uma população de cada espécie nominal foi analisada

(ver Tabela 9.1), e princípios de estruturação geográfica foram observados para algumas destas.

O clado 1 da árvore de MP é mantido por um valor de *bootstrap* de 100%, com um tempo de divergência estimado entre 4-3Ma e agrupa *A. aff. fasciatus* (oito diferentes populações: ce, ba, ar, of, ad, ps, ag, sa); *A. bockmanni* (sm, ps); *Astyanax* sp. B (cs, ro); *A. aff. scabripinnis*; e *A. aff. janeiroensis* e um haplótipo de *A. aff. bimaculatus* (Figura 9.3). Para efeito de análise, o clado 1 foi subdividido em três clados menores, os quais mostram agrupamentos também monofiléticos. O clado 1-A é formado por haplótipos de *A. aff. fasciatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu (ce, ba, ar, of); do Alto rio Tietê (sa); dois haplótipos de *A. aff. fasciatus* e um de *A. aff. bimaculatus* da bacia do rio Ribeira de Iguape; por *A. aff. fasciatus* e *A. bockmanni* do rio Paranapanema (ps, ag, sm); um haplótipo de *A. aff. fasciatus* do rio Mogi-Guaçu; e três haplótipos de *A. aff. fasciatus* do Alto Tietê (sa). Os exemplares provenientes das duas populações de *Astyanax* sp. B analisadas (cs, ro) formam um clado monofilético, com indícios de estruturação populacional (clado 1-B). Finalmente, o clado 1-C abrange haplótipos de *A. aff. scabripinnis*, *A. bockmanni*, *A. aff. janeiroensis* e um indivíduo de *A. aff. fasciatus* do Alto Tietê que apresenta 2n=50 cromossomos. Um haplótipo de *A. aff. fasciatus* do rio Paranapanema constitui grupo irmão dos demais, não estando associado a nenhum dos agrupamentos anteriores.

O clado 2 da árvore de MP agrupa *A. aff. bimaculatus*, *A. altiparanae*, *A. lacustris* e *A. mexicanus* e é mantido por um valor de *bootstrap* de 97% (Figura 9.4). Este foi dividido em três clados menores, sendo o primeiro formado por haplótipos do lambari cego, *A. mexicanus*. Este clado (2-A) aparece como grupo irmão das demais espécies. Na base deste segundo grande grupo se encontra isolado um haplótipo de *A.*

altiparanae do baixo Tietê (pe). Os demais *A. altiparanae* (dos rios Tietê e Paranapanema) formam um grupo monofilético (clado 2-B), tendo como grupo irmão *A. aff. bimaculatus* e *A. lacustris* (clado 1-C).

O clado 3, cujos valores de *bootstrap* chegam a 100%, é referente às espécies da drenagem dos Rios Costeiros: *A. hastatus*, *A. ribeirae*, *A. giton* e *A. intermedius* (Figura 9.5). Embora a árvore mostre íntimo relacionamento entre *A. giton* e *A. intermedius* (clado 3-A), que aparecem como um grupo monofilético, as demais espécies analisadas mostraram estruturação populacional. Foram obtidas seqüências para exemplares de duas populações de *A. ribeirae* (pg e pp) que mostraram-se parafiléticas e quatro populações de *A. hastatus* (pf, pr, rm, yp). Três destas populações de *A. hastatus* (pr, rm, yp) apresentam grande similaridade genética e formam um clado (3-C) com suporte de 76% de *bootstrap* na árvore de MP. A população “pf”, entretanto, aparece separada das demais populações de *A. hastatus* e mais relacionada à *A. giton* e *A. intermedius* (clado A). Com relação às populações de *A. ribeirae* (clado 3-B), estas são parafiléticas, sendo a população “pg” grupo irmão dos *A. hastatus* de “pr, rm, yp” (Figura 9.5).

Os grupos externos *M. microlepis*, *B. iheringii* e *R. occidentalis* mantiveram-se na base das árvores de MP e NJ-MCL, sendo este último o mais distante do gênero *Astyanax*.

Discussão

Embora *Astyanax* seja considerado um modelo para estudos genéticos e evolutivos (LANGECKER *et al.*, 1995; JEFFERY, 2001; KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007), as relações de parentesco entre as espécies do gênero foram sugeridas apenas para

alguns grupos proximamente relacionados, não existindo uma proposta que envolva diferentes grupos e bacias hidrográficas. Ainda, em vista da diversidade genética verificada no grupo, a abordagem integrada de dados morfológicos, bioquímicos, genéticos e cromossômicos pode fornecer um quadro mais fiel da história evolutiva do grupo, podendo auxiliar na descrição de novas taxa, a exemplo do gimnotídeo *Gymnotus pantanal* (FERNANDES *et al.*, 2005).

Parte da dificuldade em sugerir relações evolutivas entre os *Astyanax* reside na difícil identificação taxonômica desses pequenos lambaris (LOWE-McCONNELL, 1999). A falta de uniformidade com relação a diferentes populações, ocasionada pela diversidade de ambientes ocupados por suas espécies (ORSI *et al.*, 2004) e estruturação populacional (GARUTTI, 1995; LEUZZI *et al.*, 2004), incrementa as possibilidades de divergência no gênero e o torna um dos grupos neotropicais de distribuição mais ampla (EIGENMANN, 1921), o que também complica amostragens robustas.

Outro fator que dificulta as estimativas de relações de parentesco dentro do grupo é sua divergência recente, uma vez que se estima que a divergência da família Characidae tenha ocorrido há apenas em torno de 13,5 Ma (LUNDBERG, 1998). A única espécie do gênero para a qual datação de divergência está disponível é o lambari cego das cavernas mexicanas, *A. mexicanus*. Através de análise envolvendo exemplares de diferentes ordens de peixes, PORTER *et al.* (2007) sugerem que a divergência destes lambaris tenha se iniciado há cerca de 5-2Ma, embora alguns ramos de *Astyanax* brasileiros apontem uma divergência um pouco mais antiga, em torno de 13-10Ma. Grupos de divergência recente podem apresentar limitações com relação à inferência filogenética, uma vez que mesmo genes mitocondriais podem apresentar taxas

evolutivas muito baixas nestes casos, mesmo possuindo taxas evolutivas maiores quando comparados com genes nucleares (FUNK e OMLAND, 2003).

Atualmente estão disponíveis informações citogenéticas para algumas espécies do gênero. Embora a maioria dos estudos seja referente a espécies crípticas dos grupos *A. aff. scabripinnis* e *A. aff. fasciatus* (PAZZA e KAVALCO, 2007), as informações disponíveis para estas populações e algumas outras espécies nominais do gênero têm possibilitado a inferência de padrões evolutivos com relação aos cromossomos.

Podem ser identificados no gênero *Astyanax* dois padrões com relação aos números cromossômicos, ocorrendo um grupo em que os números diplóides variam e outro no qual permanecem constantes. *A. aff. scabripinnis* e *A. aff. fasciatus* constituem um grupo no qual os números diplóides padrão variam entre $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006; Capítulo VII, neste volume). Há ainda a existência de citótipos variantes em *A. aff. fasciatus*, nos quais nem todos os cromossomos do complemento parecem poder ser pareados com seus homólogos, representando em alguns casos formas híbridas dos citótipos padrão (ARTONI *et al.*, 2006; PAZZA *et al.*, 2006) ou cromossomos B (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004; Capítulo VII, neste volume). Os grupos *A. aff. bimaculatus*, *A. altiparanae* e *A. hastatus* possuem diferentes citótipos com manutenção do número diplóide de $2n=50$ cromossomos (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004; Capítulos IV e VIII, neste volume; entre outros). As demais espécies de *Astyanax* descritas do ponto de vista citogenético apresentam cariótipos aparentemente conservados e portando 50 cromossomos, com exceção de *A. parahybae*, que possui $2n=48$ cromossomos (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), e *A. schubarti*, que possui $2n=36$ (DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001), não tendo sido registrados polimorfismos populacionais.

No filograma obtido através da análise das seqüências da ATPase6/8 de espécies de *Astyanax* (Figura 9.1) foram identificados três grupos, denominados de Clados 1, 2 e 3 que seguem um padrão geográfico ou morfológico dos indivíduos. O Clado 1 é formado predominantemente pelos “lambaris de rabo vermelho”. O tempo estimado de divergência para esta clado é de 4-3Ma. Três haplótipos que não correspondem à classificação segundo a coloração, encontram-se intercalados neste clado: *A. aff. janeiroensis*, *A. aff. scabripinnis* e um haplótipo de *A. aff. bimaculatus* da bacia do Ribeira de Iguape. A presença destes haplótipos junto com haplótipos de *A. aff. fasciatus*, *Astyanax* sp. B e *A. bockmanni*, todas elas espécies com caudas avermelhadas, pode indicar que estas espécies realmente possuem relacionamento com o grupo *A. aff. fasciatus*, embora não apresentem a mesma coloração. Por outro lado, o exemplar de *A. aff. bimaculatus* era de ocorrência sintópica com exemplares de *A. aff. fasciatus* em Sete Barras (bacia do rio Ribeira de Iguape). Desse modo, não é possível descartar a hipótese de introgressão, uma vez que os marcadores nucleares os cromossômicos, mostram tendência contrária ao mitocondrial e satisfazendo a premissa introgressão (AVISE, 2004).

É interessante notar que *A. aff. janeiroensis* e *A. aff. scabripinnis* agrupam no clado 1-C, que é formado também por *A. aff. fasciatus* e *A. bockmanni*, todos com $2n=50$ cromossomos (CARVALHO *et al.*, 2002; Capítulos III e VII, neste volume;). Os únicos indivíduos com 50 cromossomos no clado 1 que aparecem separados do agrupamento 1-C são dois *A. bockmanni* que aparecem agrupados com *A. aff. fasciatus*, no clado 1-A (Figura 9.3), além de *Astyanax* sp. B que se encontra estruturado no clado 1-B. Também com relação aos haplótipos de *A. bockmanni* que aparecem agrupados com *A. aff. fasciatus* não pode ser excluída a possibilidade de eventos de

introgressão no passado ou hibridismo, uma vez que os indivíduos encontram-se estruturados em um subgrupo onde todos são provenientes da bacia do rio Paranapanema, com exceção de um haplótipo de Barrinha/SP (bacia do Mogi-Guaçu). Desta forma, pode-se dizer que os números diplóides dos indivíduos do clado 1-B e 1-C correspondem ao normalmente visto no gênero, tratando-se provavelmente de um caráter plesiomórfico do grupo, uma vez que a maioria das espécies de *Astyanax* possui $2n=50$ cromossomos (PAZZA e KAVALCO, 2007), bem como outros Characidae, como, por exemplo, os integrantes do gênero *Oligosarcus* (KAVALCO *et al.*, 2005; HATTORI *et al.*, 2007), que parece ser intimamente relacionado ao gênero *Astyanax* (LIMA, 1997). Adicionalmente, é possível estimar que a divergência do clado em que o número cromossômico no gênero é reduzido seja de aproximadamente 2-0,9Ma. Além disso, o clado 1 é grupo irmão de um exemplar de *A. aff. fasciatus* proveniente da bacia do rio Paranapanema e que, provavelmente, se trata da manutenção do haplótipo ancestral, uma das explicações para a ocorrência de polifiletismos em reconstruções de filogenia molecular (FUNK e OMLAND, 2003).

