



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Caracterização Cariotípica de espécies de peixes do gênero
Astyanax: uma contribuição para a análise da
biodiversidade do grupo**

Aluno (a): Alessandra Ribeiro Torres – Mariano

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Co-Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

UBERLÂNDIA, MG

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Caracterização Cariotípica de espécies de peixes do gênero
Astyanax: uma contribuição para a análise da
biodiversidade do grupo**

Alessandra Ribeiro Torres-Mariano

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Co-Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética.

UBERLÂNDIA - MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- T693c Torres-Mariano, Alessandra Ribeiro, 1967-
Caracterização cariotípica de espécies de peixes do
gênero *Astyanax* : uma contribuição para a análise da do
grupo / Alessandra Ribeiro Torres-Mariano. - 2010.
79 f. : il.
- Orientadora: Sandra Morelli.
Coorientadora: Ana Maria Bonetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Peixe - Genética - Teses. 2. *Astyanax* (Peixe) -
Genética - Teses.
I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.
Título.

CDU:

597-115

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização Cariotípica de espécies de peixes do gênero
Astyanax: uma contribuição para a análise da
biodiversidade do grupo**

Aluno (a): Alessandra Ribeiro Torres-Mariano

Comissão Examinadora:

Presidente: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Morelli

Examinadores: Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Martins dos Santos
Prof. Dr. Rodrigo Aparecido Fernandes Redondo
Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo

Data da Defesa: 28/01/2010

As sugestões da Comissão examinadora e as Normas PGGB para o formato da tese foram contempladas.

Sandra Morelli

Dedico esse trabalho aos meus filhos Raíssa e Leonardo, meus pais Ottoni e Marina.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim".

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

- Aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq, FAPEMIG;
- À Universidade Federal de Uberlândia;
- Ao Instituto de Genética e Bioquímica e à Coordenação da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica;
- Aos membros da banca examinadora:
 - Prof^ª. Dr^ª. Sandra Morelli
 - Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Martins dos Santos
 - Prof. Dr. Rodrigo Aparecido Fernandes Redondo
 - Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
 - Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo
- À prof^ª Dr^ª Ana Maria Bonetti por me aceitar em seu laboratório e dar dicas tão preciosas no desenvolvimento do meu trabalho;
- Ao prof. Dr. Carlos Ueira Vieira pela amizade e por todos os ensinamentos e dicas durante a realização dos experimentos;
- Ao Prof. Dr. Rodrigo Redondo por me orientar e ensinar os passos que deveriam ser seguidos para que eu atingisse o meu objetivo;
- Ao Prof. Dr. Fausto Foresti – Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP, Botucatu, SP – por me dar a oportunidade de estar em seu laboratório aprendendo e desenvolvendo parte desse trabalho;
- À Patrícia Elda Sobrinho por ter cedido as sondas utilizadas no FISH duplo;
- Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto – UNESP – São José do Rio Preto, SP que identificou os exemplares utilizados nesse trabalho;
- Ao Secretário da Coordenação de Pós-Graduação – Gerson Fraissat – por todas as informações e pela amizade;
- Ao técnico do Laboratório de Citogenética Animal José Clidenor dos Santos, pela companhia nas coletas e amizade;
- Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal pela amizade e companheirismo, tornando agradável o nosso local de trabalho;

- Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular pela amizade, apoio e ensinamentos;
- Às amigas Patrícia, Débora e Rosângela: “que a nossa amizade persista ao longo do tempo”;
- Ao Sr. João Batista Dias – Fazenda Lageado – Córrego dos Caetano e Sr. Ivo Zanatta – Fazenda Quilombo – Córrego Quilombo, pela permissão de coletar os exemplares utilizados nesse trabalho, em suas propriedades;
- Aos meus filhos, Raíssa e Leonardo, pelo tempo que gastei no desenvolvimento desse trabalho;
- À minha mãe que me acompanhou e apoiou durante todos esses anos, em todos os momentos;
- Ao meu amigo, companheiro, namorado, marido e amante, Luiz Carlos Guilherme, que esteve sempre ao meu lado nos momentos felizes e nos momentos difíceis da vida;
- Ao meu tio Otoniti que direta ou indiretamente participou da elaboração deste trabalho;
- A todos aqueles que de alguma forma participaram e me apoiaram na realização desse trabalho;
- À DEUS pela oportunidade de desenvolvimento do presente trabalho.
- À minha orientadora Sandra Morelli: “Obrigado pela oportunidade, mas mais do que isso, pela grande amizade. Com todos esses anos de convivência, aprendi a admirá-la e respeitá-la cada vez mais...”

Lista de Figuras

Mapa destacando a localização da bacia do Rio Araguari	4
Foto de satélite retirada do software online Google Earth, mostrando a localização dos pontos de coleta em relação ao Rio Araguari.....	5
Karyotypes of <i>A. eigenmanniorum</i> from the Caetano Stream.....	27
Metáfase de <i>A. bockmanni</i> tratada com CMA ₃	39
Metáfase de <i>A. bockmanni</i> tratada com DAPI.	39
Metáfase de <i>A. bockmanni</i> submetida à técnica de double FISH.....	40
Foto de satélite retirada do software online Google Earth, mostrando a localização dos pontos de coleta em relação ao Rio Araguari.....	52
Cariótipos de <i>Astyanax</i> sp. CC <i>Astyanax</i> sp. Q e <i>Astyanax</i> sp. A	54
Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. CC, Q e A evidenciando AgNORs	55
Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. CC, Q e A evidenciando sítios CMA ₃ positivos.....	56
Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. CC, Q e A submetidas ao tratamento com DAPI.....	57
Metáfases de <i>Astyanax</i> sp. CC, Q e A evidenciando sítios de DNAr 5S e 18S.....	58

Lista de Tabelas

Chromosome number frequency found in <i>Astyanax eigenmanniorum</i> from de Caetano Stream	28
Fórmula cariotípica e número fundamental das 3 populações de <i>Astyanax</i> do grupo <i>A. paranae</i> analisadas.....	52

Lista de Abreviaturas

2n	Número diplóide
a	Cromossomo acrocêntrico
A	Açude artificial da Fazenda Lageado
AgNOR	Região organizadora nucleolar impregnada com nitrato de Prata
AR	<i>Arm ratio</i>
AT	Adenina – Timina
B	Cromossomo supranumerário
CC	Córrego dos Caetano
CEMIG	Central Elétrica de Minas Gerais
CMA ₃	Cromomicina A ₃
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAr	Ácido desoxirribonucléico ribossômico
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
GC	Guanina Citosina
IGS/ETS	Espaçadores transcritos externos
ITS	Espaçadores transcritos internos
Km	Quilômetro
m	Cromossomo metacêntrico
m	Metros
MG	Minas Gerais
NF	Número fundamental
NOR	Região organizadora de nucléolos
NTS	Espaçadores não transcritos
Q	Córrego Quilombo
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
sm	Cromossomo submetacêntrico
st	Cromossomo subtelocêntrico

Sumário

Apresentação	1
1.Fundamentação Teórica	4
Introdução Geral	5
1.1. Localização e caracterização dos locais de coleta	5
1.2. Considerações sobre a família Characidae e o gênero <i>Astyanax</i>	8
1.3. A citogenética na família Characidae, destacando o gênero <i>Astyanax</i>	10
1.4. Genes ribossomais e hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	12
1.5. Referências Bibliográficas:	17
2. B chromosomes in a population of <i>Astyanax eigenmanniorum</i> (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil)	25
3.Caracterização das regiões organizadoras nucleolares e da heterocromatina do cromossomo B em <i>Astyanax bockmanni</i> , Vari & Castro, 2007 (Characiformes, Characidae) da bacia do Rio Araguari (Uberlândia, MG, Brasil).....	34
3.1. Referências Bibliográficas:	38
4.Localização de sítios ribossômicos 5S e 18S em três populações de <i>Astyanax</i> sp gr A. paranae (Pisces, Characidae) da bacia do Alto Paraná – Uberlândia MG.....	44
4.1. Introdução	44
4.2. Material e Métodos	46
4.3. Resultados e Discussão	47
4.4. Referencias Bibliográficas	51
5. Considerações e Conclusões Finais	62

RESUMO

Astyanax constitui um gênero numeroso da família Characidae, encontrado desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos. Nesse gênero já foram descritas quase 100 espécies, porém existem dificuldades na identificação delas por apresentarem morfologias muito similares. Nesse sentido a citogenética tem sido uma excelente ferramenta citotaxonômica. A espécie *Astyanax bockmanni*, anteriormente chamada de *A. eigenmanniorum*, foi descrita recentemente e está distribuída em riachos do Alto Paraná, nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil. Ela apresenta $2n = 50$ cromossomos na maioria das populações estudadas, porém na população do Córrego dos Caetano (bacia do Rio Araguari), o número diplóide encontrado foi $2n=48$, com a presença de um ou dois cromossomos supranumerários metacêntricos grandes em fêmeas. No presente trabalho, essa população foi analisada com o intuito de localizar os genes ribossômicos 5S e 18S, além de caracterizar a heterocromatina que forma o cromossomo B. As regiões organizadoras de nucléolos impregnadas com nitrato de Prata (AgNORs) nessa população são múltiplas e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) destacou seis cromossomos. A sonda 5S localizou sítios pericentroméricos em um par de cromossomos metacêntricos e teloméricos em um par de acrocêntricos. *Astyanax scabripinnis* foi considerado um complexo de espécies, depois de serem analisados morfológica e citogeneticamente. Esse complexo é composto por 15 espécies, incluindo *A. paranae*. Dentro desse grupo, o número cromossômico varia entre $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$, com muitas populações apresentando cromossomos supranumerários. As regiões organizadoras de nucléolos (NOR) são, na maioria das vezes, múltiplas tanto em análises de AgNORs como por FISH, com sonda de DNAr 18S. No presente estudo, foram analisados os cariótipos de três populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae*, provenientes do Córrego dos Caetano, Córrego Quilombo e de um açude formado por uma nascente que deságua no Córrego dos Caetano, pertencentes à bacia do Rio Araguari. O número de cromossomos nas 3 populações é $2n=50$, embora com variações nas fórmulas cariotípica. A análise dos

cromossomos após coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, AgNOR, assim como dos sítios de DNAr 5S e 18S por FISH, permitiram localizar os genes ribossomais nos cromossomos, determinar o seu número e estabelecer algumas particularidades em relação às populações estudadas. As características cromossômicas específicas de cada população estão provavelmente correlacionadas com o isolamento geográfico existente entre as mesmas.

Apresentação

Apresentação

A bacia do Alto Paraná abrange um trecho do Rio Paraná e os rios Paranapanema, Grande, Tietê e Paranaíba. O Rio Araguari é um dos principais afluentes do Rio Paranaíba. Sua bacia situa-se no sudoeste de Minas Gerais, onde estão os municípios de Araxá, Araguari e Uberlândia. Existem pelo menos 5 usinas hidrelétricas instaladas ao longo do leito desse rio, provocando alterações nas propriedades físicas e químicas da água e, como consequência os seres aquáticos, incluindo a icitofauna, são afetados. As espécies de piracema refugiam-se em córregos e outros cursos de água para se reproduzirem, deixando, em muitos casos, os leitos dos rios. Esse isolamento, ao longo de centenas a milhares de anos, pode levar a uma possível especiação ou mesmo à extinção dessas espécies, por isso é necessário conhecer o patrimônio genético dessa bacia, na tentativa de preservá-lo. Nesse sentido o presente trabalho contribui com a descrição citogenética de duas espécies de peixes do gênero *Astyanax* provenientes do Córrego dos Caetano e Córrego Quilombo, ambos pertencentes à bacia do Rio Araguari.