As características citogenéticas simplesiomórficas do clado 1 correspondem basicamente àquelas compartilhadas por *A. aff. fasciatus* e *A. bockmanni*, já que não estão disponíveis dados de localização gênica para *Astyanax* sp. B e que os exemplares de *A. aff. scabripinnis* usados na análise não passaram por estudos citogenéticos. Os dados da distribuição do rDNA 5S em *A. aff. scabripinnis* mostram que o caráter é variável no grupo (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004), embora tendências possam ser sugeridas (MANTOVANI *et al.*, 2005). A ausência da caracterização da população usada nas análises moleculares torna difícil qualquer inferência neste sentido.

Os padrões de distribuição dos genes de rDNA 5S são compartilhados entre *A. aff. fasciatus* e *A. bockmanni* o padrão de (PAZZA *et al.*, 2006; Capítulos III e VII, neste volume), embora *A. bockmanni* não apresente cromossomos com homologia com o satDNA As-51, que está amplamente distribuído no genoma dos *A. aff. fasciatus* (PAZZA *et al.*, 2008a; Capítulos III e VI, neste volume). Não é ainda possível traçar uma direção com relação à evolução deste caráter, que parece ser altamente polimórfico no gênero, embora seja clara sua tendência de dispersão pelo genoma por tratar-se de uma seqüência semelhante a um transposon (MESTRINER *et al.*, 2000).

Com exceção de *A. mexicanus*, que é cego e despigmentado, os demais integrantes do clado 2 são conhecidos como “lambaris de rabo amarelo”. *A. mexicanus* (clado 2-A) aparece como grupo irmão do clado formado por *A. altiparanae*, *A. aff. bimaculatus* e *A. lacustris*, um grupo monofilético mantido por altos valores de *bootstrap* (Figura 9.4). O tempo de divergência estimado para este clado é de 12-11Ma. Este grupo é também formado por espécies com $2n=50$ cromossomos e cariótipos constituídos de muitos cromossomos M/SM (JIN e TOLEDO, 1975; MORELLI *et al.*, 1983; PACHECO *et al.*, 2001; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001, 2005; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004, 2006b; DOMINGUES *et al.*, 2007; KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007; Capítulo VIII, neste volume).

Com relação ao rDNA 5S, *A. mexicanus* tem um fenótipo bastante incomum (KAVALCO e ALMEIDA-TOLEDO, 2007), compartilhado apenas com *A. aff. fasciatus* da bacia do rio Ribeira de Iguape (Capítulo VII, neste volume), que consiste em três pares marcados, dois com sítios em região terminal e o par intersticial considerado marcador do gênero (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002). A localização das seqüências ribossômicas 5S nos “lambaris de rabo amarelo” também é conservada. Observam-se

dois sítios localizados em um par metacêntrico, em posição intersticial (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006b; Capítulo VIII, neste volume).

O Clado 3 é formado exclusivamente por representantes das drenagens costeiras brasileiras e apresenta tempo de divergência estimado entre 5-4Ma. Entre as características cromossômicas compartilhadas destacam-se: o número diplóide de $2n=50$ cromossomos com um baixo número fundamental, uma vez que apresentam quantidade elevada de cromossomos acrocêntricos (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; Capítulos IV e V, neste volume); ausência de regiões homólogas ao DNA satélite As-51 (KAVALCO *et al.*, 2007; Capítulos IV e V, neste volume); e ausência do cromossomo metacêntrico marcador portador do sítio intersticial de DNAr 5S (KAVALCO *et al.*, 2004; Capítulos IV e V, neste volume). Os dados ora apresentados corroboram a hipótese proposta por KAVALCO *et al.* (2004) com relação ao próximo relacionamento de *A. giton* e *A. intermedius*, que formariam um subgrupo dentro do gênero *Astyanax*. Entretanto, este grupo deve ser ampliado para demais espécies analisadas e que ocorrem unicamente na região da drenagem dos rios Costeiros.

O grupo *A. hastatus* está presente em dois subclados, o que reflete sua variabilidade cariotípica caracterizada pela ocorrência de três citótipos distintos, diferenciados em sua macroestrutura cariotípica (Capítulo IV, neste volume). O subclado 3-A é constituído exclusivamente por exemplares da população com citótipo formado por 8M+10SM+14ST+18A (NF=82, população pf) e pelas espécies *A. intermedius* e *A. giton*. Estas últimas têm uma diferenciação haplotípica discreta e baixa distância genética que é refletida em sua composição cariotípica, uma vez que diferem, aparentemente, apenas pela inversão pericêntrica de apenas dois pares cromossômico ST/A (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003). O subclado 3-B é formado

exclusivamente por *A. ribeirae*, embora haja uma considerável estruturação populacional, caracterizada por parafilia. Por sua vez, o subclado 3-C apresenta dois subgrupos formados por *A. hastatus* com suporte considerável (73% *bootstrap*). Haplótipos de exemplares portadores do citótipo formado por 6M+8SM+4ST+32A (NF=68, populações pr e rm) são observados nos dois subgrupos. Por outro lado, o citótipo formado por 4M+8SM+10ST+28A (NF=72, população yp) é observado em apenas um dos subgrupos. Esta situação pode ser explicada pela manutenção do haplótipo ancestral entre os dois citótipos tendo em vista a divergência extremamente recente estimada para este clado (aproximadamente 0,14Ma). Este curto tempo, entretanto, foi suficiente para a fixação de algumas inversões pericêntricas, responsáveis pela variação no número fundamental. Inversões cromossômicas têm sido apontadas como responsáveis por diminuição no fluxo gênico e isolamento reprodutivo levando à especiação (NAVARRO e BARTON, 2003; KIRKPATRICK e BARTON, 2006; CASALS e NAVARRO, 2007).

O polifiletismo do gênero *Astyanax* tem sido proposto pela análise de caracteres morfológicos (WEITZMAN e MALABARBA, 1998) e genéticos (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005; PORTER *et al.*, 2007). Embora na presente análise o grupo tenha se mostrado monofilético com relação aos grupos externos incluídos na análise, a hipótese de polifiletismo do mesmo não pode ser descartada, uma vez que um número pequeno de espécies nominais foi analisado, tendo em vista a grande diversidade de espécies descritas de *Astyanax* (LIMA *et al.*, 2003). Além disso, a inclusão de diferentes grupos externos pode mudar consideravelmente a relação destes com as linhagens de *Astyanax* observadas, alterando a topologia da árvore evolutiva. Ainda, em vista da recente divergência do grupo (PORTER *et al.*, 2007) e embora espécies como as do

grupo *A. aff. fasciatus* tenham tido várias populações caracterizadas, torna-se recomendável a utilização de outros marcadores mitocondriais e nucleares (seqüências não transcritas), que poderiam fortalecer os valores de *bootstrap* dos ramos, sobretudo nos de táxons com menor distância genética.

O tempo de divergência do gênero *Astyanax* baseado nos dados apresentados é de aproximadamente 19Ma, mas é possível observar uma radiação considerável nos últimos 5Ma. Eventos como inversões pericêntricas e redistribuição de seqüências heterocromáticas, bem como do gene ribossômico 5S estão relacionados com os processos de especiação de uma considerável parcela deste grupo de peixes. Entretanto, os eventos de rearranjos Robertsonianos relacionados com os processos de divergência observados no clado 1-A parecem ser mais recentes, embora tenham acontecido em uma taxa bastante elevada, permitindo uma ampla variação cariotípica tendo seu início estimado em pouco menos de 1Ma, mas bastante acentuada nos últimos 500 mil anos.

Referências Bibliográficas

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se sumarizadas no final deste volume.

Tabela 9.1 – Espécies e pontos de coleta amostrados no presente trabalho.

Espécie	Proveniência/ Bacia Hidrográfica	Nome do Ponto (pop)	Coordenadas	N
<i>A. aff. bimaculatus</i>	Sete Barras/SP	ad	S 24°18'39"	7
	Ribeira de Iguape		Wo 47°53'30"	
	Cachoeiras de Macacu/RJ	gp	S 22°38'12"	6
	Guapimirim/Rios Costeiros		Wo 42°42'42"	
	Registro/SP	pp	S 24°36'01"	3
	Ribeira de Iguape		Wo 47°52'32"	
<i>A. aff. fasciatus</i>	Salesópolis/SP	sa	S 23°31'23"	41
	Alto rio Tietê		Wo 45°51'42"	
	Pilar do Sul/SP	ps	S 23°48'45"	2
	Paranapanema		Wo 47°42'30"	
	Araras/SP	ar	S 22°22'59"	12
	Mogi-Guaçu/ Paraná		Wo 47°25'49"	
	Angatuba/SP	ag	S 23°32'59"	10
	Paranapanema		Wo 48°30'44"	
	Sete Barras/SP	ad	S 24°18'39"	11
	Ribeira de Iguape		Wo 47°53'30"	
	Ouro Fino/MG	of	S 22°16'58"	2
	Mogi-Guaçu/ Paraná		Wo 46°22'08"	
	Cachoeiras de Emas/SP	ce	S 21°59'45"	12
	Mogi-Guaçu/ Paraná		Wo 47°25'33"	
	Barrinha/SP	ba	S 21°11'38"	6
Mogi-Guaçu/ Paraná		Wo 48°09'50"		
<i>A. aff. janeiroensis</i>	Conchas/SP	--	S 23°02'00"	1
	Médio rio Tietê		Wo 47°02'32"	
<i>A. aff. scabripinnis</i>	São José do rio Preto/SP	--	S 20°49'12"	3
	Grande		Wo 49°22'44"	
<i>A. altiparanae</i>	Indaiatuba/SP	in	S 23°05'39"	3
	Médio rio Tietê		Wo 47°15'37"	
	Salesópolis/SP	sa	S 23°31'23"	21
	Alto rio Tietê		Wo 45°51'42"	
	Pilar do Sul/SP	ps	S 23°48'45"	6
	Paranapanema		Wo 47°42'30"	
	Penápolis - SP	pe	S 21°25'11"	1
Baixo rio Tietê		Wo 50°04'39"		
<i>A. bockmanni</i>	Avaré - SP	rc	S 23°05'55"	3
	Paranapanema		Wo 48°55'32"	
	São Miguel Arcanjo/SP	sm	S 23°54'44"	8
Paranapanema		Wo 47°57'40"		
	Pilar do Sul/SP	ps	S 23°48'45"	7
	Paranapanema		Wo 47°42'30"	
<i>A. giton</i>	Cunha/SP	--	S 22°52'13"	5
	Paraíba do Sul		Wo 44°51'02"	
<i>A. hastatus</i>	Distrito de Ypiranga/RJ	yp	S 22°38'11,6"	22
	Guapimirim/Rios Costeiros		Wo 42°42'42,3"	
	Santana do Japuíba/RJ	pf	S 22°33'39,9"	10
	Guapimirim/Rios Costeiros		Wo 42°40'51,1"	
	Rio Macacu/RJ	pr	S 22°29'06,1"	27
	Guapimirim/Rios Costeiros		Wo 42°39'40,3"	
	Cachoeiras de Macacu/RJ	rm	S 22°27'51,2"	14
	Guapimirim/Rios Costeiros		Wo 42°39'16,5"	

Continua...