Este trabalho é constituído de quatro capítulos. O primeiro é uma revisão bibliográfica onde são reunidas informações sobre a região de coleta dos exemplares utilizados; a posição atual do gênero *Astyanax* na sistemática de peixes, particularmente de *A. bockmanni* e o complexo de espécies *A. scabripinnis*; além de dados relacionados à citogenética clássica e molecular dessas espécies. O segundo capítulo é um artigo já publicado que descreve citogeneticamente uma população de *A. eigenmanniorum* (hoje identificada como *A. bockmanni*), coletada no córrego dos Caetano, pertencente à bacia do Rio Araguari. Essa população apresentou $2n=48$ cromossomos, com a presença de um ou dois cromossomos B ou supranumerários, totalmente heterocromáticos, em fêmeas. O terceiro capítulo complementa as informações coletadas no segundo, localizando os genes ribossomais 5S e 18S por meio de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e descreve a constituição da heterocromatina do cromossomo supranumerário dessa população. O quarto capítulo é o estudo citogenético de três populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae*,

pertencente ao complexo de espécies *A. scabripinnis*, que determina o número de cromossomos, a localização e número de sítios ribossômicos 18S com FISH, impregnação por nitrato de Prata, DAPI e CMA₃, além de sítios 5S.

Portanto, os objetivos desse trabalho foram: localizar os sítios ribossômicos 5S e 18S da população de *A. bockmanni* do Córrego dos Caetano (Uberlândia, MG, Brasil); além de caracterizar a heterocromatina que compõe o cromossomo B encontrado nas fêmeas dessa população e caracterizar citogeneticamente três populações de *A. sp* gr *A. paranae* da bacia do Rio Araguari com o intuito de determinar possíveis diferenciações entre elas.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

Introdução Geral

1.1. Localização e caracterização dos locais de coleta

A bacia do Alto Paraná abrange um trecho do Rio Paraná (próximo à barragem de Itaipu), os rios Paranapanema, Grande, Tietê e Paranaíba. De acordo com a Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) (PORTAL PEIXE VIVO) o Rio Paranaíba constitui uma bacia que drena uma área de aproximadamente 220.000km², 196 municípios, sendo 55 deles em Minas Gerais.

O bioma predominante da bacia do Rio Paranaíba é o Cerrado, com clima variando de úmido a semi-úmido e semi-árido. A qualidade da água oscila de média a ruim, devido à destruição das matas ciliares, lançamento de efluentes domésticos e industriais, utilização de agrotóxicos e dragas irregulares na agricultura. Apesar de ter perdido cerca de 60% de sua vazão, como consequência desse mau uso de suas águas, a bacia do Rio Paranaíba é conhecida principalmente por suas riqueza diamantífera e seu potencial hidroelétrico, ao qual pertencem algumas usinas hidrelétricas tais como, São Simão, Itumbiara, Cachoeira Dourada e Emborcação; e que, junto com outras menores, são responsáveis pela geração de energia de grande parte de Minas Gerais e Goiás (CEMIG – PORTAL PEIXE VIVO).

Os principais afluentes da margem esquerda do Rio Paranaíba são os rios Dourados, Perdizes, Bagagem, Araguari, Piedade, Tijuco e Prata (CEMIG – PORTAL PEIXE VIVO).

A bacia do Rio Araguari situa-se no sudoeste de Minas Gerais, onde estão os municípios de Uberlândia, Araguari e Araxá (Figura 1). Suas nascentes estão localizadas na Serra da Canastra. Apresenta uma área de drenagem de 21.856 km², abrangendo um total de 20 municípios com uma população estimada de 1,2 milhões de pessoas (ANDRADE *et al.*, 2008).

O Rio Araguari tem águas escuras porém limpas, com várias corredeiras de pedra e cânions e, devido à sua conformação, apresenta um bom potencial para geração de energia elétrica (WIKIPEDIA, 2008). Existem pelo menos cinco usinas

hidroelétricas instaladas ao longo do leito desse rio. Os represamentos provocam efeitos negativos para ambiente, como a liberação de gases tóxicos, condições anóxicas, eutrofização, produção excessiva de algas. Tais condições causam alterações nas propriedades físicas e químicas da água, que afetam diretamente a fauna aquática, além de alterações nas características do curso de água. Estas modificações de habitats muitas vezes não são toleradas por varias espécies de peixes (AGOSTINHO *et al.*, 2007 *apud* RÊGO, 2008). Com essas alterações, a ictiofauna, principalmente as espécies de piracema, refugiam-se em córregos e outros cursos d'água para se reproduzirem, deixando, em muitos casos, os leitos dos rios. Esse isolamento, ao longo de centenas a milhares de anos, pode levar à uma especiação ou mesmo à extinção desses animais justificando a necessidade de se conhecer o patrimônio genético dessa bacia, na tentativa de preservá-lo.

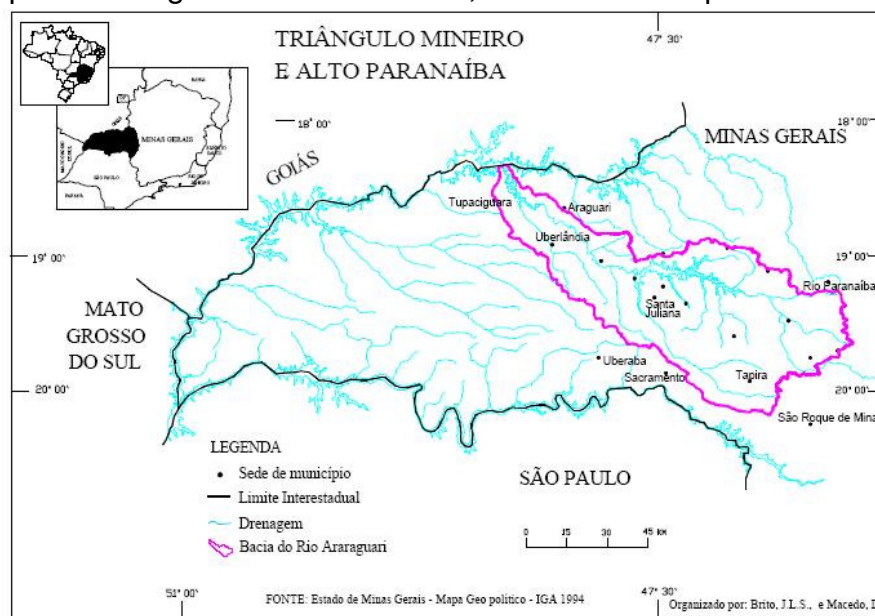


Figura 1: Mapa destacando a localização da bacia do Rio Araguari.

Retirado de Brito e Rosa (2003)

Contribuem com essa bacia inúmeros córregos, incluindo o Córrego dos Caetano e o Córrego Quilombo, onde foram realizadas as coletas para o desenvolvimento desse trabalho (Figura 2). O primeiro tem uma extensão de aproximadamente 9Km e atravessa muitas propriedades rurais sendo que, em várias delas, suas águas foram desviadas para irrigar plantações e/ou formar veios de água

para o gado. Seu terreno apresenta um declive acentuado, o que resulta em forte corredeira. O solo é arenoso, cheio de cascalhos, formando pequenas cachoeiras.

À uma distância aproximada de 2,5Km a montante da foz, existe uma cachoeira de aproximadamente 10m de altura, a qual constitui uma barreira natural para os peixes, pois os espécimes que estão abaixo dela não conseguem subir. Entre a cachoeira e a nascente do córrego existem trechos em que o curso de água é escasso devido aos desvios feitos pelos fazendeiros, constituindo assim uma barreira geográfica artificial.

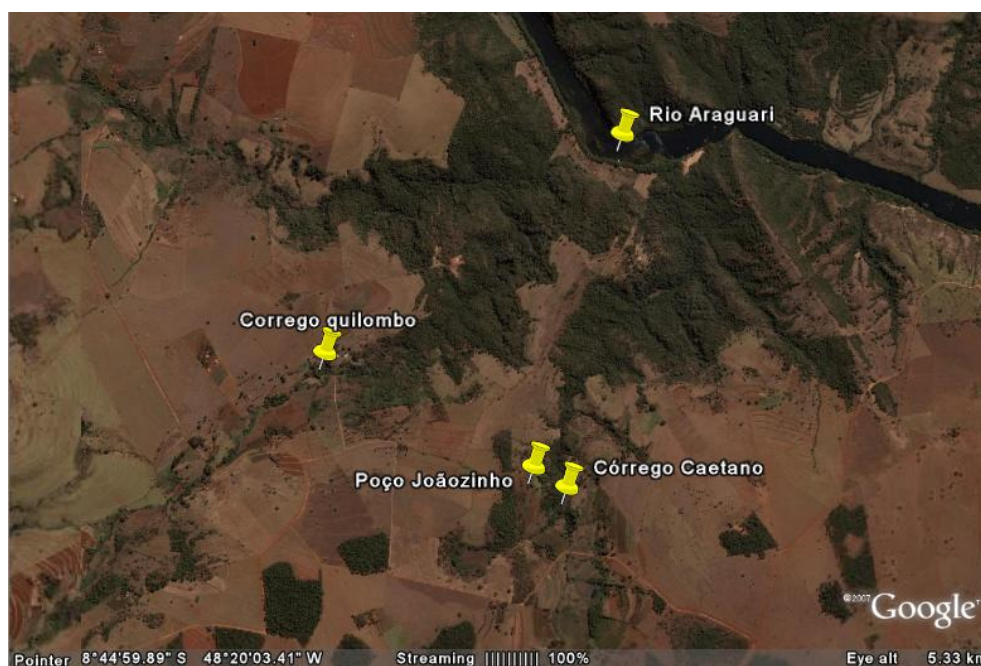


Figura 2: Foto de satélite retirada do software online Google Earth, mostrando a localização dos pontos de coleta em relação ao Rio Araguari

O Córrego Quilombo tem uma extensão de aproximadamente 3Km e deságua a mais ou menos 700m abaixo do Córrego dos Caetano. Sua nascente está localizada na região conhecida popularmente por Tiracouro, próxima à rodovia Neuza Rezende. Na época da estiagem, sua vazão de água diminui muito, chegando a secar em alguns pontos. Na época das chuvas, seu volume de água aumenta, permitindo a formação de pequenas quedas d'água. Seu solo é arenoso e cheio de pedregulhos.

1.2. Considerações sobre a família Characidae e o gênero *Astyanax*

Os peixes formam o grupo de vertebrados mais antigo e diversificado, com enorme variação biológica, incluindo sua morfologia e nos habitats que ocupam. Essa diversidade auxilia no entendimento da sua história evolutiva, mas estabelece certa dificuldade de classificação. Baseado na classificação cladística, os peixes que tem nadadeiras com raios constituem um grupo dominante em número de espécies e, embora formem um grupo heterogêneo, exibem continuidade filogenética (NELSON, 2006).

As informações já conhecidas sobre os peixes são bastante vastas e incluem todas as áreas da biologia. Eles são atraentes para os pesquisadores, devido à riqueza de informações e diversidade que exibem, tanto nos táxons fósseis como nos vivos (NELSON, 2006).

Os peixes são encontrados em ecossistemas aquáticos marinhos ou dulcícolas, vivem em diferentes profundidades, em regiões frias ou quentes e, por isso, sua distribuição é ampla. Nelson (2006) considera que mais de 225 espécies são diádromas, vivendo parte de suas vidas na água doce e parte na água salgada. Dentre esses, a maioria é anádroma, desovam em água doce e passam a maior parte da vida em água salgada, como os salmões, e poucos são catádromos, ou seja, desovam em águas salgadas e retornam para água doce, como as enguias. Aproximadamente 43% de todas as espécies de peixes vivem exclusivamente em água doce. De acordo com Vaz *et al.* (2000), a fauna neotropical é a mais numerosa.

A ordem Characiformes compreende 18 famílias, 270 gêneros e 1674 espécies de água doce (NELSON, 2006), abrangendo quase um terço da ictiofauna sul americana, com grande diversidade em relação à habitats e regime alimentar (VAZ *et al.*, 2000). Das 18 famílias conhecidas, Characidae é uma das mais numerosas, com 952 espécies descritas e aproximadamente 400 espécies não descritas, perfazendo um total de 1352 espécies (REIS *et al.*, 2003). No Brasil, são conhecidas diversas espécies de caracídeos, tais como: matrinhãs, dourados, caranhas, piranhas, tambaquis, pacus, tabarana, piraputangas, lambaris ou piabas, entre outras.

Os lambaris ou piabas estão distribuídos desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (EIGENMANN 1921, *apud* MORELLI 1981). São encontrados nos mais diversos ambientes, tais como cabeceiras de riachos, rios, lagos, brejos. Movem-se em cardumes e podem realizar curtas migrações ascendentes na época das cheias, o que lhes proporciona estímulo para a reprodução. Algumas espécies aparecem com maior frequência na época das cheias, estando presentes em ambientes com fundo de areia e pedra (VAZ *et al.*, 2000).

Os lambaris pertencem ao gênero *Astyanax* que, dentro da família Characidae, é classificado como *Incertae Sedis* juntamente com outros 87 gêneros considerados heterogêneos. A maioria deles estava alocada na subfamília Tetragonopterinae, de onde foram excluídos por falta de evidências quanto à sua monofilia (LIMA *et al.*, 2003).

Dentro desse gênero já foram descritas quase 100 espécies. Existem, porém, dificuldades na identificação por serem morfologicamente muito semelhantes. A espécie *A. bockmanni*, anteriormente classificada como *A. eigenmanniorum*, foi descrita recentemente e está distribuída em riachos do Alto Rio Paraná, nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (VARI e CASTRO, 2007). *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* são hoje consideradas como complexos de espécies. Estudos citogenéticos têm evidenciado uma grande diversidade cariotípica entre diferentes populações ou mesmo em uma mesma população (FERNANDES e MARTINS SANTOS, 2004; FERREIRA NETO *et al.*, 2009; MEDRADO *et al.*, 2008; PAZZA *et al.*, 2008).

A. scabripinnis foi a primeira espécie do gênero a ser considerada como um complexo, a partir dos estudos desenvolvidos por Moreira-Filho e Bertollo (1991), quando foram analisadas sete populações de bacias hidrográficas diferentes. Seis delas, além da citogenética, foram estudadas morfologicamente, utilizando análise canônica variável. Esses dados, em conjunto, permitiram propor que essa espécie não poderia representar uma única entidade taxonômica. Bertaco e Malabarba (2001) reforçaram essa hipótese com a descrição de duas espécies pertencentes a

esse complexo, o qual parece ser composto por 15 espécies distintas, incluindo *A. paranae* (Bertaco e Lucena 2006).

1.3. A citogenética na família Characidae, destacando o gênero *Astyanax*

A citogenética de peixes fornece subsídios para elucidar problemas evolutivos, além de ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de diversas linhas de pesquisa (TOLEDO-FILHO, 1978). O estudo das modificações na estrutura dos cariótipos, relacionadas ao conjunto de fenômenos que acompanham o processo evolutivo dos diferentes grupos de peixes (GALETTI-JÚNIOR, 1986), além da citotaxonomia (BARROS e MARGARIDO, 1999), são ferramentas importantes para aumentar o conhecimento de muitas populações desse grupo.

A ictiocitogenética foi aperfeiçoada a partir da aplicação de técnicas de bandeamento utilizadas na citogenética humana e de outros mamíferos, apesar das dificuldades de adaptação aos seus cromossomos. A introdução de metodologias que evidenciam regiões cromossômicas como as de heterocromatina constitutiva (banda C) ou NOR; o uso de fluorocromos e hibridação *in situ*, fornecem importantes resultados para a caracterização dos cromossomos dos peixes e suas relações evolutivas (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1988; FELDBERG *et al.*, 1992). Com isso, observa-se uma expansão nas pesquisas exibindo uma abordagem populacional, onde são analisados diferentes tipos de polimorfismos e modos de diversificação cromossômica, deixando de focar exclusivamente na identificação do número e morfologia dos cromossomos.

Um levantamento feito por Oliveira *et al.* (2000) registra os números cromossômicos haplóides e diplóides de 44 famílias, 252 gêneros e 921 espécies de peixes de água doce (dentre elas, 41 apresentando cromossomos supranumerários), os quais variam de $2n=20$ cromossomos em *Pterolebias longipinnis* a $2n=132$ em *Corydoras aeneus*.

Oliveira *et al.* (1988) relatam que as variações na macroestrutura cromossômica entre diferentes populações podem estar relacionadas com a sua mobilidade e tamanho, ou seja, grupos de peixes, tais como Prochilodontidae

(FELDBERG *et al.*, 1992), que apresentam maior mobilidade e populações mais numerosas tendem a conservar a macroestrutura cariotípica, pois elas mantem um fluxo genético constante. No entanto, grupos que apresentam pouca mobilidade e pequenas populações têm cariótipos distintos, como *Hoplias* (BERTOLLO *et al.*, 2000) e *Astyanax scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991).

Algumas famílias de peixes neotropicais, como Curimatidae, Anostomidae, Parodontidae, Chilodontidae, Cichlidae e Hemiodontidae possuem cariótipos menos variáveis quanto ao número de cromossomos (FELDBERG *et al.*, 1992), porém a grande maioria apresenta muita variabilidade.

De acordo com Denton (1973), os complementos cromossômicos entre os peixes geralmente são diversificados. Kosswig (1973) reforça tal afirmativa, dizendo que não há outra classe de vertebrados apresentando grande quantidade de cariótipos diferentes como os Characidae.

Nessa família, podem ser encontrados gêneros com números cromossômicos constantes e pouca variabilidade cariotípica, tais como *Salminus* (VENERE *et al.*, 1996; MONDIN *et al.* 1999; SOUZA *et al.*, 2008), *Brycon* (WASKO e GALETTI-JÚNIOR, 2000) e *Oligosarcus* (RUBERT e MARGARIDO, 2007). Porém, a maioria apresenta variabilidade cariotípica como, por exemplo, *Bryconamericus* (PAINTER-MARQUES *et al.*, 2003), *Serrasalmus* (NAKAYAMA *et al.*, 2000) e *Astyanax* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004; PAZZA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2008).

Entre os *Astyanax*, o número cromossômico varia de $2n = 36$ em *A. schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983) a $2n = 50$ em *A. altiparanae* e *A. bockmanni* (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004; KAVALCO *et al.*, 2009).

Entre as espécies que formam o complexo *A. scabripinnis*, esse número varia de $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$ (ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2005; PERES *et al.*, 2008; VICARI *et al.*, 2008), sendo este último o mais comum, além da presença de cromossomos B ou supranumerários em várias espécies. Esses cromossomos podem ser meta-, submeta-, subtelo- ou acrocêntricos; macro- ou microcromossomos. Os macrocromossomos são mais frequentes em fêmeas, metacêntricos e de tamanho correspondente ao maior do

complemento (VICENTE *et al.*, 1996; FERRO *et al.*, 2003) e os microcromossomos, são mais freqüentes em machos e com maior variação de número de uma célula para outra (ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1997). De acordo com Moreira-Filho *et al.* (2004) esses cromossomos podem variar de 0 a 4, enquanto os macrocromossomos variam de 0 a 2.

O macrocromossomo B metacêntrico, correspondente em tamanho ao maior cromossomo do complemento, é o mais freqüente entre as fêmeas das populações do complexo de espécies *A. scabripinnis*, bem como em outras espécies do mesmo gênero, como *A. bockmanni* (TORRES-MARIANO e MORELLI, 2008).

Em *A. bockmanni* o número diplóide mais comum é 50 cromossomos. Stripecke *et al.* (1985) analisaram três exemplares fêmeas capturadas no Rio Atibaia, sendo que duas delas apresentaram $2n = 50$ e uma apresentou um cromossomo supranumerário de tamanho correspondente ao segundo par. Fauaz *et al.* (1994) e Kavalco *et al.* (2009) encontraram $2n = 50$, na população do Rio Grande (MG). Artoni *et al.* (1999), analisaram 4 machos e 2 fêmeas de *A. cf. eigenmanniorum*, que apresentaram número diplóide igual a 48 cromossomos, assim como a população estudada por Torres-Mariano e Morelli (2008), com $2n = 48 + 1$ ou 2 supranumerários.

1.4. Genes ribossomais e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Em eucariotos superiores as famílias multigênicas correspondem a um elemento estrutural comum ao genoma desse grupo e são definidas como um conjunto de genes derivados por duplicação de um gene ancestral, com 50% de semelhança. A repetição em *tandem* da matriz de RNAr das famílias multigênicas confere uma dinâmica especial à evolução dessas regiões, tornando-as importantes para a compreensão da estrutura e evolução do genoma (MARTINS e WASCO, 2004).

Nesses organismos os genes ribossomais estão presentes em múltiplas cópias por genoma, arranjadas em seqüências repetidas e organizados em duas

famílias multigênicas distintas: a 5S e a 45S (MARTINS e WASCO, 2004; ANDRADE e JORDÃO, 2005).

O DNAr 5S é transcrito em um local diferente da região organizadora nucleolar (NOR), migra para o nucléolo e se une ao RNAr 5,8S e 28S para formar a subunidade maior do ribossomo. Suas unidades repetitivas possuem aproximadamente 120 pares de bases, intercaladas por um espaçador não transcrito (NTS) muito heterogêneo, variando de tamanho entre as espécies (ANDRADE e JORDÃO, 2005; PENDAS *et al.*, 1994 *apud* FERNANDES, 2006). Os NTS não sofrem pressão seletiva, permitindo a ocorrência de mutações em taxas bastante elevadas, levando a uma diferenciação nessa região e distinção entre espécies que divergiram recentemente na história evolutiva (ALVES-COSTA e MARTINS, 2005).

A região codificante do DNAr 5S é conservada, mesmo entre organismos filogeneticamente distantes, incluindo os peixes, onde na maioria das vezes, ocupa uma região intersticial nos cromossomos. Embora essa conservação seja observada, ocorreram mudanças em seqüências nucleotídicas e na organização das unidades repetidas em peixes (WASKO e GALETTI-JÚNIOR, 2000).

O DNAr 45S é composto por três genes que codificam os RNAs 18S, 5.8S e 28S, que são processados e parcialmente organizados para formar as subunidades do ribossomo no nucléolo. Estes estão separados por espaçadores transcritos internos (ITS) e externos (IGS ou ETS) que são íntrons eliminados na organização das moléculas precursoras de RNAr (ANDRADE e JORDÃO, 2005). Assim, o tamanho e a organização das seqüências de bases destes segmentos variam inter e intraespecificamente (MESTRINER, 1993). Os ITSs são geralmente ricos em GC e compostos por seqüências repetitivas (TORRES *et al.*, 1990; KING, 1991 *apud* FERNANDES, 2006).

Todo esse conjunto é conhecido citogeneticamente como NOR e é considerada uma região associada aos nucléolos que têm a função de reorganizá-los no final da divisão celular (HEITZ, 1931 *apud* BICUDO, 1985).

As NORs, quando impregnadas pelo nitrato de Prata, podem ser facilmente visualizadas (HOWELL e BLACK, 1980). A Prata se liga preferencialmente em proteínas não-histônicas, de natureza ácida, associadas ao RNAr recém transcrito

nos sítios de DNAr, evidenciando os sítios que estiveram transcricionalmente ativos e ainda apresentam resíduos de RNAr associados a proteínas, presos em torno de cistrons de DNAr condensados (HOWELL, 1977 *apud* MOREIRA-FILHO, 1983).

Em peixes essa técnica é amplamente utilizada por ser uma técnica simples, rápida e barata.

As NORs são variáveis em muitos aspectos, tais como número, localização, atividade, tamanho e a organização das seqüências do DNA ribossômico. Quando está presente em apenas um par de cromossomos, dizemos tratar-se de um sistema de NOR simples. Por outro lado, a localização das NORs em mais de um par cromossômico, caracteriza um sistema de NORs múltiplas (MOREIRA-FILHO, 1983).

Em algumas espécies, gêneros, famílias e até mesmo em ordens de peixes, o padrão de NOR é constante e por isso, podem ser consideradas marcadores citogenéticos. Nos Gymnotiformes o padrão de NOR comum é simples, porém Fonteles *et al.* (2008) encontrou três cromossomos marcados em uma população de *Electrophorus electricus*. Eles sugerem que este fato seja esporádico.

Entre os Anostomidae, a impregnação das NORs com nitrato de Prata (AgNOR) permite caracterizar algumas espécies, pois, apesar de todas elas serem simples, estão localizadas em posições diferentes nos cromossomos (GALETTI-JÚNIOR *et al.*, 1984).