Tabela 9.1 – Continuação...

Espécie	Proveniência/ Bacia Hidrográfica	Nome do Ponto (pop)	Coordenadas	N
<i>A. intermedius</i>	Cunha/SP	--	S 22°52'13"	5
	Paraíba do Sul		Wo 44°51'02"	
<i>A. lacustris</i>	Represa Três Marias/MG	--	S 18°12'21"	3
	São Francisco		Wo 45°14'31"	
<i>A. mexicanus</i>	México	--	--	6
<i>A. ribeirae</i>	Registro/SP	pp	S 24°36'01"	4
	Ribeira de Iguape		Wo 47°52'32"	
<i>A. sp.B</i>	Poço Grande/SP	pg	S 24°32'29"	19
	Ribeira de Iguape		Wo 48°30'09"	
<i>A. sp.B</i>	Cór. Sangão – Cascavel/PR	cs	S 25°08'06"	20
	Iguaçu/Paraná		Wo 53°21'37"	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Rio do Oeste – Cascavel/PR	ro	S 25°09'16"	4
	Iguaçu/Paraná		Wo 53°19'41"	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Santana do Japuiba/RJ	--	S 22°33'55.7"	3
	Guapimirim/Rios Costeiros		42°39'47.1"	
<i>Bryconamericus iheringii</i>	Represa Salto Caxias/PR	--	S 25°26'09"	2
	Iguaçu/Paraná		Wo 53°24'28"	
<i>Roeboides occidentalis</i>	Panamá/GenBank	--	--	1
	No. Acesso AF040500			

Tabela 9.2 – Distâncias genéticas entre grupos nominais do gênero *Astyanax*, computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL).

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	d (TN)
1													0.050
2	0.568												0.098
3	0.468	0.330											0.049
4	0.438	0.306	0.047										0.018
5	0.431	0.308	0.033	0.037									0.011
6	0.427	0.323	0.047	0.047	0.026								0.019
7	0.055	0.606	0.480	0.451	0.438	0.447							0.051
8	0.124	0.621	0.533	0.491	0.496	0.485	0.158						0.041
9	0.098	0.580	0.482	0.436	0.446	0.440	0.133	0.044					0.025
10	0.492	0.316	0.311	0.300	0.286	0.313	0.582	0.576	0.541				0.008
11	0.541	0.096	0.341	0.330	0.315	0.325	0.550	0.600	0.555	0.301			0.038
12	0.578	0.067	0.356	0.332	0.334	0.358	0.648	0.652	0.603	0.313	0.072		0.025
13	0.420	0.310	0.031	0.040	0.010	0.026	0.455	0.513	0.467	0.332	0.296	0.360	n/c

1 – *A. hastatus*; 2 – *A. aff. bimaculatus*; 3 – *A. bockmanni*; 4 – *A. aff. fasciatus*; 5 – *A. aff. scabripinnis*; 6 – *Astyanax* sp. B; 7 – *A. ribeirae*; 8 – *A. giton*; 9 – *A. intermedius*; 10 – *A. mexicanus*; 11 – *A. altiparanae*; 12 – *A. lacustris*; 13 – *A. janae*.

d(TN) = distância intrapopulacional estimada pelo método de TAMURA e NEI (1993); n/c = não computado.

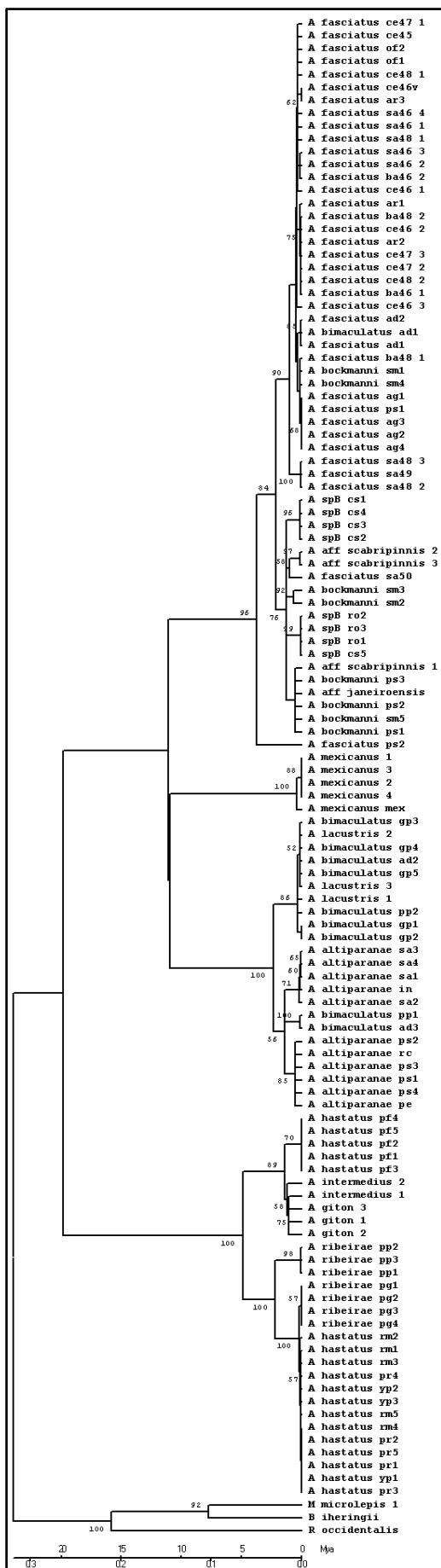


Figura 7.1 - Árvore inferida pelo método de Neighbor-Joining (NJ), em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a filogenia, e assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As distâncias evolutivas foram computadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (MCL) e estão em unidades de número de substituições por sítio. A taxa de variação entre sítios foi modelada usando distribuição gama ($\alpha=0,73$). A calibração do relógio molecular para converter distância em tempo foi aproximadamente 75,443 (tempo/altura do nó). Os Valores de *bootstrap* (100 réplicas) estão próximos dos ramos. Os *gaps* foram tratados como *missing data* e eliminados nas comparações par-a-par (*Pairwise deletion option*). A soma do comprimento dos ramos foi de 2,268.

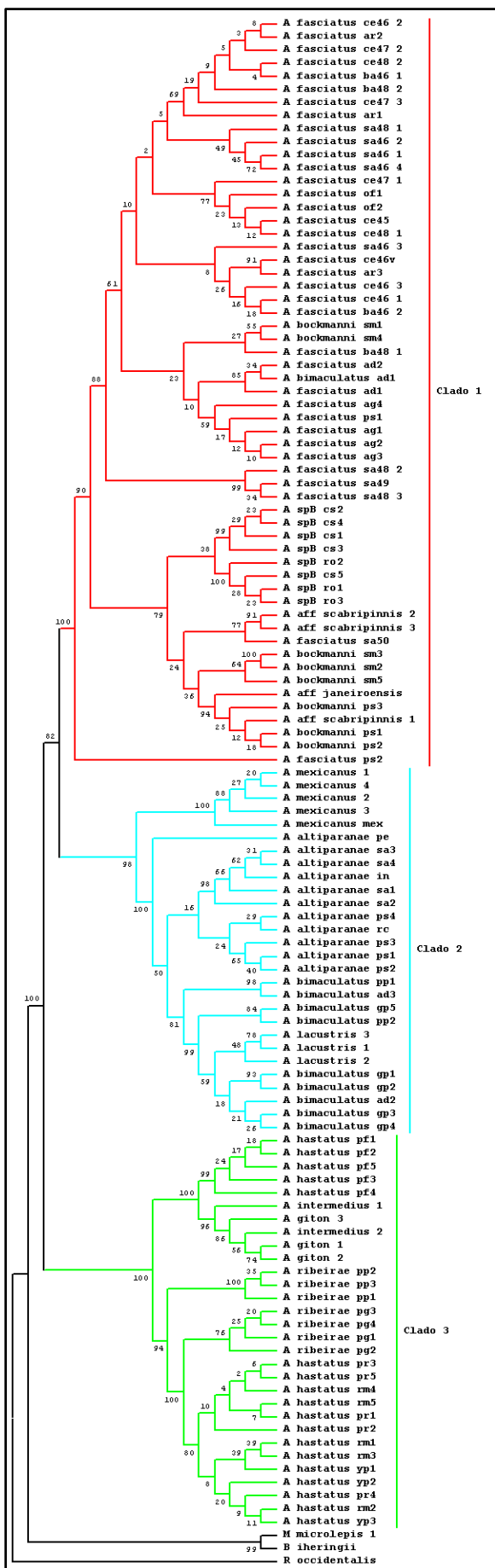


Figura 9.2 - Árvore consenso de 104 mais parcimoniosas, construída pelo método de máxima parcimônia (MP) (número de passos = 1562), mostrando as relações evolutivas da região ATPase6/8 entre 118 indivíduos: Índice de Consistência (IC) = 0,535131; Índice de Retenção (IR) = 0,937476. Os Valores de *bootstrap* (100 réplicas) estão próximos dos ramos. Os *gaps* foram tratados como *missing data*.