Na família Characidae é possível observar uma variação no padrão de AgNOR, sendo simples em alguns grupos e múltiplas em outros. Em Serrasalminae, o padrão é múltiplo, variando o número e a localização destas regiões (NAKAYAMA *et al.*, 2002). A presença de NORs conservadas em um único par de cromossomos é comum a todas as espécies de *Brycon* estudadas e pode ser uma característica primitiva na subfamília Bryconinae, indicando uma notável estabilidade entre esses peixes (WASKO e GALETTI-JÚNIOR, 2000).

Em outros grupos de caracídeos é possível observar ambos os padrões de Ag-NOR, como nos *Astyanax*. Em *A. fasciatus*, as NORs são múltiplas com até dez cromossomos marcados, embora algumas populações apresentam NOR simples (MEDRADO *et al.*, 2008 TORRES-MARIANO e MORELLI, 2006; PAZZA *et al.*, 2006). Em *A. bockmanni* da bacia do Rio Paranapanema e na população da bacia do

Rio Araguari a AgNOR é múltipla com até seis cromossomos marcados (KAVALKO *et al.*, 2009; TORRES-MARIANO e MORELLI, 2008).

No complexo *A. scabripinnis*, o mais estudado do gênero, já foram encontradas populações com o número de AgNORs variando de um a quinze (ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MANTOVANI *et al.*, 2000; MAISTRO *et al.*, 2001; ARAUJO e MORELLI, 2006; VICARI *et al.*, 2008).

Na maioria das vezes, todos os sítios de NORs dos cromossomos de peixes, independente de sua atividade, mesmo aqueles usualmente não detectados pelo nitrato de Prata, são evidenciados pela Cromomicina A₃ (CMA₃) ou Mitramicina (GALETTI-JÚNIOR *et al.*, 2004). De acordo com Schweizer (1981; *apud* AMEMIYA e GOLD, 1986) esses antibióticos se ligam, preferencialmente, em regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC e, geralmente, produzem padrões fluorescentes em cromossomos, que são inversos às produzidas por fluorocromos AT base – específicos, tais como Hoechst 33258, Quinacrina e DAPI.

Amemiya e Gold (1986), consideram que os cromossomos de peixes e anfíbios são muito semelhantes em sua composição e possuem regiões ricas em GC relacionadas com as NORs. Essas regiões podem ser interespaçadoras, de heterocromatina associada às NORs ou sítios de DNA ribossômico (DNAr). Porém, essa relação não é absoluta, pois existem vários relatos de evidências de sítios não correspondentes às AgNORs. Por outro lado, sítios detectados pelo CMA₃ e não pelo nitrato de Prata também foram evidenciados (MORELLI *et al.*, 2007 e SOUZA *et al.*, 2001 *apud* GALETTI-JÚNIOR *et al.*, 2004).

A citogenética molecular é baseada principalmente na técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), onde uma sonda de DNA marcada é hibridada sobre alvos citológicos, como por exemplo, cromossomos metafásicos. Nos últimos anos a FISH tem sido utilizada para o mapeamento das NORs e sítios de DNAr 5S, através de sondas de DNAr. Essa técnica permite a detecção de todos os sítios de DNAr 45S existentes em uma espécie, independente de sua atividade, diferente do que pode ser observado com a impregnação por nitrato de Prata ou coloração com CMA₃ e Mitramicina.

Por outro lado, o DNAr 5S, não pode ser localizado pelo tratamento com nitrato de Prata e coloração com fluorocromos. Sua identificação só pode ser realizada por hibridação *in situ* (GALETTI-JÚNIOR *et al.*, 2004).

Fernandes (2006) reuniu dados de estudos que localizam os genes DNAr 45S e/ou 5S nos cromossomos. Segundo ele, esses dados foram determinados em 71 espécies de peixes pertencentes a diferentes ordens, como por exemplo Acipenseriformes, Anguilliformes, Characiformes, Cypriniformes, Salmoniformes, Siluriformes, Perciformes e Tetraodontiformes.

Esses estudos demonstraram que o DNAr 5S, na maioria dos casos, está localizado em regiões intersticiais do cromossomo, facilitando sua conservação no genoma (SCHWEIZER e LOIDL, 1987 *apud* FERNANDES, 2006). Os genes DNAr 45S, por sua vez, quando estão localizados em regiões teloméricas, apresentam maior facilidade na transferência de material genético, aumentando a variabilidade inter e intrapopulacional (FERRO *et al.*, 2001; CENTOFANTE *et al.*, 2003; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2005).

No gênero *Astyanax*, estudos localizando os genes ribossômicos 5S e 45S tiveram seu início em 2001, quando Ferro *et al.* (2001) observaram os genes 5S e 18S em quatro populações de *A. scabripinnis* pertencentes à bacia do Rio Sapucaí-Guaçu. Almeida-Toledo *et al.* (2002) analisaram os genes 5S e 28S em cinco espécies do gênero. Kavalco e Moreira-Filho (2003), Kavalco *et al.* (2004), Mantovani *et al.* (2005), Fernandes (2006), Peres *et al.* (2008), Vicari *et al.* (2008) e Kavalco *et al.* (2009) prosseguiram com essas análises em *Astyanax*.

O DNAr 5S se mostrou conservado nos estudos citados acima, com o 2º ou 3º par metacêntrico constantemente marcado na região centromérica. Adicionalmente, foram evidenciados até oito sinais positivos, nas regiões terminais ou intersticiais de diversos pares de cromossomos.

Os sítios de DNAr 18S, muito mais variáveis que os 5S, apresentam-se localizados em 2 a 16 cromossomos no gênero *Astyanax*, de acordo com os autores supra citados. Nele, *A. scabripinnis* (MANTOVANI *et al.*, 2005) apresentou maior número de sítios ribossômicos 18S, com 16 cromossomos marcados. Kavalco *et al.* (2009) observaram 8 cromossomos em *A. bockmanni*.

Os dados sobre os genes ribossômicos 5S e 18S, reunidos até hoje, tem sido importantes para a caracterização cariotípica das diferentes espécies do gênero *Astyanax*.

1.5. Referências Bibliográficas:

Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S. A. An early stage of sex chromosome differentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae). In: XVI CONGRÉS INTERNAT. DE GÉNÉTIQUE, Toronto, Canadá. Resumos. Toronto, p. 258, 1988.

Almeida-Toledo, L. F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C.; Porto-Foresti, F.; Daniel-Silva, M. F. Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA *clusters* in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenetic. Genome Res. 97 (3-4): 229-233, 2002.

Alves A. L.; Martins-Santos, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n = 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). Cytologia 67: 117-122, 2002.

Alves-Costa, F. A.; Martins, C. DNAr 5S Um novo marcador molecular para analyses geneticas de tilapias. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 35, p 22-27, 2005.

Amemiya C. T.; Gold J. R. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. Copeia, 1: 226-231, 1986.

Andrade, C. G. T. J e Jordão, B. Q. O núcleo da célula. IN: Junqueira, L. C. e Carneiro, J. Biologia Celular e Molecular Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p. 141-169, 2005.

Andrade, I. F.; Araújo, N. C.; Pinese, J. F. Jr; Leal, P. C. B.; Silva, J. F.; Rodrigues, S. C. Avaliação de cenários ambientais na região do médio curso do Rio Araguari. VIII Encontro Interno, XII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008. < www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/IC2008-0440.PDF>

Araujo, A. C. S.; Morelli, S. Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro. Biosci J 22:145-150, 2006.

Artoni, R. F., Vicari, M. R., Matoso, D. A. & Bertollo, L. A. C.. Dados preliminares sobre o cariótipo de *Astyanax cf. eigenmanniorum* (Characidae). 45º Congresso Nacional de Genética, Resumos, 803pp. Gramado (RS), 1999.

Barros, N. M. T.; Margarido V. P. Estudos Cariotípicos em *Astyanax* sp B. (PISCES, CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE) Coletado no Rio Vorá – Bacia do Iguaçu. Genetics and Molecular Biology, 22, nº 3 – supplement, resumo nº 01-40, 1999.

Bertaco, V. A.; L. R. Malabarba. Description of new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the “*A. scabripinnis* species complex”. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 12(3): 221-234, 2001.

Bertaco, V. A.; Lucena C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 4(1): 53-60, 2006.

Bertollo, L. A. C.; Born, G. G.; Dergam, J. A.; Fenocchio, A. S.; Moreira-Filho, O. A biodiversity approach in the Neotropical fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613, 2000.

Bicudo, H. E. M. C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos em eucariotos. *Cienc. Cult.* 37(3): 440 – 447, 1985.

Brito, J. L. S.; Rosa, R. Elaboração do mapa de solos da bacia do Rio Araguari na escala de 1:500.000. II Simpósio Regional de Geografia, Resumo, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, 2003.

CEMIG – Companhia Elétrica de Minas Gerais, Rios de Minas – Bacia do Rio Paranaíba, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://www.portalpeixe vivo.com.br/rios/paranaiba.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

Centofante, L.; Bertollo, L. A. C.; Justi, A. J.; Moreira-Filho, O. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 14 (4): 361-368, 2003.

Denton, T. E. *Fish Chromosome Methodology*. Charles C. Tomas, Chicago, 1973.

Fauz G., Vicente V. E. e Moreira-Filho O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Revista Brasileira Genética* 17: 157-163, 1994.

Feldberg, E.; Porto, J. I. R.; Bertollo, L. A. C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I: Studies on the Genera Curimata, Psectogaster, Steindachmeira and Curimatella. *Brazil. J. Genetics*. V: 15, 369-383, 1992.

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

Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124: 301 – 306, 2005.

Fernandes, C. A. Estudos citogenéticos em três espécies do gênero *Astyanax*, com ênfase no DNA ribossomal. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

Ferreira Neto M.; Vicari M. R.; Camargo E. F.; Artoni R. F.; Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). Genet. Mol. Biol., ahead of print Epub Oct 09, doi: 10.1590/S1415-47572009005000078, 2009.

Ferro, D. A. M.; Neo, D. M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. Genetica 110: 55-62, 2001.

Ferro, D. A. M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. Genética. 119: 147-153, 2003.

Fonteles, S. B. A.; Lopes, A. A.; Fernandes, F. M. C.; Porto-Foresti, F.; Senhorini, J. A.; Daniel-Silva, M. F. Z.; Foresti, F. e Almeida-Toledo, L. F. Cytogenetic characterization of the strongly electric Amazonian eel, *Electrophorus electricus* (Teleostei, Gymnotiformes) from the Brazilian rivers Amazon and Araguaia. Genetics and Molecular Biology, 31, 1 (suppl), 227-230, 2008.

Galetti-Júnior, P. M.; Foresti, F.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolus organizer regions. Caryologia 37: 401-406, 1984.

Galetti-Júnior, P. M. Considerações gerais sobre a citogenética evolutiva de peixes. In: I Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Resumos, p-15. São Carlos (SP), 1986.

Galetti-Júnior, P. M.; Martins, C. Contribuição da Hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra, M. FISH conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto, SBG, p. 61-88, 2004.

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

Jesus C. M.; Moreira-Filho, O. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Caryologia 56(3): 281– 287, 2003.

Kavalco K. F.; Moreira-Filho, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. Caryologia, 56: 453 – 461, 2003.

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

Kavalco K. F., Pazza R.; Almeida-Toledo L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* 136:135–139, 2009.

Kosswig, C. The role of fish in research on genetics and evolution. In: Schroder, J. H. (ed.), *Genetics and fish mutagenesis*, Springer – Verlag, Berlin – Heidelberg – Nova York, 3-16, 1973.

Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, Jr., C.J., Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, p. 106-169, 2003.

Maistro, E. L.; Oliveira, C.; Foresti, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica* 110: 177–183, 2001.

Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A.; Moreira-Filho, O.; Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109: 161–168, 2000.

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

Martins, C.; Wasko, A. P. Organization and evolution of 5s ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on Genome Research* Editor: Clyde R. Williams, pp. 335-363, 2004.

Medrado A. S.; Figueiredo A. V. A.; Waldschmidt A. M.; Affonso P. R. A. M.; Carneiro P. L. S. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genet Mol Biol* 31: 208-214, 2008.

Mestriner, C. A. Análises das regiões organizadoras de nucléolos e investigação do sistema XX/XY descrito para *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 1993.

Mizoguchi S. M. H. N.; Martins-Santos I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127: 249-253, 1997.

Mondin, L. A. C.; Troy, W. P.; Miyzawa, C. S. Descrição cariotípica de *Salminus maxillosus* (Characidae, Salminae) e *Acestrorhynchus pantaneiro* (Acestrorhynchinae), da bacia do Pantanal, MT. In: 45º Congresso Nacional de Genética, Resumos, 803pp. Gramado (RS), 1999.

Moreira-Filho O.; Bertollo L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Brazil J Genet* 14: 331-357, 1991.

Moreira-Filho, O. Estudos na família Parodontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco – SP. Aspectos citogenéticos e considerações correlatas. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1983.

Moreira-Filho O., Galetti-Júnior, P. M.; Bertollo, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 106:230-234, 2004.

Morelli, S.; Bertollo, L. A. C.; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Toledo, S. F. A.. Cytogenetics Considerations on the genus *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE). I Karyotypic variability. *Cariologia*. 36(3), 235-244, 1983.

Morelli, S. Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces – Characidae). 219pp. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1981.

Morelli, S.; Vicari, M. R.; Bertollo, L. A. C. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Braz. J. Biol.*, 67(4, Suppl.): 897-903, 2007.

Nakayama, C. M.; Porto, J. I. R.; Feldberg, E. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1958 (CHARACIFORMES, SERRASALMIDAE) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 30: 149-154, 2000.

Nakayama, C. M.; Porto, J. I. R. e Feldberg, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetica* 114: 231–236, 2002.

Nelson, J. S. *Fishes of the world*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2006.
Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Britski, H. A.; Toledo-Filho, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazil. J. Genetics*. 11: 577 – 624, 1988.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus, Resumos. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p. 24, 2000.

Paintner-Marques T. R.; Giuliano-Caetano L.; Dias A. L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology*, 26: 145-149, 2003.

Pazza, R.; Kavalco, K. F.; Bertollo, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome Res.* 112:313–319, 2006.

Pazza R.; Kavalco S. A. F.; Penteados P. R.; Kavalco K. F.; Almeida-Toledo L. F. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *J Fish Biol* 72: 2002-2010, 2008.

Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A. C.; Moreira Filho, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 222-226, 2008.

Rêgo, A. C. L. Composição, abundância e dinâmica reprodutiva e alimentar de populações de peixes de um reservatório recém – formado (UHE - Capim Branco I / MG). 62f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C. Check List of Freshwater of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742 p., 2003.

Rocon-Stange, E. A.; Almeida-Toledo, L. F. Supernumerary B chromosome restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazil J. Genet.* 16: 601–615, 1993.

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

Souza, I. L.; Santos-Silva L. K.; Venere P. C.; Moreira-Filho O. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron.* 39: 1036–1041, 2008.

Stripecke R., Nogueira-Pinto M. T., Hackel C. & Sazima I. O cariótipo de *Astyanax eighmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). XII Congresso Brasileiro de Zoologia pp 173 Campinas, Brazil, 1985.

Toledo-Filho S. A.; Foresti F.; Ribeiro A. F. Ictiofauna: Aspectos básicos e aplicados. *Ciência e Cultura* 30 (3): 320 – 327, 1978.

Torres, R.A., Ganal, M.; Hemleben, V. GC balance in the internal transcribed spacer ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* 30: 170-181, 1990.

Torres-Mariano, A. R.; Morelli, S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (PISCES, CHARACIDAE) from the Araguari river, Uberlândia, MG. Brazil. *Braz. J. Biol.* 66(1A): 161-165, 2006.

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

Vari R. P.; Castro R. M. C. New Species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* (1): 150–162, 2007.

Vaz, M. M.; Torquato, V. C.; Barbosa, N. D. de C. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG – Companhia Energética de Minas Gerais e CETEC – Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 144p, 2000.

Venere, P. C.; Margarido, V. P.; Galetti-Júnior, P. M. Análises comparativas entre *Salminus hilarii* (Characidae, Salminae) de duas bacias hidrográficas distintas: Alto Paraná e Araguaia. In: VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Resumos, p. 23, São Carlos (SP), 1996.

Vicari M. R., Noleto R. F., Artoni R. F., Moreira-Filho O., Bertollo L. A. C.: Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genet Mol Biol* 31 (suppl): 173-179, 2008.

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

Wasko, A. P.; Galetti-Júnior., P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology*, 23: 135-138, 2000.

WIKIPEDIA, Enciclopédia Livre. Brasil, 2008. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Rio_Araguari_\(Minas_Gerais\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Rio_Araguari_(Minas_Gerais))> . Acesso em 01 fev. 2009.

Capítulo 2

B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum*
(Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin
(Uberlândia, MG, Brazil)

Publicado em Genetics and Molecular Biology
2008

2. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil)

Alessandra Ribeiro Torres-Mariano and Sandra Morelli

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

Abstract

A cytogenetic study was conducted on an *Astyanax eigenmanniorum* population from the Caetano Stream (18° 44' 56" S/ 048° 18' 39" W) - in Uberlândia, MG, Brazil - showing a modal diploid number of 48 chromosomes in the standard male and female karyotypes. However, in several specimens it was also possible to observe metaphases with one or two B chromosomes, increasing the diploid number to 49 or 50 chromosomes, respectively. The supernumerary chromosomes were totally heterochromatic and highlighted after C-banding. The silver-stained nucleolus organizing regions (AgNORs) were located in at least five chromosomes of the standard karyotype, thus characterizing a multiple NOR system in the species. This is the first occurrence of an *A. eigenmanniorum* population with $2n = 48$ chromosomes, bearing supernumerary chromosomes.

Key words: Characidae, *Astyanax eigenmanniorum*, supernumerary chromosome, heterochromatin, nucleolus organizing regions (NORs).

Received: August 18, 2006; Accepted: May 22, 2007.

Preliminary cytogenetic studies in Brazilian *Astyanax* species were initiated in the late 1970s by Foresti *et al.* (1977). Further studies confirmed that the chromosomal number in this fish group ranges from $2n = 36$ in *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983) to $2n = 50$ in *A. altiparanae* (Pacheco *et al.*, 2001; Fernandes and Martins-Santos, 2004) and *A. eigenmanniorum* (Stripecke *et al.*, 1985; Fauaz *et al.*, 1994; Pfister and Moreira-Filho, 1997). *A. scabripinnis* (Morelli *et al.*, 1983; Araujo and

Morelli, 2006), *A. fasciatus* (Morelli *et al.*, 1983; Torres-Mariano and Morelli, 2006), and *A. altiparanae* correspond to the species with the highest number of cytogenetic studies.

Karyotypic variability among different *Astyanax* fish populations is very common and, in some cases, the presence of different numbers of chromosomes has been found among individuals of the same population, such as in *A. fasciatus* (Pazza *et al.*, 2006) and *A. scabripinnis* (Kavalco and Moreira-Filho, 2003; Fernandes and Martins-Santos, 2005).

Supernumerary or B chromosomes are additional dispensable chromosomes that are present in some individuals from some populations in some species, which have probably arisen from the A (standard) chromosomes but follow their own evolutionary pathway (Camacho *et al.*, 2000).

These chromosomes may constitute an alternative form of organization of the genetic material and can be considered true parasites, remaining in populations exclusively by means of their distinctive transmission mechanisms (Rejón *et al.*, 1987).

B chromosomes can be found in haploid or diploid organisms, and can be seen totally or partially heterochromatic (Jones, 1991), after the C-banding technique (Sumner, 1972). However, although very common, these characteristics are not present in all B chromosomes (Beukeboom, 1994). Among fishes, the most studied species is *A. scabripinnis*, which presents macro- and micro-supernumerary chromosomes with a frequency that varies between males and females and according to the altitude at which populations occur (Salvador and Moreira-Filho, 1992; Vicente *et al.*, 1996; Néo *et al.*, 2000; Mestriner *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2003; Moreira-Filho *et al.*, 2004; Araujo and Morelli, 2006).

This paper gives the description of a large metacentric supernumerary chromosome in *A. eigenmanniorum* from the Caetano Stream (18° 44' 56" S/ 048° 18' 39" W, Uberlândia, MG, Brazil). Thirteen specimens (five males, seven females, and one unsexed) were cytogenetically analyzed. The animals were identified by Dr. Valdener Garutti (UNESP, São José do Rio Preto, SP), and further registered and

deposited in the fish collection of the Laboratory of Animal Cytogenetics, at the Federal University of Uberlândia.

Mitotic chromosomes were obtained according to Bertollo *et al.* (1978). Nucleolus organizer regions (AgNORs) were identified following the procedure described by Howell and Black (1980). Constitutive heterochromatin was detected using the C-banding technique (Sumner, 1972). The chromosome morphology was determined on the basis of the arm ratio (AR), as proposed by Levan *et al.* (1964), and the chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st), and acrocentric (a).

A. eigenmanniorum presented a standard karyotype with a diploid number of $2n = 48$ chromosomes, both in males and females (Table 1) and a karyotype composed of 7 pairs of metacentric (m), 9 pairs of submetacentric (sm), 5 pairs of subtelocentric (st), and 3 pairs of acrocentric (a) chromosomes (Figure 1a). However, in several specimens it was also possible to observe metaphases with one or two B chromosomes, increasing the diploid number up to 49 chromosomes or 50 chromosomes (Table 1). In three females the proportion between 48 and 49 chromosomes was very similar (Table 1). The metaphases with 49 and 50 chromosomes showed the presence of one or two large metacentric supernumerary chromosomes, respectively (Figure 1b, c), corresponding in size to the second chromosome pair of the A complement, which proved to be totally heterochromatic when subjected to C-banding (Figure 1e). The other chromosomes showed heterochromatin located at the telomeric and/or centromeric regions, as well as in the whole short arm (Figure 1e). Although two male specimens (n. 584 and 623) showed $2n = 49$ chromosomes, a low metaphase index was found with this chromosome number (Table 1), and they did not present completely heterochromatic chromosomes after C-banding. Thus, the extra chromosome found in these cases appears only to be a lost chromosome from another standard metaphase.

A. eigenmanniorum is characterized by a multiple NOR system. Indeed, AgNORs were seen in different chromosome pairs of the standard karyotype. In the first pair of submetacentric chromosome it is also evident a size polymorphism between the homologous NORs, but with a low frequency (Figure 1d).

Data from only three *A. eigenmanniorum* populations have been described to date (Stripecke *et al.*, 1985; Fauaz *et al.*, 1994; Pfister and Moreira-Filho, 1997), all with $2n = 50$ chromosomes. Some triploid specimens were found in populations of the

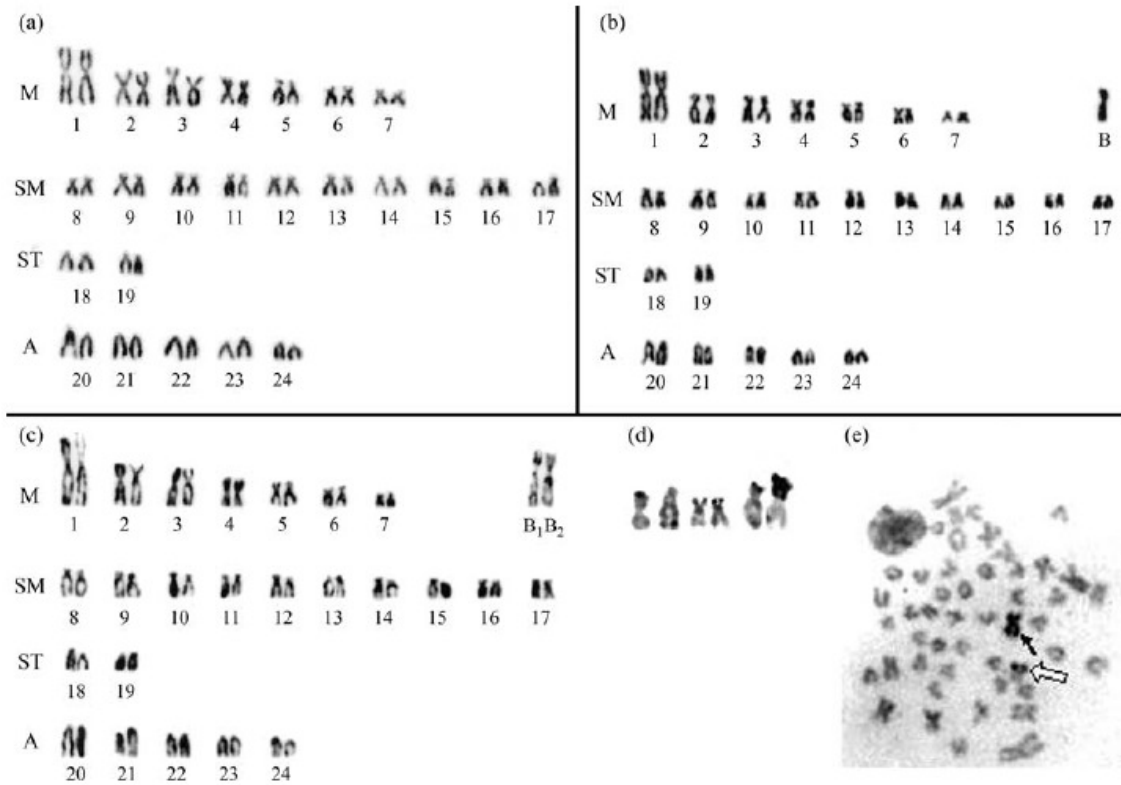


Figure 1 - Karyotypes of *A. eigenmanniorum* from the Caetano Stream, presenting 48 chromosomes (a), 49 chromosomes with 1 B chromosome (b), and 50 chromosomes with 2 B chromosomes (c). In (d) Ag-NOR bearing chromosomes - from left to right: 3rd metacentric chromosome, an acrocentric chromosome (which is rarely detected), 4th metacentric pair, and 1st submetacentric pair, highlighting the size polymorphism of the NOR site. In (e) C-banded metaphase: the small black arrow indicates the heterochromatic supernumerary chromosome; the thick white one indicates the metacentric NOR bearing chromosome.