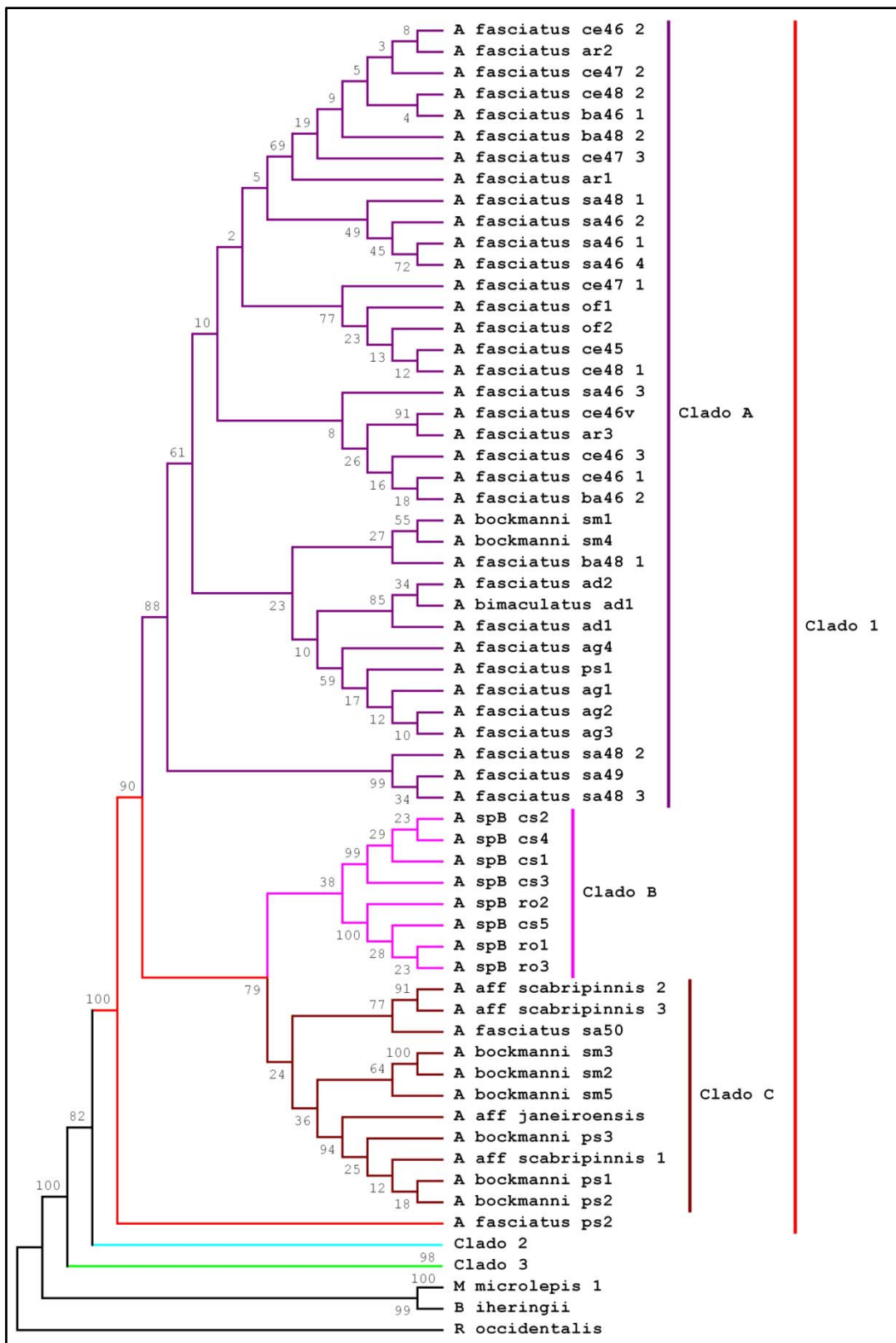


Figura 9.3 - Clado 1 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP), mostrando as relações evolutivas entre os “lambaris de rabo vermelho”.

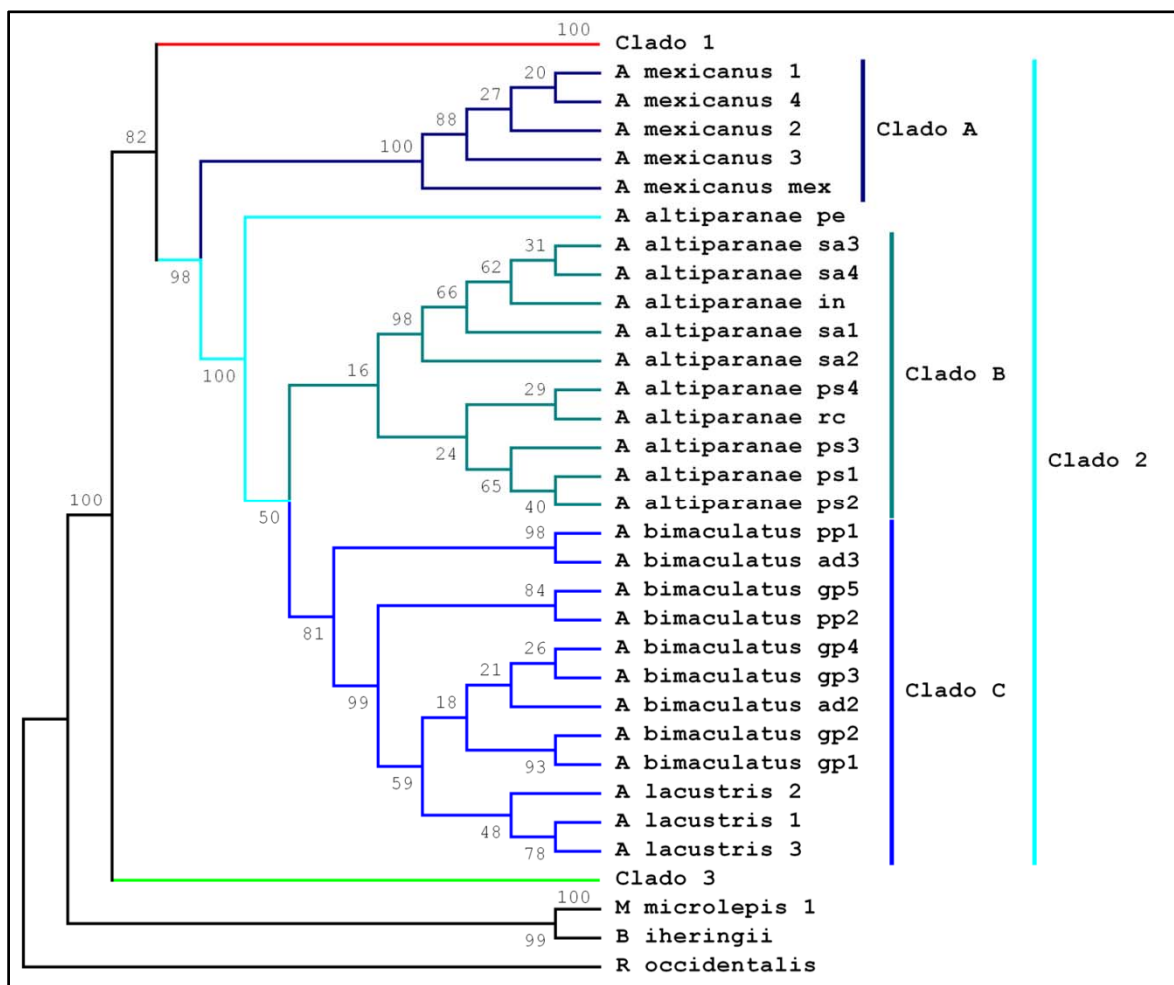


Figura 9.4 - Clado 2 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP), mostrando as relações evolutivas entre os "lambaris de rabo amarelo".

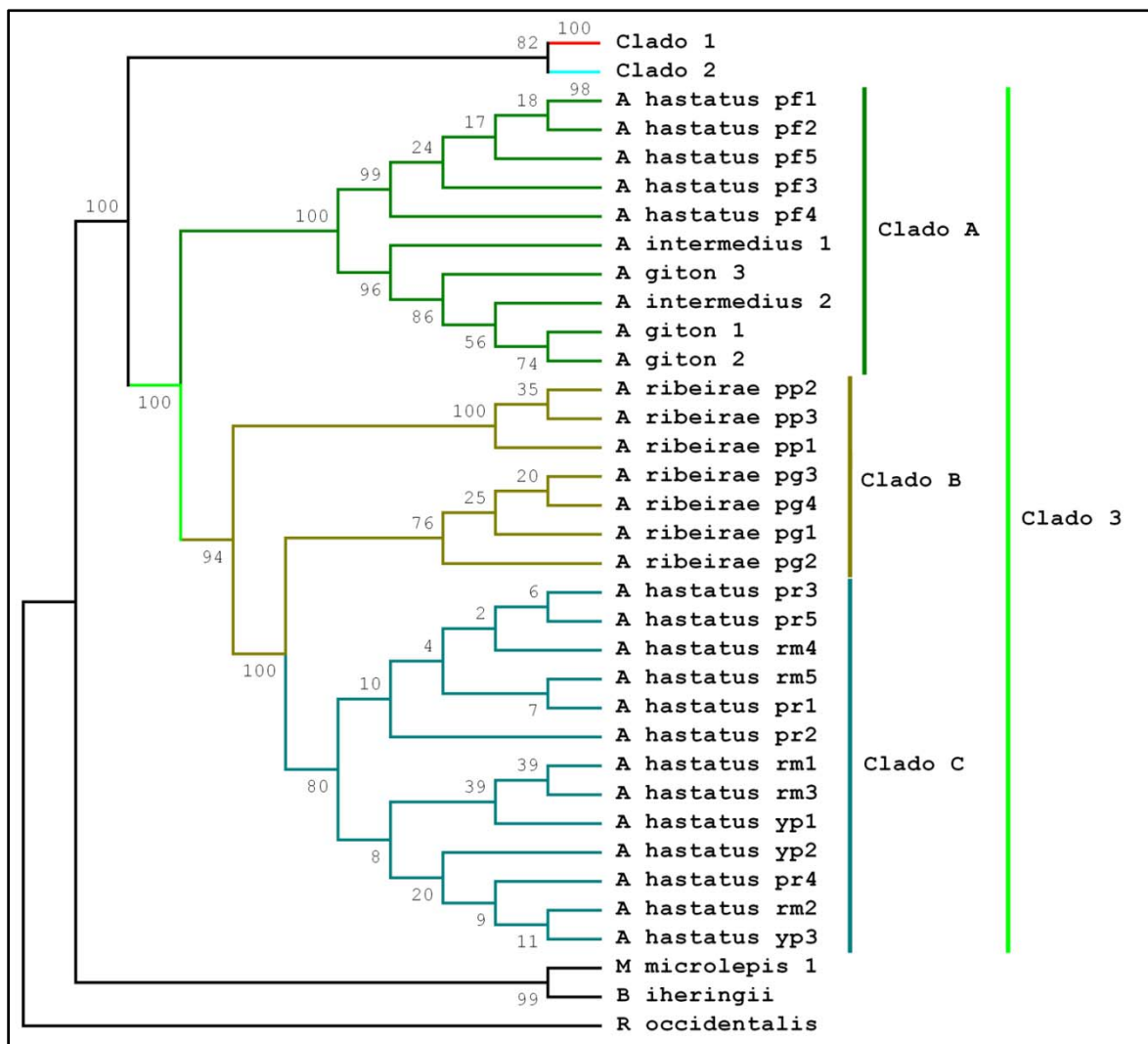
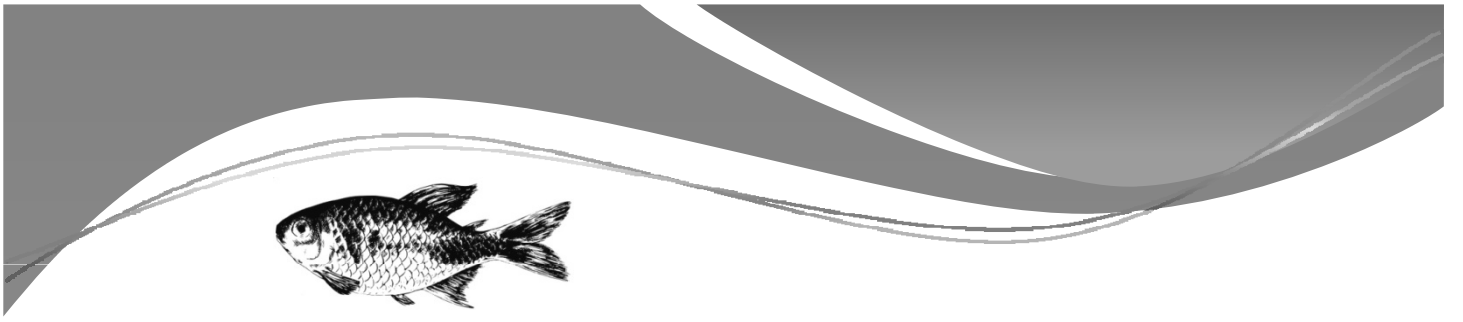


Figura 9.5 - Clado 3 da árvore consenso construída pelo método de máxima parcimônia (MP), mostrando as relações evolutivas entre os lambaris da drenagem costeira.