Table 1 - Chromosome number frequency found in *Astyanax eigenmanniorum* from the Caetano Stream.

Specimen registration	Sex and diploid chromosome number					
	sex	46	47	48	49	50
577	M	8	11	18		
578	M	8	7	20		
584	M	6	2	29	1	
623	M	6	9	22	2	
581	F	7	4	18	6	
583	F	12	7	33	39	1
613	F	0	3	7	18	2
617	F	6	4	13	14	6
620	F	3	8	4	21	4
622	F	6	8	9	19	1
1314	F	4	4	17	12	1
Total number of cells		66	67	190	132	15

M: male. F: female.

Grande River, MG (Fauaz *et al.*, 1994), and only one female from Atibaia River population showed a B chromosome whose size corresponds to that found in the present paper (Stripecke *et al.*, 1985). In the *A. eigenmanniorum* population from the Caetano Stream, the presence of at least one totally heterochromatic B chromosome was evidenced in several specimens. It is also interesting to note that these specimens presented inter- and intra-individual variation in chromosome number (Table 1), suggesting a recent origin for the B chromosomes in this population.

This paper also describes, for the first time, the presence of supernumerary chromosomes in an *A. eigenmanniorum* population with the diploid number equal to 48 chromosomes.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Valdener Garutti for identifying the specimens and to the financial support from CAPES, CNPq, FAPEMIG, and UFU (Brazil).

References:

Araujo ACS and Morelli S (2006) Comparação citogenética de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região do Triângulo Mineiro. Biosci J 22:145-150.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Rev Bras Genet 1:103-120.

Beukeboom LW (1994) Bewildering B: An impression of the 1st B-chromosome conference. Heredity 73:328-336.

Camacho JP, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. Phil Trans R Soc Lond 355:163-178.

Fauaz G, Vicente VE and Moreira-Filho O (1994) Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). Rev Brasil Genet 17:157-163.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2004) Cytogenetics study in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). Hereditas 141:328-332.

Fernandes CA and Martins-Santos IC (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. Genetica 124:301-306.

Ferro DAM, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. Genetica 119:147-153.

Foresti F, Toledo-Filho AS and Ribeiro AF (1977) Chromosomal and biochemical genetic studies in *Astyanax* (Pisces, Characidae). Anais do III Latin American Congress of Genetics, Montevideo, Uruguay.

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

Jones RN (1991) B-chromosome drive. *Am Nat* 137:430-432.

Kavalco KF and Moreira-Filho O (2003) Cytogenetic analyses of four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from the Paraíba do Sul River Basin. *Caryologia* 56:453-461.

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

Mestriner CA, Galetti Jr PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O and Camacho RPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85:1-9.

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

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (2004) B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 106:230-234.

Néo MD, Moreira-Filho O and Camacho JPM (2000) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85:136-141.

Pacheco RB, Giuliano-Caetano L and Dias AL (2001) Cytotypes and multiple NOR in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). *Chrom Sci* 5:109-114.

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

Pfister SC and Moreira-Filho O (1997) Caracterização citogenética de uma população de *Astyanax eigenmanniorum*. *Brazil J Genet (suppl)* 20:101.

Rejón MR, Rejón CR and Oliver JL (1987) Evolucion de los cromosomas B. *Investigacion y Ciencia* 133:92-101.

Salvador LB and Moreira-Filho O (1992) B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69:50-56.

Stripecke R, Nogueira-Pinto MT, Hackel C and Sazima I (1985) O cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). XII Congresso Brasileiro de Zoologia pp 173. Campinas, Brazil.

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

Torres-Mariano AR and Morelli S (2006). Chromosome analysis in *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from Araguari River, Uberlândia, MG. *Braz J Biol* 66:161-165.

Vicente VE, Moreira-Filho O and Camacho JPM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *A. scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Cell Genet* 74:70-75.

Associate Editor: Luiz Antonio Carlos Bertollo

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Capítulo 3

Caracterização das NORs, sito ribossômico 5S e da heterocromatina do cromossomo B em *Astyanax bockmanni*, Vari & Castro, 2007 (Characiformes, Characidae) da bacia do Rio Araguari (Uberlândia, MG)

Short Communication – Journal of Fish Biology

3. Caracterização das regiões organizadoras nucleolares e da heterocromatina do cromossomo B em *Astyanax bockmanni*, Vari & Castro, 2007 (Characiformes, Characidae) da bacia do Rio Araguari (Uberlândia, MG, Brasil)

Alessandra Ribeiro Torres-Mariano & Sandra Morelli

Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia

Resumo

Análises da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda de DNAr 18S, evidenciaram seis sítios ribossômicos, confirmando os dados de AgNORs e CMA₃ e com a sonda de DNAr 5S foi encontrada em dois pares de cromossomos: um em região telomérica e outro pericentromérica. O tratamento com DAPI destacou todo o cromossomo supranumerário que quando submetido a tratamento com a CMA₃ não apresentou marcas, evidenciando a presença de heterocromatina rica em bases AT. Pela diversidade das características entre as populações de *A. bockmanni* estudadas, pode-se propor que esta seja um complexo de espécies, assim como outras do gênero *Astyanax*.

Palavras Chave: Genes ribossomais, NOR, Fluorocromos, Cromossomo supranumerário, *Astyanax bockmanni*.

Os cromossomos de peixes e suas relações evolutivas têm sido caracterizados utilizando metodologias de bandamento, tais como banda C e impregnação das regiões organizadoras nucleolares com nitrato de Prata (AgNOR); fluorocromos e hibridação *in situ*, que evidenciam regiões cromossômicas específicas (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1988; FELDBERG *et al.*, 1992). Essas metodologias podem ser utilizadas como excelentes marcadores populacionais, evidenciando um alto grau de polimorfismo inter- e intraespecífico.

A AgNOR evidencia apenas os cromossomos portadores das NORs que estiveram ativas em interfases precedentes e por isso, normalmente, essa informação é complementada com o uso de fluorocromos com afinidade por bases GC; pois na maioria das espécies de peixes, essas regiões estão relacionadas às NORs e as evidenciam independente de sua atividade (AMEMIYA e GOLD, 1986).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de segmentos de DNA específicos, tais como os genes ribossomais 18S e 5S vêm permitindo a localização exata dessas regiões no genoma (MESTRINER *et al.*, 2000; PAZZA *et al.*, 2006; KAVALCO *et al.*, 2009).

Estudos citogenéticos em *A. bockmanni* (VARI e CASTRO, 2007), anteriormente identificada como *A. eigenmanniorum*, são raros, sendo descritas apenas cinco populações. O número de cromossomos encontrado na maioria delas foi igual a 50, porém a população descrita por Torres-Mariano e Morelli (2008) apresentou 48, 49 e 50 cromossomos e um ou dois cromossomos supranumerários metacêntricos grandes, apenas em fêmeas. Dados relacionando as AgNORs com FISH utilizando sondas de DNAr 18S e 5S estão disponíveis apenas para a população da bacia do Rio Paranapanema (STRIPECKE *et al.*, 1985; FAUAZ *et al.*, 1994; PFISTER *et al.*, 1997; TORRES-MARIANO e MORELLI, 2008 e KAVALCO *et al.*, 2009)..

O presente trabalho é uma complementação da caracterização citogenética de *A. bockmanni* do Córrego dos Caetano, bacia do Rio Araguari (Uberlândia, MG, Brasil) (TORRES-MARIANO e MORELLI, 2008), com o objetivo de localizar fisicamente os sítios ribossômicos 5S e 18S, além de caracterizar a heterocromatina constitutiva de seus cromossomos supranumerários.

Foram utilizados 16 exemplares (5 machos, 10 fêmeas e 1 sexo indefinido) coletados no Córrego dos Caetano (18° 44' 56" S/ 048° 18' 39" O), para a obtenção dos cromossomos mitóticos utilizando a técnica descrita por Bertollo *et al.* (1978). As regiões ricas em A/T e G/C foram evidenciadas utilizando a técnica descrita por Christian *et al.* (1998). A FISH foi realizada conforme a metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. As sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S utilizadas são heterólogas de *Moenkausia sanctaefilomenae*.

Em estudos prévios, Torres-Mariano e Morelli (2008) evidenciaram até seis cromossomos portadores de AgNORs teloméricas em *A. bockmanni*, destacando-se o primeiro par submetacêntrico que apresenta polimorfismo de tamanho das NORs. Quando esse material foi submetido à coloração com CMA₃, seis cromossomos apresentaram sítios positivos teloméricos (Figura 1b), concordando com a localização também telomérica das AgNORs (Torres-Mariano e Morelli, 2008). O maior par de cromossomos submetacêntricos (sm) mostrou-se constantemente marcado nas metáfases analisadas. De acordo com Amemiya e Gold (1986), cromossomos de peixes e anfíbios são muito semelhantes em sua composição e possuem regiões ricas em pares de bases GC relacionadas com as NORs. Essas regiões podem ser interespaçadoras, de heterocromatina associada às NORs ou sítios de DNAr. Artoni *et al.* (1999) considera que a coloração com CMA₃ não deve ser utilizada como um método direto e único de detecção dos genes ribossômicos, pois pode também evidenciar heterocromatina constituída de grande quantidade de bases GC, além das regiões heterocromáticas associadas às NORs.

Em eucariotos superiores, as NORs são constituídas pela união dos sítios ribossômicos 18S, 5.8S e 28S (45S), que se organizam para formar as subunidades do ribossomo. O RNAr 5S, que está localizado fora da região das NORs, se une aos RNAr 5,8S e 28S para formar a subunidade maior dos ribossomos. Esses genes estão presentes em milhares de cópias repetidas em seqüência por genoma e organizados em duas famílias multigênicas distintas: 5S e 45S, (MARTINS e WASCO, 2004; ANDRADE e JORDÃO, 2005).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda de DNAr 18S, localizou seis sítios ribossômicos, corroborando os dados de AgNORs e CMA₃ (Figura 3). Kavalco *et al.* (2009) detectou a presença de oito cromossomos subteloacrocêntricos portadores de NORs, utilizando FISH e coloração com nitrato de Prata, caracterizando um sistema de NORs múltiplas na população de *A. bockmanni* da bacia do rio Paranapanema.