Capítulo 10

Capítulo X

Conclusões – Padrões e processos evolutivos observados no gênero *Astyanax*

Através do presente trabalho foram inferidas relações evolutivas com base em caracteres cromossômicos e moleculares, dentro e entre diferentes espécies do gênero *Astyanax*. Embora seja um grupo especioso e amplamente distribuído, as espécies encontradas no sudeste brasileiro parecem ser evolutivamente relacionadas, embora *clusters* possam ser identificados separando os lambaris de ocorrência na drenagem costeira dos da drenagem interiorana. Esta ainda pode ser subdivida conforme o padrão de coloração usualmente observado nas nadadeiras dos exemplares analisados em “lambaris de rabo amarelo” e “lambaris de rabo vermelho”. O grupo é de divergência recente e ao menos *A. aff. fasciatus* indica possuir grande radiação adaptativa. Este grupo parece estar em franco processo de especiação.

São apresentados oito capítulos relatando os resultados, agrupados por espécies nominais ou grupos relacionados. Nos Capítulos II a VI são apresentados exclusivamente dados citogenéticos de *A. mexicanus*, *A. bockmanni*, *A. hastatus*, *A. ribeirae* e *A. aff. fasciatus*. Nos Capítulos VII e VIII a abordagem filogeográfica é somada aos estudos cromossômicos para os grupos *A. aff. fasciatus* e *A. altiparanae-bimaculatus*. O Capítulo IX refere-se às relações evolutivas identificadas com base no seqüenciamento de uma região do genoma mitocondrial destas e de algumas outras espécies do gênero, sob a luz das tendências de evolução cromossômica verificadas previamente no grupo. A seguir são listadas algumas conclusões obtidas no presente estudo.

10.1 Os *Astyanax* da drenagem costeira

Os dados citogenéticos disponíveis para espécies de distribuição costeira do sudeste brasileiro eram praticamente restritos à drenagem dos rios Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul. Entretanto, o conjunto de drenagens isoladas dos rios Costeiros, como os que permeiam o leste do Estado do Rio de Janeiro abrigam uma rica fauna, praticamente desconhecida do ponto de vista genético. Através da análise citogenética e molecular de espécies provenientes das bacias dos rios Ribeira de Iguape (SP) e Guapimirim (RJ), ambas pertencentes ao sistema de drenagem dos Rios Costeiros, foi possível observar que:

- *Astyanax hastatus* compõe em um grupo de espécies sob uma mesma denominação específica, a exemplo do que ocorre em outros grupos do gênero. Embora suas populações possuam números cromossômicos semelhantes ($2n=50$), há dois grupos haplotípicos e três citótipos (compostos por diferentes fórmulas cariotípicas) distribuídos pelos quatro pontos de coleta amostrados no presente trabalho. O citótipo B se mantém isolado e parafilético aos demais citótipos (A e C), que compartilham haplótipos intimamente relacionados. Os padrões cariotípicos dos citótipos A e C também é bastante semelhante, e através dos dados moleculares e cromossômicos pode-se inferir que a divergência destes dois citótipos é mais recente que a do citótipo B, com o qual não há mais compartilhamento de haplótipos.
- *Astyanax ribeirae* é endêmico da bacia do rio Ribeira de Iguape e portador de cariótipo único no gênero, com localização do gene ribossômico 5S bastante característica. Embora não tenha apresentado características citogenéticas conflitantes com relação às diferentes populações estudadas, mostra-se como

um grupo com dois clados parafiléticos, o que sugere a existência de pelo menos duas diferentes espécies denominadas “*A. ribeirae*”. O pequeno número de exemplares analisados de um destes pontos pode produzir essa descontinuidade entre os dados cromossômicos e moleculares. Assim como observado para *A. hastatus*, a distribuição geográfica da espécie parece influenciar nos processos evolutivos que têm atuado neste grupo.

- *Astyanax* aff. *bimaculatus* da região costeira do sudeste brasileiro apresenta muitas características citogenéticas bastante próximas de seu grupo irmão *A. altiparanae*, como a localização dos genes de rDNA 5S, número cromossômico, padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, etc. Mostra-se como um grupo homogêneo em relação às duas populações amostradas na região (rio Ribeira de Iguape e rio Guapimirim), que mantém haplótipos próximos, formando um clado assimétrico, porém monofilético.
- *Astyanax* aff. *fasciatus* do rio Ribeira de Iguape apresentou características bastante divergentes das identificadas nas demais populações estudadas. Sua constituição cariotípica é única, embora tenha um dos números diplóides padrão do grupo. Também diverge de todos os demais *A. aff. fasciatus* pela quantidade de sítios de rDNA 5S e pela presença de apenas dois *clusters* do satDNA As-51, enquanto outras populações chegam a ter nove pares cromossômicos portadores desse DNA repetitivo. Os dados moleculares também indicam o distanciamento genético maior com relação aos citótipos provenientes de outras bacias hidrográficas, do que internamente.
- *Astyanax giton* e *Astyanax intermedius* agrupam-se num clado monofilético, não havendo forte estruturação separando os grupos nominais. Isso pode ser reflexo do

pequeno tempo de divergência entre as duas espécies, que é corroborada por análises citogenéticas prévias que atestam sua proximidade.

10.2 Os *Astyanax* das drenagens circunvizinhas ao sistema dos Rios Costeiros

A bacia costeira mantém um relacionamento próximo com as bacias que a circundam. Eventos geológicos, que mudam a conformação e fisiologia dos sistemas de drenagem, impõem às espécies de peixes processos como *bottleneck*, dispersão, e vicariância, entre outros. Estes eventos foram relativamente comuns na região da costa brasileira, área recortada pela presença de um imponente conjunto de montanhas, a Serra do Mar, o que resultou nos padrões biogeográficos de distribuição da ictiofauna. Estudando esta fauna pode-se observar que:

- *Astyanax bockmanni* possui uma assembléia de características citogenéticas conflitantes com relação às demais espécies do gênero, sobretudo com relação ao grupo *A. aff. fasciatus*, e com outros “lambaris de rabo vermelho” com $2n=50$ cromossomos, com os quais mantém íntimo parentesco segundo a evolução molecular. Embora possua o número e padrão de distribuição do rDNA 5S observado nos *A. aff. fasciatus*, não apresenta homologia com o satDNA As-51 e apresenta quantidade equivalente de tipos cromossômicos, caráter pouco comum no grupo com o qual se agrupa.
- *Astyanax altiparanae* dos rios Tietê e Paranapanema apresentam cariótipos diferentes, porém semelhantes. São também relacionados com *A. aff. bimaculatus* da drenagem costeira, com os quais se assemelham na conservação do número e localização de sítios do gene ribossômico 5S. A divergência dos cariótipos de cada população refere-se basicamente às fórmulas cariotípicas distintas e à presença de múltiplos e pequenos sítios do

satDNA As-51 nos exemplares do Paranapanema, enquanto na população do rio Tietê verifica-se apenas um par contendo esta seqüência. O grupo é monofilético e aparece fortemente estruturado nas análises moleculares.

▀ *Astyanax* aff. *fasciatus* é grupo complexo e de alta variabilidade cromossômica, como já observado previamente. Entretanto, pela primeira vez é verificada a ocorrência de três diferentes citótipos padrão ($2n=46$, 48 e 50 cromossomos) em simpatria. A população de Salesópolis mostra um número menor de sítios do satDNA As-51 do que as populações mais interioranas, porém maior que o observado nos exemplares de distribuição costeira. É observado, a partir da reunião destes dados cromossômicos um padrão biogeográfico. Os dados moleculares mostram que o grupo tem uma das divergências mais recentes dentre os Characidae, uma vez que a distância genética entre os indivíduos não é expressiva, e há agrupamentos haplotípicos bastante heterogêneos com relação aos dados cromossômicos. Os agrupamentos tendem a corresponder a áreas geográficas, porém em alguns casos a divergência de haplótipos dentro de uma mesma bacia pode ser maior que entre diferentes bacias, e em alguns casos padrões cromossômicos estão de acordo com os agrupamentos haplotípicos.

▀ *Astyanax* sp. B deve ser monofilético, mostrando indícios de estruturação populacional. As duas populações analisadas aparecem em subclados separados na árvore evolutiva, embora haja compartilhamento de um haplótipo do Córrego Sangão no grupo do Rio do Oeste. Esta espécie, proveniente do rio Iguaçu, se agrupa com os demais “lambaris de rabo vermelho” e portadores de $2n=50$ cromossomos.

- ▀ *Astyanax* aff. *janeiroensis* e *Astyanax* aff. *scabripinnis* também agrupam com outros “lambaris de rabo vermelho”, embora não tenham essa característica morfológica. Uma vez que normalmente ocorrem em simpatria com populações de *A. aff. fasciatus*, podem portar genoma mitocondrial desta espécie por algum evento de introgressão ou hibridismo no passado.
- ▀ *Astyanax lacustris* do rio São Francisco é intimamente relacionado com *A. aff. bimaculatus* da drenagem costeira, a despeito da maior proximidade de sua região de origem com a bacia do rio Paraná. Embora esteja no mesmo subclado de *A. altiparanae*, este aparece como um grupo fortemente estruturado, ao contrário dos *A. aff. bimaculatus*. De acordo com os dados da literatura e com os dados obtidos no presente trabalho para *A. altiparanae* e *A. aff. bimaculatus*, verifica-se que *A. lacustris* possui características citogenéticas conservadas, como o número diplóide e a distribuição do gene ribossômico 5S.

10.3 Demais espécies utilizadas nas análises

Foram utilizadas nas análises mitocondriais algumas espécies de outros gêneros, como *Roeboides occidentalis* (cuja seqüência foi obtida a partir do *GenBank*), *Mimagoniates microlepis* da drenagem dos rios Costeiros e *Bryconamericus iheringii* do rio Iguaçu. Essas espécies se mostraram suficientemente distantes de *Astyanax* para a construção de uma árvore que permitiu identificar a monofilia das espécies analisadas. Foi ainda analisada uma espécie exótica, de distribuição na América Central, *Astyanax mexicanus*.