A região codificante do sítio ribossômico 5S é conservada mesmo entre organismos filogeneticamente distantes, incluindo os peixes. Nesses organismos, na maioria das vezes, ocupam uma região intersticial nos cromossomos (WASKO e

GALETTI-JÚNIOR, 2000). Essa localização pode dificultar a transferência de material genético entre cromossomos. No gênero *Astyanax*, a distribuição do sítio ribossômico 5S é diversificada, embora ocorra a predominância de um par de cromossomos portadores desses genes, além da possibilidade de ser encontrado em sintenia com o sítio de DNAr 18S (KAVALKO *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a sonda de DNAr 5S localizou esse cístron de forma bem evidente em um par de cromossomos acrocêntricos de médio porte, na região telomérica, além de um cromossomo metacêntrico com um sítio discreto na região intersticial, próximo ao centrômero (Figura 3). Em *A. bockmanni* de duas populações da bacia do rio Paranapanema foram observadas marcações em dois pares de cromossomos metacêntricos, sendo uma telomérica e a outra intersticial (KAVALCO *et al.*, 2009). A localização dos genes DNAr 5S no gênero *Astyanax* parece ser conservada em relação ao par de metacêntrico, que já foi evidenciado em diversas espécies (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006; PERES *et al.*, 2008). Na população de *A. bokmanni* ora analisada os sítios ribossômicos 5S e 18S ocorrem em sintenia no cromossomo metacêntrico, assim como em algumas outras espécies de *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2005).

A população de *A. bockmanni* analisada por Torres-Mariano e Morelli (2008) apresenta um ou dois cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos, de tamanho correspondente ao 2º do complemento. No presente estudo, esse cromossomo não apresentou marcação positiva quando submetido à coloração com CMA₃ (Figura 1b), porém mostrou-se positivo quando corado com DAPI (Figura 2), indicando que sua heterocromatina é rica em bases AT. Cromossomos B com heterocromatina rica em bases AT também foram encontrados em *A. scabripinnis*, em um estudo realizado por Mestriner *et al.* (2000). Neste caso foi isolado um DNA satélite de 51pb, o qual foi chamado de As51, com aproximadamente 59% de bases AT. Essa seqüência repetitiva está presente em outras populações da mesma e de outras espécies de *Astyanax*, tais como *A. fasciatus* da bacia do Rio Tietê (SP) e *A. scabripinnis* das bacias dos rios São Francisco e Paranapanema (ABEL *et al.*, 2006).

DNA repetitivo em *tandem*, rico em bases AT, são relativamente comuns em peixes (MESTRINER *et al.* 2000).

A presença de NOR em cromossomos supranumerários não é comum, apesar de já terem sido descritos alguns casos como em gafanhotos (CAMACHO, 2000). De acordo com os dados coletados até o presente momento, cromossomos supranumerários de peixes do gênero *Astyanax*, não apresentam sítios ribossômicos, assim como *A. bockmanni* analisado nesse trabalho.

Os estudos realizados em *A. bockmanni* ainda são escassos e, por isso, os resultados deste trabalho vêm acrescentar novos dados para o conhecimento da estrutura cariotípica dessa espécie. Como visto, *A. bockmanni* do Córrego dos Caetano (bacia do Rio Araguari) mostra-se divergente das demais populações dessa espécie já analisadas. Seu número diplóide $2n=48$ contrasta com $2n=50$, encontrado para a maioria das demais populações. Além disso, o número de sítios de DNAr 18S diverge daquele encontrado para a população do rio Paranapanema, bem como a localização dos sítios de DNAr 5S. Ao que tudo indica, é possível que *A. bockmanni* possa também englobar um grupo de espécies distintas, à semelhança do que ocorre com outras espécies do gênero *Astyanax*.

Agradecimentos: Dr. Valdener Garutti e Dr. Francisco Langeani Neto, Dr. Fausto Foresti, Ms. Patrícia Elda Sobrinho, Dra. Débora Diniz, pela contribuição; CAPES, CNPq, FAPEMIG, and UFU (Brazil).

3.1. Referências Bibliográficas:

- Abel, L. D. S. Mantovani; M. & Moreira-Filho, O. (2006) Chromosomal distribution of the As-51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (*Pisces*, *Characidae*). *Genetics and Molecular Biology* **29**: 448–452.
- Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F. & Toledo-Filho, S. A. (1988) An early stage of sex chromosome differentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae). In: *XVI Congrès Internat. de Génétique*, Toronto, Canadá. Resumos. Toronto, p. 258.
- Almeida-Toledo, L. F.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti F., Bonillo C.; Porto-Foresti F. & Daniel-Silva M. F. Z. (2002). Conservation of the 5S bearing chromosome pair

- and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetics and Genome Research*. **97** (3-4): 229-233.
- Amemiya, C. T. & Gold, J. R. (1986). Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* **1986**: 226-231.
- Andrade, C. G. T. J & Jordão, B. Q. (2005) O núcleo da célula. IN: Junqueira, L. C. e Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p. 141-169.
- Artoni, R. F.; Molina, W. F.; Bertollo, L. A. C. & Galetti-Júnior, P. M. (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* **22**: 39-44.
- Bertollo, L. A. C.; Takahashi, C. S. & Moreira-Filho, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetic*. **1**: 103-120.
- Camacho, J. P.; Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000) B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **355**: 163-178.
- Christian, A.; McNeil, E.; Robinson, J.; Drabek, R.; LaRue, S.; Waldren, C. & Bedford, J (1998) A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **82**: 172-179 .
- Fauaz, G.; Vicente, V. E. & Moreira-Filho, O. (1994) Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Revista Brasileira Genética* **17**: 157-163.
- Feldberg, E.; Porto, J. I. R. & Bertollo, L. A. C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I: Studies on the Genera Curimata, Psectogaster, Steindachmeira and Curimatella. *Brazilian Journal of Genetics*. **15**: 369-383, 1992.
- Fernandes C. A. & Martins-Santos I. C. (2006) Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. *Caryologia*, **59**: 253-259.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R. & Almeida-Toledo, L. F. (2009) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* **136**: 135–139.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C. & 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.

- Mantovani, M.; Abel, L. D. S. & Moreira-Filho, O. (2005) Conserved 5S and variable 45S DNAr chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* **123**: 211-216.
- Martins, C. & Wasko, A. P. (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on Genome Research*. Editor: Clyde R. Williams, pp. 335-363.
- Mestriner, C. A.; Galetti-Júnior, P. M.; Valentini, S. R.; Ruiz, I. R. G.; Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. & Camacho, J. P. M. (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* **85**: 1–9.
- Pazza, R.; Kavalco, K. F. & Bertollo, L. A. C. (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*. **112**: 313–319.
- Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A. C. & Moreira Filho, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, **31**: 222-226.
- Pfister, S. C. & Moreira-Filho, O. (1997) Caracterização citogenética de uma população de *Astyanax eigenmanniorum*. *Brazilian Journal Genetics (suppl)* **20**: 101. 43º Congresso Nacional de Genética, Goiânia (GO), Brasil.
- Pinkel, D.; Straume, T. & Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 2934-2938.
- Stripecke, R.; Nogueira-Pinto, M. T.; Hackel, C. & Sazima, I. (1985) O cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). *XII Congresso Brasileiro de Zoologia*, pp 173 Campinas, Brasil.
- Torres-Mariano, A. R. & Morelli, S. (2008) B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, **31**: 246-249.
- Vari, R. P. & Castro, R. M. C. (2007) New Species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia*, **1**: 150–162
- Wasko, A. P. & Galetti-Júnior, P. M. (2000) Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology*, **23**: 135-138.

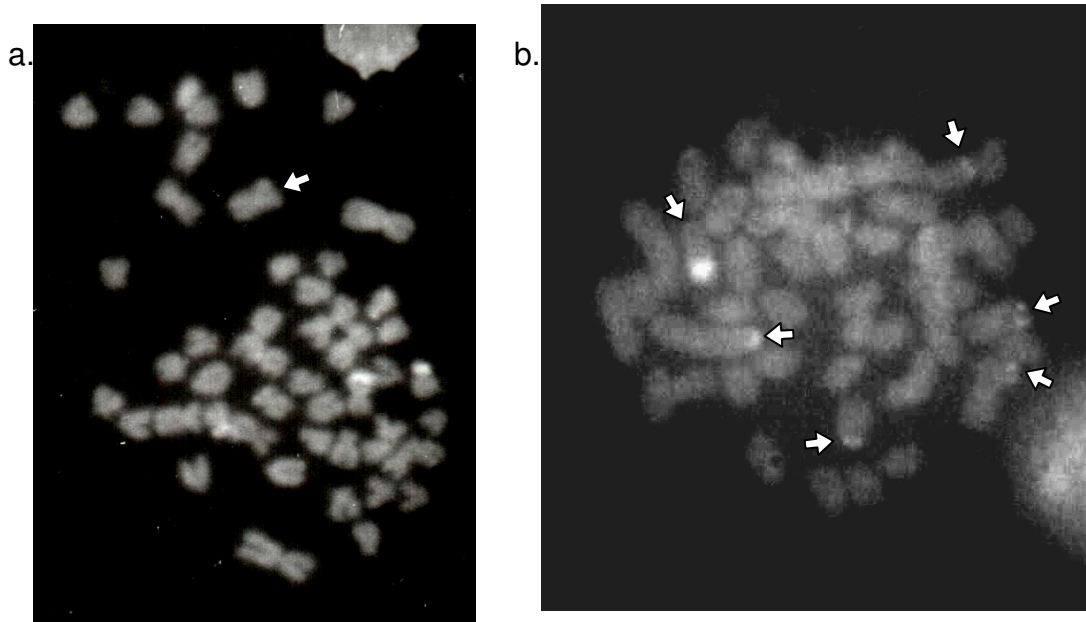


Figura 1: Metáfase de *A. bockmanni* tratada com CMA₃, destacando em (a) o cromossomo B, indicado pela seta e em (b) as setas apontam seis cromossomos CMA₃ positivos em regiões teloméricas.

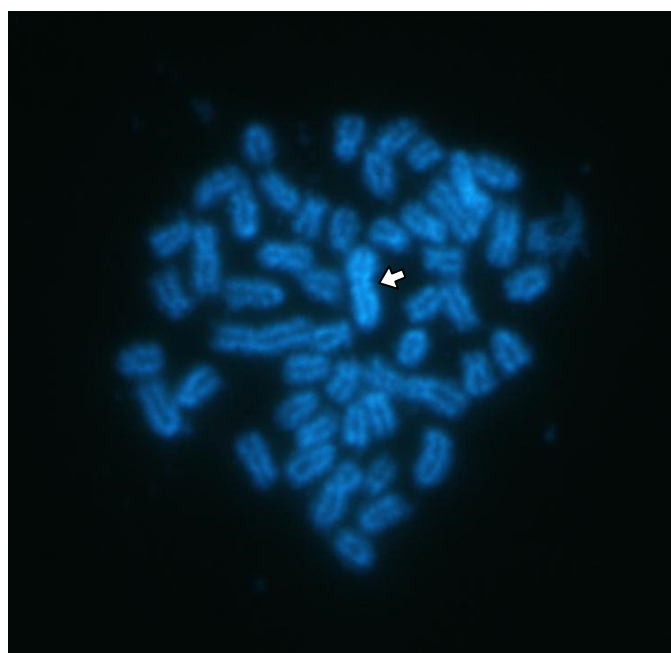


Figura 2: Metáfase de *A. bockmanni* tratada com DAPI. A seta indica o cromossomo supranumerário.