A ausência de dados cromossômicos atuais, que pudessem ajudar na associação de dados citogenéticos e moleculares e nas comparações com as demais espécies, de distribuição sul-americana, exigiu a devida caracterização citogenética de

A. mexicanus. Os exemplares foram obtidos em lojas especializadas e mostraram ser aparentados, possuindo baixa diversidade haplotípica. Foi observada ainda a existência de microcromossomos B nestes indivíduos, além da presença do satDNA As-51. A espécie mostrou relacionamento maior com os “lambaris de rabo amarelo” do que com o grupo sob o qual foi mantido como subespécie durante muitos anos, *A. aff. fasciatus*. Dados cromossômicos como a presença de pequenos sítios do satDNA As-51 e escassa heterocromatina constitutiva corroboram o posicionamento de *A. mexicanus* como grupo irmão do clado que abrange os “lambris de rabo amarelo”.

10.4 A abordagem multidisciplinar e sua contribuição à biologia evolutiva dos *Astyanax*

Trabalhos que empreguem abordagens morfológicas, bioquímicas, etológicas, genéticas e citológicas, etc., naturalmente tendem a contribuir de forma mais robusta para o estudo de relacionamentos evolutivos, uma vez que a dinâmica evolutiva depende de dois fatores principais: variação pré-existente e influência ambiental em eventos seletivos ou estocásticos. Mesmo a associação de diferentes domínios de uma mesma área, como a citogenética e a genética molecular, potencialmente mostra-se mais adequada do que abordagens limitadas a uma interface apenas.

A utilização de dados cromossômicos associados às informações sobre a história evolutiva dos grupos, fornecida através das análises de DNA, com o devido suporte da morfologia, tem sido empregada timidamente, embora possua grande potencial para resolução de problemas nas relações evolutivas entre grupos de espécies crípticas, por exemplo. No gênero *Astyanax* esta abordagem mostrou-se bastante eficaz, dando maior suporte aos dados cromossômicos e fornecendo um paralelo nuclear para análises mitocondriais, que constituem um requisito para a

inferência de alguns processos evolutivos. Desta forma, conclui-se que a abordagem associada entre diferentes frentes de caracterização genética dos grupos pode contribuir para o delineamento da história natural dos organismos, sobretudo dos de difícil classificação taxonômica e grande diversidade cariotípica, como são os pequenos lambaris do gênero *Astyanax*.

Referências Bibliográficas

- AB'SABER NA (1957) O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e Tietê. *Bol Paul Geogr* 26:38-49.
- ABEL LDS, MANTOVANI M, MOREIRA-FILHO O (2006) Chromosomal distribution of the As-51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 29: 448-452.
- AGOSTINHO AA, JÚLIO JR. HF (1999) Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In: Lowe-McConnell, RH. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP, São Paulo-SP, 536p.
- ALMEIDA FFM, CARNEIRO CDR (1998) Origem e evolução da Serra do Mar. *Rev Bras Geociências* 28: 135-150.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F, PÉQUIGNOT EV, DANIEL-SILVA MFZ (2001) XX/XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropical electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenet Cell Genet* 95: 73-78.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F, TOLEDO-FILHO SA (1984) Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica* 64: 165-169.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F, TOLEDO-FILHO SA (1985) Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica* 66: 85-88.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, OZOUF-COSTAZ C, FORESTI F, BONILLO C, PORTO-FORESTI F, DANIEL-SILVA MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 97: 229-233.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, STOCKER AJ, FORESTI F, TOLEDO-FILHO SA (1996) Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Res* 4: 301-305.
- ALMEIDA-TOLEDO LF, VIEGAS-PÉQUIGNOT E, FORESTI F, TOLEDO-FILHO AS, DUTRILLAUX B (1988) BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet Cell Genet* 48: 117-120.
- ALVES-GOMES J, ORTÍ G, HAYGOOD M, HEILIGENBERG W, MEYER A (1995) Phylogenetic analysis of the South American Electric Fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol Biol Evol* 12: 298-318.
- AMEMIYA CT, GOLD JR (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1986: 226-231.
- ARAUJO FG, SANTOS LN (2001) Distribution of fish assemblages in Lajes Reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Biol* 61:563-576.
- ARTONI RF, SHIBATTA OA, GROSS MC, SCHNEIDER CH, ALMEIDA MC, VICARI MR, BERTOLLO LAC (2006) *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotrop Ichthyol* 4(2): 197-202.

- AVISE JC, (2004) Molecular markers, natural history and evolution. 2 ed. Sinauer, Sunderland, U.S.A.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- AVISE JC, SELANDER RK (1972) Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* 26: 1-19.
- BERMINGHAM E, MARTIN AP (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol Ecol* 7: 499-517.
- BERTACO VA, GARUTTI V (2006) New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotrop Ichthyol* 5: 25-30.
- BERTACO VA, LUCENA CAS (2006) Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotrop Ichthyol* 4: 53-60.
- BERTACO VA, LUCINDA PHF (2005) *Astyanax elachylepis*, a new characidae fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei: Characidae). *Neotrop Ichthyol* 3: 389-394.
- BERTACO VA, MALABARBA LR (2001) Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the "*A. scabripinnis* species complex". *Ichthyol Explor Freshw* 12: 221-234.
- BERTOLLO LAC, BORN GG, DERGAM JA, FENOCCHIO AS, MOREIRA-FILHO O (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* 8: 603-613.
- BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O, GALETTI JR. PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 28: 153-159.
- BERTOLLO LAC, OLIVEIRA C, MOLINA WF, MARGARIDO VP, FONTES MS, PASTORI, MC, FALCÃO JN, FENOCCHIO AS (2004) Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93: 228-233.
- BERTOLLO LAC, TAKAHASHI CS, MOREIRA-FILHO O (1979) Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 2: 17-37.
- BIZERRIL CRSF (1994) Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biol Leopoldensia* 16: 51-80.
- BOORE JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767-1780.
- BORN GG, BERTOLLO LAC (2000) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias Malabaricus*. Cytotypes with 2n = 42 chromosomes. *Genetica* 110: 1-9.
- BOROWSKY R, WILKENS H (2002) Mapping a cave fish genome: polygenic systems and regressive evolution. *J Hered* 93: 19-21.

BRITSKI HA, SATO Y, ROSA ABS (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3a. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 115p.

BURCHER CL, MCTAMMANY ME, BENFIELD EF, HELFMAN GS (2008) Fish assemblage responses to forest cover. *Environ Manag* (2008) 41: 336–346.

CALCAGNOTTO D, SCHAEFER SA, DESALLE R (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 36: 135-153.

CARVALHO ML, OLIVEIRA C, FORESTI F (2002) Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia* 55: 181-188.

CASALS F, NAVARRO A (2007) Chromosomal evolution: inversions: the chicken or the egg? *Heredity* 99(5): 479-480.

CASTRO RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASHI EP, MAZZONI R PERES-NETO PR (eds) *Ecologia de Peixes de Riachos*. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 139-155.

CASTRO RMC, MENEZES CA (1996) Estudo da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In: *Workshop: Basis to the Conservation of Biodiversity within the State of São Paulo*. Serra Negra, SP, Brazil.

CASTRO RMC, VARI RP (2004) *Astyanax biotae*, a new species of stream fish from the rio Paranapanema basin, upper Rio Paraná system, southeastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Proc Biol Soc Washington* 117: 330-338.

CENTOFANTE L, BERTOLLO LAC, JUSTI AJ, MOREIRA-FILHO O (2003) Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 14: 361-368.

CHANG Y-S, HUANG F-L, LO T-B (1994) The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J Mol Evol* 38: 138-155.

DANIEL-SILVA MFZ (1996) Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

DANIEL-SILVA MFZ, ALMEIDA-TOLEDO LF (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia* 54: 209-215.

DANIEL-SILVA MFZ, ALMEIDA-TOLEDO LF (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenet Genome Res* 109: 497-501.

DERGAM JA, BERTOLLO LAC (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basin, Brazil. *Brazil J Genet* 13: 755–766.

- DEUMLING B, GREILHUBER J (1982) Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84: 535–555.
- DOBIGNY G, OZOUF-COSTAZ C, BONILLO C, VOLOBOUEV V (2002) “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenet Genome Res* 98: 75–77.
- DOBZHANSKY T (1950) Evolution in the tropics. *American Scientist* 38: 209–221.
- DOMINGUES MS, VICARI MV, ABILHOA V, WAMSER JP, CESTARI MM, BERTOLLO LAC, ALMEIDA MC, ARTONI RF (2007) Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin Neotrop *Ichthyol* 5: 37–44.
- DOWLING TE, MARTASIAN, DP, JEFFERY WR (2005) Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Mol Biol Evol* 19: 446–455.
- EIGENMANN CH (1917) The American Characidae. Part 1. Cambridge - *Mem Mus Comp Zool* 43:1–102.
- EIGENMANN CH (1921) The American Characidae. Part 3. Cambridge - *Mem Mus Comp Zool* 43: 209–310.
- FAZOLI LC, SILVA VAB, PORTELA-CASTRO ALB, JÚLIO JR. HF (2003) Chromosome characterization of *Astyanax* sp. B (Characidae, Tetragonopterinae), an endemic species of the Iguaçu river, Paraná, Brazil *Cytologia* 68: 389–394.
- FELSENSTEIN J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 141: 328–332.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the river Ivai basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124: 301–306.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2006a) Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivai river basin, State of Paraná, Brazil. *Caryologia* 59: 253–259.
- FERNANDES CA, MARTINS-SANTOS IC (2006b) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil *Genet Mol Biol* 29: 464–468.
- FERREIRA IA, OLIVEIRA C, VENERE PC, GALETTI JR. PM, MARTINS C (2007) 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica* 129: 253–257.
- FERRO DAM, NÉO DM, MOREIRA-FILHO O, Bertollo LAC (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55–62.
- FUNK DJ, OMLAND KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 397–423.

- FUTUYMA D (1997) *Biologia evolutiva*. 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto SP, Brazil.
- FUTUYMA D, MEYER GC (1980) Non-allopatric speciation in animals. *Syst Zool* 29: 254-271.
- GALINDO BA, SILVA CAM, MARTINEZ CBR, SOFIA SH (2002) Variabilidade genética de *Astyanax altiparanae* em dois lagos no perímetro urbano de Londrina-PR. In: 48o Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. CD-ROM.
- GARUTTI V (1995) Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha do pedúnculo caudal estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônia. Tese (Livre docência em Zoologia – Vertebrados). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP.
- GARUTTI V (1998) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. *Iheringia Ser Zool* 85: 115-122.
- GARUTTI V, BRITSKI HA (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Ser Zool* 13:65-88.
- GÉRY J (1977) *Characoids of the world*. TFH Publications, USA, 1977.
- GOLD JR, LI C, SHIPLEY NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol* 37: 563-575.
- GROSS MC, SCHNEIDER CE, MATIELLO MCA, LEITE ML, BERTOLLO LAC, ARTONI RF (2004) Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish Population (Characidae). *Genet Mol Biol* 27: 529-535.
- GUO X, LIU S, LIU Y (2006) Evidence for recombination of mitochondrial dna in triploid crucian carp. *Genetics* 172: 1745-1749.
- HALUCH CF, ABILHOA V (2005) *Astyanax totae*, a new characid species (Teleostei, Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 3: 383-388.
- HATANAKA T, GALETTI PM JR (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- HATTORI RS, DANIEL-SILVA MFZ, ALMEIDA-TOLEDO LF (2007) Karyotype characterization and gene mapping of 5S and 18S rDNA in three species of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae). *Caryologia* 60: 372-378.
- HERAS MP (1998) Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de rios do Brasil. MSc Thesis – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- HILSDORF AWS, AZEREDO-ESPIN AML, KRIEGER MH (2002) Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul basin, Brasil. *Aquaculture* 214: 81-91.
- HOARAU G, HOLLA S, LESCASSE R, STAM WT, OLSEN JE (2002) heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol Biol Evol* 19: 2261-2264.

INOUE JG, MIYA M, TSUKAMOTO K, NISHIDA M (2001) Complete mitochondrial DNA sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for Anguilliform families. *J Mol Evol* 52: 311-320.

ISAAC NJB, MALLET J, MACE GM (2004) Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends Ecol Evol* 19(9): 464-469.

JEFFERY WR (2001) Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Develop Biol* 231: 1-12.

JEFFERY WR (2005) In Special Feature – Roundtable discussion: fish model for studying adaptive evolution and speciation. KOCHER TD, JEFFERY WR, PARICHY DM, PEICHEL CL, STREELMAN JT, THORGAARD GH. *Zebrafish* 2: 147-156.

JEFFERY WR, STRICKLER AG, YAMAMOTO Y (2003) To see or not to see: evolution of eye degeneration in mexican blind cavefish. *Integ Comp Biol* 43: 531-541.

JIN SN, TOLEDO V (1975) Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciênc Cult* 27: 1122-1124.

JOHANSEN H, GUDDAL PH, JOHANSEN T (1990) Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res* 18: 411-419.

JULIO JR. HF, BONECKER CC, AGOSTINHO AA (1997) O reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In: ANGELO AA, LUIZ CG (Org) O reservatório de segredo. Bases ecológicas para o manejo. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual De Maringá, p1-17.

JUSTI AJ (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. MSc Thesis – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

KANTEK DLZ, FENOCCHIO AS, CESTARI MM (2003) Cytogenetic characterization and NOR polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from the First Plateau of the Iguaçu River (Paraná State, Brazil). *Cytologia* 68(1): 19-24.

KANTEK DLZ, NOLETO RB, FENOCCHIO AS, CESTARI MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu river basin. *Braz Arch Biol Technol* 50: 67-74.

KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF (2007) Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4: 103-111.

KAVALCO KF, MOREIRA-FILHO O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia* 56: 453-461.

KAVALCO KF, PAZZA R (2004) A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. *Genet Mol Biol* 27: 196-198.

KAVALCO KF, PAZZA R, ALMEIDA-TOLEDO LF (2006) Estudos citogenéticos em *Astyanax*. II. Distribuição do DNA satélite As-51 em cinco populações de *Astyanax fasciatus*. In: I International Congress of Fish Genetics - XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, São Carlos – SP, Brazil, pp 174.

KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, Moreira-Filho O (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet Genome Res* 106: 107-110.

KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, Moreira-Filho O (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* 124: 85-91.

KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, Moreira-Filho O (2007) Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 30, 329-335.

KIRBY RF, THOMPSON KW, HUBBS CL (1977) Karyotypic similarities between the mexican and blind tetras. *Copeia* 1977: 578-580.

KIRKPATRICK M, BARTON N (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* 173: 419-434.

KON T, YOSHINO T, MUKAI T, NISHIDA M (2007) DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: a lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Mol Phylogenet Evol* 44: 53-62.

LANGECKER TG, WILKENS H, JUNGE P (1991) Introgressive hybridization in the Pachon cave population of *Astyanax fasciatus*. *Ichthyol Explor Freshwat* 2: 209-212.

LEUZZI MSP, ALMEIDA FS, ORSI ML, SODRÉ LMK (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genet Mol Biol* 27: 355-362.

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

LIMA FCT, MALABARBA LR, BUCKUP PA, SILVA JFP, VARI RP, HAROLD A, BENINE R, OYAKAWA OT, PAVANELLI CS, MENEZES NA, LUCENA CAS, MALABARBA MCSL, LUCENA ZMS, REIS RE, LANGEANI F, CASSATI L, BERTACO VA, MOREIRA C, LUCINDA PHF (2003) Genera *incertae sedis* in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. REIS RE, KULLANDER SO, FERRARIS JR CJ, (eds), pp. 729, EDIPUCRS: Porto Alegre-RS, Brazil.

LIMA FCT, ZUANON J (2004) A new species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the rapids of the lower rio Xingu, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 2: 117-122.

LOWE-MCCONNELL RH (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. *Biol J Linnean Soc* 1: 51-75.

LOWE-MCCONNELL RH (1999) Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP, São Paulo-SP, 536p.

LUNDBERG JG (1998) The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: MALABARBA LR, REIS RE, VARI RP et al (eds) Phylogeny and classification of neotropical fishes. EDIPUCRS: Porto Alegre-RS, Brazil, pp 161-170.

MABUCHI K, MIYA M, SATOH TP, WESTNEAT MW, NISHIDA M (2004) Gene rearrangements and evolution of tRNA pseudogenes in the mitochondrial genome of the parrotfish (Teleostei: Perciformes: Scaridae). *J Mol Evol* 59: 287-297.

- MAISTRO EL, OLIVEIRA C, FORESTI F (1998) Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) Genet Mol Biol 21: 201-206.
- MAISTRO EL, OLIVEIRA C, FORESTI F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) Genet Mol Biol 23: 365-369.
- MALACRIDA ACCP, DIAS AL, GIULIANO-CAETANO, L (2003) Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river basin-PR. Cytologia 68: 267-270.
- MALLET J (1995) A species definition for the modern synthesis. Trends Ecol Evol 10: 294-299.
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MESTRINER CA, MOREIRA-FILHO O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. Genetica 109: 161-168.
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MOREIRA-FILHO O (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Genet Mol Biol 27: 536-542.
- MANTOVANI M, ABEL LDS, MOREIRA-FILHO O (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Genetica 123: 211-216.
- MARTINS C, GALETTI JR. PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Res 7: 363-367.
- MARTINS C, GALETTI JR. PM (2001a) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? Genetica 111: 439-446.
- MARTINS C, GALETTI JR. PM (2001b) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. Genome 44: 903-910.
- MARTINS C, WASKO AP, OLIVEIRA C, PORTO-FORESTI F, PARISE-MALTEMPI PP, WRIGHT JM, FORESTI F (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. Cytogenet Genome Res 98: 78-85.
- MATOSO DA (2003). Análise da diversidade genética e estrutura populacional em *Astyanax* sp. do Parque Estadual de Vila Velha e cabeceira do rio Tibagi. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- MAYR B, KALAT M, RAB P (1985) Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). Genetica 67: 51-56.
- MAYR E (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- MAYR E (1963) Animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- MAYR E (1969) The biological meaning of species. Biol J Linn Soc 1: 331-320.
- MCPHAIL JD, JONES RL (1966) A simple technique for obtaining chromosome for teleost fishes. J Fish Res Bd Canada 23: 767.

MCPHAIL JD, LINDSEY CC (1970) Freshwater fishes of northwestern Canada and Alaska. Bull. Fish Res Bd Can 173. 381 pp.

MEDRADO AS, FIGUEIREDO AVA, WALDSCHMIDT AM, AFFONSO PRAM, CARNEIRO PLS (2008) Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. Genet Mol Biol 31: 208-214.

MELO FAG (2001) Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro. Arq Mus Nac 59: 1-46.

MELO FAG, BUCKUP PA (2006) *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei, Characiformes). Neotrop Ichthyol 4: 45-52.

MESTRINER CA, GALETTI JR. PM, VALENTINI SR, RUIZ IRG, ABEL LDS, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity 85: 1-9.

MITCHELL RW, RUSSEL WH, ELLIOTT WR (1977) Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution and evolution. Spec Publ Mus Tex Techn Univ 12: 1-89.

MIYA M, TAKESHIMA H, ENDO H, ISHIGURO NB, INOUE JG, MUKAI T, SATOH TP, YAMAGUCHI M, KAWAGUCHI A, MABUCHI K, SHIRAI SM, NISHIDA M (2003) Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Mol Phylog Evol 26: 121-138.

MIYA R, KAWAGUCHI A, NISHIDA M (2001) Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. Mol Biol Evol 18: 1993-2009.

MIYA R, NISHIDA M (1999) Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. Mar Biotechnol 1: 416-426.

MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1997) Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Hereditas 127: 249-253.

MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1998a) Activation patterns of the nucleolar organizer region in *Astyanax scabripinnis* populations (Pisces, Characidae). Cytologia, 63: 259-265.

MIZOGUCHI SMHN, MARTINS-SANTOS IC (1998b) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. Genet Mol Biol 21: 55-61.

MMA (2000) Avaliação de ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Eds: Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas-MG. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/SBF. 40p.

MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Genet Mol Biol 14: 331-357.

MOREIRA-FILHO O, BUCKUP PA (2005) A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. Neotrop Ichthyol 3:449-452.

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

MOREIRA-FILHO O, GALETTI JR. PM, BERTOLLO LAC (2004) B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 106: 230-234.

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

MOYSÉS CB (2005) Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MOYSÉS CB, ALMEIDA-TOLEDO LF (2002) Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 25: 401-407.

NAVARRO A, BARTON NH (2003). Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution* 57(3): 447-459.

NEI M, KUMAR S (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, USA. 333pp.

NELSON JC (1999) Editorial and introduction: the species concept in fish biology. *Rev Fish Biol Fisheries* 9: 277-280.

NELSON JS (1994) *Fishes of the World*. (third ed.), Wiley, New York.

NÉO DM, BERTOLLO LAC MOREIRA-FILHO O (2000a) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108: 211-215.

NÉO DM, MOREIRA-FILHO O, CAMACHO JPM (2000b) Altitudinal cline revealing the parasitic nature of B chromosomes in Brazilian natural populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 85: 136-141.

ORSI ML, CARVALHO ED, FORESTI F (2004) Biologia populacional de *A. altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Paranapamena, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 21: 207-218.

ORTÍ G, MEYER A (1997) The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systemat Biol* 46: 75-100.

ORTÍ G, PETRY P, PORTO JIR, JÉQU M, MEYER (1996) Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol Evol* 42: 169-182.

OYAKAWA OT, AKAMA A, MAUTARI KC, NOLASCO JC (2006) Peixes de riachos da Mata Atlântica. Neotropica, São Paulo-SP. 201pp.

PACHECO RB, GIULIANO-CAETANO L, DIAS AL (2001) Cytotypes and multiple NORs in and *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chrom Sci* 5: 109-114.

- PAGANELLI HH (1990) Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referência à *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Considerações citotaxonômicas e evolutivas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- PAGE RDM, HOLMES EC (1998) Molecular Evolution: a phylogenetic approach. Malden, MA, USA: Blackwell Science Publishing, 346p.
- PAIVA MP (1982) As grandes represas do Brasil. Brasília: Editerra, 304p.
- PAIVA SR, DERGAM JA, ANDRADE FM, PIRES AV (2001) Divergência de populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae) na bacia do rio Doce-MG: uma abordagem molecular e morfológica. In: 47o Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. CD-ROM.
- PANARAM K, BOROWSKY R (2005) Gene flow and genetic variability in cave and surface populations of the mexican tetra, *Astyanax mexicanus* (Teleostei, Characidae). Copeia 2005: 409-416.
- PAPETTI C, SUSANA E, LA MESA M, KOCK KH, PATARNELLO T, ZANE L (2007) Microsatellite analysis reveals genetic differentiation between year-classes in the icefish *Chaenocephalus aceratus* at South Shetlands and Elephant Island. Polar Biol 30: 1605-1613.
- PAZZA R, JULIO JR. HF (2003) Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain (Brazil). Cytologia 68: 159-163.
- PAZZA R, KAVALCO KF (2007) Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). The Nucleus 50: 519-543.
- PAZZA R, KAVALCO KF, BERTOLLO LAC (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. Cytogenet Genome Res 112: 313-319.
- PAZZA R, KAVALCO KF, BERTOLLO LAC (2008a) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 - Gene mapping of satellite DNA. Cytogenet Genome Res: *In press*.
- PAZZA R, KAVALCO KF, BERTOLLO LAC, ALMEIDA-TOLEDO LF (2005) *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. Caryologia 58: 339-344.
- PAZZA R, KAVALCO KF, PRIOLI SMAP, PRIOLI AJ, BERTOLLO LAC (2007) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 3 - Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. Biochem Syst Ecol: 841-851.
- PAZZA R, KAVALCO SAF, PENTEADO PR, KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF (2008b) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): a multidisciplinary approach. J Fish Biol 72: 2002-2010.
- PERDICES A, BERMINGHAM E, MONTILLA A, DOADRIO I (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. Mol Phylogenet Evol 25: 172-189.
- PEREIRA SL (2000) Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. Genet Mol Biol 23: 745-752.

PERES WAM, BERTOLLO LAC, KANTEK DLZ, BUCKUP PA, MOREIRA-FILHO O (2006) *Astyanax fasciatus*: um indicador cromossômico para demonstrar a dispersão populacional na transposição de fauna. In: I International Congress of Fish Genetics - XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics, São Carlos – SP, Brazil, pp65.

PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci 83: 2934-2938.

PINTO BCT, ARAUJO FG, HUGHES RM (2006a) Effects of landscape and riparian condition on a fish index of biotic integrity in a large southeastern Brazil river. Hydrobiologia 556: 69-83.

PINTO BCT, PEIXOTO MG, ARAUJO FG (2006b) Effects of the proximity from an industrial plant on fish assemblages in the rio Paraíba do Sul, southeastern Brazil. Neotrop Ichthyol 4: 269-278.

PORTELA ALBS, GALETTI JR. PM, BERTOLLO LAC (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). Genet Mol Biol 11: 307-316.

PORTER ML, DITTMAR K, PÉREZ-LOSADA M (2007) How long does evolution of the troglomorphic form take? Estimating divergence times in *Astyanax mexicanus*. Acta Carsologica 36: 173-182.

POST A (1965) Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen bei Süßwasser-Teleostern. Z Zool Syst Evol Forsch 3: 47-93.

PRIOLI SMAP, PRIOLI AJ, JÚLIO JR. HF, PAVANELLI CS, DE OLIVEIRA AV, CARRER H, CARRARO DM, PRIOLI LM (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. Genet Mol Biol 25: 421-430.

PROTAS ME, HERSEY C, KOCHANEK D, ZHOU Y, WILKENS H, JEFFERY WR, ZON LI, BOROWSKY R, TABIN CJ (2006) Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. Nature Genet 38: 107-111.

REIS RO, KULLANDER SO, FERRARIS JR. CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 742p.

RIBEIRO AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. Neotrop Ichthyol 4: 225-246.

ROCON-STANGE EA, ALMEIDA-TOLEDO LF (1993) Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Braz J Genet 16: 601-615.

ROMERO A, PAULSON KM (2001) It's a wonderful hypogean life: a guide to the troglomorphic fishes of the world. Environ Biol Fishes 62: 13-41.

ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, MESSEGUER X, ROZAS R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

SAITOU N, NEI M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.

SANTOS LVR, FORESTI F, WASKO AP, OLIVEIRA C, MARTINS C (2006) Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 29: 251-256.

SCHEEL JJ (1973) Fish chromosomes and their evolution. Int Rep Denmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark.

SCHMID M (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome region in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.

SHIMABUKURO-DIAS CK, OLIVEIRA C, REIS RE, FORESTI F (2004) Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol Phylogenet Evol* 32: 152-163.

SITES JR. JW, MARSHALL JC (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 199-227.

SIVASUNDAR A, BERMINGHAM E, ORTÍ G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. *Mol Ecol* 10: 407-417.

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

STANTON DJ, DAEHLER LL, MORITZ CC, BROWN WM (1994) Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. *Genetics* 137: 233-241.

STRECKER U, BERNATCHEZ L, WILKENS H (2003) Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol Ecol* 12: 399-710.

STRECKER U, FAUNDEZ WH, WILKENS H (2004) Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 33: 469-481.

STRIPECKE R, NOGUEIRA-PINTO MT, HACKEL C, SAZIMA I (1985) O cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). IN: XII Congresso Brasileiro de Zoologia, Campinas – SP.

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

SWOFFORD DL (2001) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

TAMURA K, DUDLEY, NEI M, KUMAR S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

TAMURA K, NEI M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.

TAMURA K, NEI M, KUMAR S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci* 101:11030-11035.

TAYLOR EB (1999) Species pairs of north temperate freshwater fishes: evolution, taxonomy and conservation. *Rev Fish Biol Fisheries* 9: 299–324.

TEIXEIRA TP, PINTO BCT, TERRA BF, ESTILIANO EO, GRACIA D, ARAÚJO FG (2005) Diversity of fish assemblages in the four geographic units of the Paraíba do Sul river. *Iheringia Sér Zool* 95: 347-357.

TEMPLETON AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol Ecol* 13: 789–809.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

TIAN NMML, PRICE DJ (2005) Why cavefish are blind. *BioEssays* 27: 235-238.

TOLEDO RA, MOYSÉS CB, ALMEIDA-TOLEDO LF (2002) Caracterização genética de duas espécies do complexo *bimaculatus* (Characiformes, Characidae) através de PCR-RFLP. In: 48o Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. CD-ROM.

TORRES-MARIANO AR, MORELLI S (2006) Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. *Brazil J Biol* 66: 161-165.

URSING BM, ARNASON U (1998) Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus-whale clade. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:2251-2255.

VARI RP, CASTRO RMC (2007) New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* 2007: 150-162.

VASIL'EV VP (1980) Chromosome numbers in fish-like vertebrates and fish. *J Ichthyol* 20: 1-38.

VAZZOLLER AEA, MENEZES NA (1992) Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Rev Brasil Biol* 52: 627-640.

VICARI MR (2006) Diversidade de peixes residentes em cabeceiras de rios. Uma abordagem cromossômica em três biomas aquáticos da região sul do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

VICARI MR, NOLETO RB, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O, BERTOLLO LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genet Mol Biol* 31: 173-179.

VIEIRA MMR, OLIVEIRA C, FORESTI F (2001) Estudo sistemático em dez populações locais de *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae, Tetragonopterinae) com base em seqüências do gene mitocondrial 12S rRNA. In: 47o Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. CD-ROM.

VOLFF JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94: 280–294.

VOLFF JN, HORNING U, SCHARTL M (2001) Fish retroposons related to the Penelope element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Mol Genet Genomics* 265: 711–720.

VÖLKER M, SONNENBERT R, RÁB P, KULLMANN H (2007) Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III: Extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenet Genome Res* 116:116-126.

WASKO AP, MARTINS C, WRIGHT JM, GALETTI JR. PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902.

WEITZMAN SH, MALABARBA LR (1998) Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA LR, REIS RE, VARI RP et al (eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS: Porto Alegre-RS, Brazil, pp 161-170.

WILKENS H (1988) Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evol Biol* 23: 271-367.

XIA X, XIEB Z, SALEMIC M, CHEND L, WANGD Y (2003) An index of substitution saturation and its application. *Mol Phylogenet Evol* 26: 1-7.

BIOGRAFIA

Karine Frehner Kavalco recebeu o grau de bacharel em Ciências Biológicas no ano de 2000, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Iniciou seus estudos na citogenética de peixes em 1998, sob orientação do prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido. Seu título de mestre em Genética e Evolução foi obtido junto à Universidade Federal de São Carlos, em 2003, sob orientação do prof. Dr. Orlando Moreira Filho. Em 2004 realizou estágio em genética molecular no Laboratório de Genética do NUPELIA (Núcleo de Estudos em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura) da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Dr. Alberto José Prioli, aplicando marcadores nucleares em *Astyanax*. Possui atualmente 17 artigos publicados em periódicos.

- PAZZA R, KAVALCO KF, BERTOLLO LAC (2008) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 - Gene mapping of satellite DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, *in press*.
- PAZZA R, KAVALCO SAF, PENTEADO PR, KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF (2008) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes) a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, 72: 2002-2010.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2007) Satellite DNA sites of four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 30: 329-335.
- KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF (2007) Molecular Cytogenetics of blind Mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish*, 4: 103-111.
- PAZZA R, KAVALCO KF, PRIOLI SMAP, PRIOLI AJ, BERTOLLO LAC (2007) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 3 - Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 841-851.
- PAZZA R, KAVALCO KF (2007) Chromosomal evolution in the characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Nucleus*, 50: 519-546.
- KAVALCO KF, PAZZA R (2007) Aspectos biogeográficos de componentes da ictiofauna da América Central. *ConScientiae Saúde*, 6: 147-153.
- PAZZA R, KAVALCO KF, BERTOLLO LAC (2006) Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic 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.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94: 180-186.

- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica*, 124(1): 85-91.
- VIANNA-MORGANTE AM, BATISSOCO AC, FRAGA AM, SANTOS FP, ROMANOS J, KAVALCO KF, FONTES L, STABELLINI R, ABREU-SILVA RS, DIAS VM (2005). The ratio of maternal to paternal UPD associated with recessive diseases. *Human Genetics*, 117(2-3): 288-290.
- PAZZA R, KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF, BERTOLLO LAC (2005) *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. *Caryologia*, 58(4): 339-344.
- KAVALCO KF, PAZZA R (2004) A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2): 6-198.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 107-110.
- PAZZA R, KAVALCO KF (2004) Key for the identification of sex chromosomes and chromosomal polymorphisms. *Cytologia*, 69(3): 297-300.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O (2004) Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, 141: 237-242.
- KAVALCO KF, MOREIRA-FILHO O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia*, 56(4): 453-461.

ANEXO

KAVALCO KF, ALMEIDA-TOLEDO LF. Molecular Cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic evolution of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4(2):103-111, 2007.