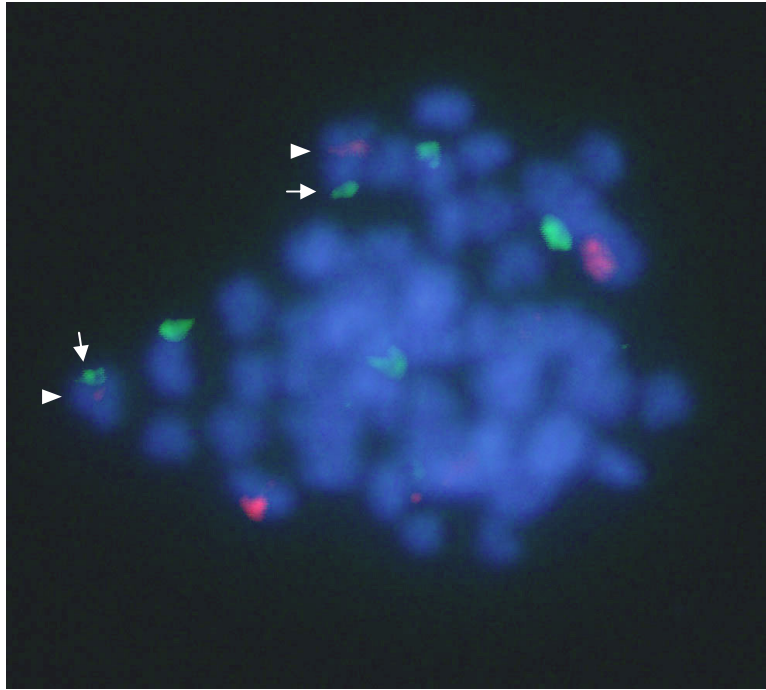


Figura 3: Metáfase de *A. bockmanni* submetida à técnica de double FISH. As marcas vermelhas destacam os sítios de DNAr 5S e as marcas verdes os sítios de DNAr 18S. As pontas das setas indicam marcas discretas de sítios de DNAr 5S e as setas destacam cromossomos portadores de marcas em sintenia.

Capítulo 4

Localização de sítios ribossômicos 5S e 18S em três populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae* (Pisces, Characidae) da bacia do Alto Paraná – Uberlândia (MG)

(Journal of Fish Biology)

4. Localização de sítios ribossômicos 5S e 18S em três populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae* (Pisces, Characidae) da bacia do Alto Paraná – Uberlândia MG

Alessandra Ribeiro Torres-Mariano & Sandra Morelli

Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia

Resumo:

O complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*, pertencente ao gênero *Astyanax* classificado hoje como *Incertae Sedis*, é composto por 15 espécies incluindo *A. paranae*. Nesse estudo foram analisadas 3 populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae* da bacia do Rio Araguari (Uberlândia, MG, Brasil) que apresentaram número cromossômico igual a 50, com algumas variações na fórmula cariotípica; AgNOR múltiplas coincidindo com os dados obtidos pelo tratamento com CMA₃ e FISH utilizando sondas de DNAr 18. A sonda de DNAr 5S utilizada na FISH marcou um par de cromossomos metacêntricos e um par acrocentrico nas 3 populações. O tratamento com DAPI não evidencia uma distinção concreta entre estas populações. Apesar de esses dados serem coincidentes nessas populações, elas exibem particularidades que permitem uma distinção entre elas, provavelmente determinada pelo isolamento geográfico a que estão submetidas.

Palavras Chave: *Astyanax scabripinnis*, Fluorocromos, FISH e Genes ribossomais

4.1. Introdução

Astyanax scabripinnis (Characidae, *Incertae Sedis*) foi considerada como um complexo de espécies a partir dos estudos de Moreira-Filho e Bertollo (1991), quando foram analisadas sete populações de bacias hidrográficas diferentes, citogenética e morfologicamente. Bertaco e Lucena (2006) consideram que esse complexo é composto por aproximadamente 15 espécies, incluindo *A. paranae*.

O número diplóide das espécies que formam o complexo *A. scabripinnis* varia de $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$ (ALVES e MARTINS-SANTOS, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2005; PERES *et al.*, 2008; VICARI *et al.*, 2008), sendo este último o mais comum. Suas regiões organizadoras de nucléolos (NOR) normalmente são múltiplas.

A impregnação com o nitrato de Prata nas regiões organizadoras nucleolares (AgNORs) é um método indireto, já que a Prata tem afinidade pelas proteínas associadas ao RNAr recém transcrito nos sítios de DNAr e, por esse motivo, não evidencia todas as NORs existentes, mas apenas as ativas em interfases precedentes (HOWELL, 1977). Elas também podem ser evidenciadas pela coloração com Cromomicina A₃ (CMA₃) já que este é um fluorocromo com afinidade por seqüências ricas em G-C (SCHWEIZER, 1976) que, na maioria das espécies de peixes, estão relacionadas às NORs (AMEMIYA e GOLD, 1986).

Por outro lado, a hibridização fluorescente “in situ” (FISH) revela a localização exata de todos esses sítios, independente de sua atividade, permitindo um melhor entendimento da organização do genoma dos peixes, tendo sido bastante utilizada na localização regiões cromossômicas específicas, como DNA satélites (MESTRINER *et al.*, 2000; MANTOVANI *et al.*, 2004; ABEL *et al.*, 2006, KAVALCO *et al.*, 2007), além dos sítios ribossômicos 5S e 18S (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; KAVALCO *et al.*, 2004; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006a; KAVALCO *et al.*, 2009).

Nesse estudo foram analisados os cariótipos de três populações de *Astyanax* sp. gr *A. paranae* da bacia do rio Araguari, pertencente à bacia do Alto Paraná, utilizando coloração convencional com Giemsa, impregnação com nitrato de Prata, CMA₃, DAPI e FISH com sondas de DNAr 5S e 18S, com o objetivo de verificar possíveis diferenciações entre as populações, decorrentes do isolamento geográfico entre elas.

4.2. Material e Métodos

Foram analisadas três populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae*, sendo: 18 espécimes (4 machos, 12 fêmeas e 2 sexo indefinido) oriundos do Córrego dos Caetano (18°44'47S/048°18'42O) e aqui denominados de *Astyanax* sp CC; 11 exemplares (3 machos, e 4 fêmeas e 4 sexo indefinido) do Córrego Quilombo (18°44'47S/048°18'41O), identificados por *Astyanax* sp. Q e 9 indivíduos (2 machos e 7 fêmeas) provenientes de um açude localizado na fazenda Lageado, formado por uma nascente que deságua no Córrego dos Caetano (18°44'43S/048°18'49O), denominados *Astyanax* sp. A. Todos esses locais de coleta fazem parte da bacia do Rio Araguari (Figura 1), contribuinte da bacia do Rio Paranaíba, que é o principal formador da bacia do Alto Paraná; e se encontram localizados no município de Uberlândia, MG, Brasil. Os exemplares foram identificados pelo Prof. Dr. Francisco Langeani Neto e foram depositados na Coleção de Peixes da UNESP – Campus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos utilizando a técnica descrita por Bertollo *et al.* (1978), com algumas modificações. As NORs foram detectadas pela técnica descrita por Howell e Black (1980), também com algumas adaptações. A coloração com Cromomicina A₃/Dapi foi realizada segundo a técnica descrita por Christian *et al.* (1980), com modificações. Os cístrons ribossômicos foram detectados utilizando sondas de DNAr 18S e 5S heterólogas, obtidas de *Moenkausia sanctaefilomenae* e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), realizada por meio da técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986), modificada. A morfologia dos cromossomos foi determinada com base na razão entre os braços, como proposto por Levan *et al.* (1964), sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a). Foram analisadas, em média, 20 metáfases por animal para se determinar o número e a fórmula cariotípica de cada uma das populações.

4.3. Resultados e Discussão

Apesar da grande diversidade cariotípica entre as espécies que compõem o complexo *A. scabripinnis*, com número diplóide variando entre $2n = 46$, $2n = 48$ e $2n = 50$, a maioria das populações estudadas possui $2n=50$ cromossomos. Entretanto, mesmo que estas apresentem o mesmo número de cromossomos, citótipos diferentes são observados com frequência (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MAISTRO *et al.*, 2000; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2004; VICARI *et al.*, 2008). As três populações de *Astyanax* sp. Pertencentes ao grupo *A. paranae*, aqui examinadas, também apresentaram o número diplóide igual a 50 cromossomos, tanto nos machos como nas fêmeas. Não foi evidenciado heteromorfismo cromossômico em relação ao sexo, indicando a ausência de cromossomos sexuais diferenciados. O número fundamental e a fórmula cariotípica correspondente para cada população encontram-se relacionados na tabela 1 e os cariótipos apresentados na figura 2. Embora conservando o mesmo número diplóide, diferenças no tocante à constituição do cariótipo, ou seja, em relação aos cromossomos m, sm, st e a permitem uma diferenciação entre elas.

No gênero *Astyanax* as NORs usualmente são múltiplas, mas com variações numéricas, de localização e de posição. As três populações de *Astyanax* deste estudo seguiram esse mesmo padrão. A detecção dessas regiões pelo nitrato de Prata evidenciou a ocorrência de AgNORs múltiplas, com variações intra- e inter-populacionais. A princípio, estas regiões foram sempre visualizadas em posição telomérica, tanto no braço curto como no braço longo de vários cromossomos (Figura 3a, b e c). Embora não tenha sido possível a identificação precisa de cada cromossomo portador dessas regiões, pôde-se verificar que elas se apresentaram distribuídas entre as diferentes classes de cromossomos do cariótipo, podendo ser bem caracterizado o primeiro par metacêntrico como portador dessas regiões nas populações de *Astyanax*. sp. Q e *Astyanax*. sp. A (Figura 3b e c).

Esta condição de NORs múltiplas foi confirmada pela FISH com sonda de DNAr 18S, onde foram mapeados, em média, 12 sítios nas três populações (Figuras 6 a, b e c). Apesar do número de genes ribossômicos ser praticamente o mesmo,

alguns cromossomos portadores desses sítios parecem diferir entre as populações, o que foi também observado em outras populações de *Astyanax* que fazem parte do complexo *A. scabripinnis* (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2002; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006b; VICARI *et al.* 2008; PERES *et al.* 2008) Em *Astyanax* sp. Q pôde ser identificada a ocorrência de um sítio bitelomérico bem evidente, em um cromossomo acrocêntrico (Figura 6b). A localização de todos os sítios de DNAr 18S também é telomérica, o que coincide com a posição ocupada pelas AgNORs nos cromossomos. Coincidentemente, nas três populações, os sítios CMA₃⁺ foram também múltiplos e teloméricos (Figuras 4a, b e c). Em *Astyanax* sp A pode ser bem caracterizada a ocorrência de sítios fluorescentes no primeiro cromossomo metacêntrico, assim como em ambos os telômeros de um cromossomo submetacêntricos. Marcações biteloméricas aparecem também nas populações de *Astyanax* sp CC e *Astyanax* sp Q, porém em cromossomos acrocêntricos. Esse fato corrobora a natureza GC rica das NORs, se não em todos pelo menos em alguns sítios presentes no cariótipo. Os dados obtidos com DAPI, por outro lado, não forneceram evidências concretas de particularidades específicas nas três populações amostradas (Figura 5a, b e c). De acordo com Amemiya e Gold (1986), cromossomos de peixes e anfíbios são muito semelhantes em sua composição e possuem regiões ricas em pares de bases GC relacionadas com as NORs. Essas regiões podem ser interespaçadoras de heterocromatina associada às NORs ou dos próprios sítios de DNAr. Artoni *et al.* (1999), consideram que a coloração com CMA₃ não deve ser utilizada como um método direto e único de detecção dos genes ribossômicos, pois, ela tem afinidade por heterocromatina constituída de grande quantidade de bases GC, além daquelas diretamente relacionadas com as NORs.

A hibridação *in situ* fluorescente tem se mostrado eficiente na detecção dos sítios ribossômicos, independentemente de sua atividade, sendo por isso frequentemente utilizada na complementação dos dados de AgNORs, a qual destaca apenas as regiões que estiveram ativas em interfases precedentes (HOWELL, 1977). Como conseqüência, o número de sítios ribossômicos detectados por FISH geralmente é maior que os sítios de AgNORs, principalmente nas espécies que apresentam NORs múltiplas. Este fato pode ser explicativo para os resultados

obtidos no presente estudo, onde foi geralmente encontrado um número muito maior de sítios ribossômicos do que de AgNORs. Por sua vez, o tamanho reduzido dos sítios de NORs nas espécies analisadas pode também dificultar a detecção de todas as regiões presentes no genoma, tanto por impregnação pela Prata como por FISH. Assim sendo, é possível que a presença de NORs em apenas um dos homólogos, como é o caso do primeiro par metacêntrico do cariótipo de *Astyanax* sp Q e *Astyanax* sp A, seja conseqüência dessa problemática técnica. Alternativamente, Fernandes e Martins-Santos (2003, *apud* FERNANDES, 2006) sugerem que a presença de apenas um homólogo portador de sítio de NOR possa ser também conseqüência de rearranjos cromossômicos.

Quatro sítios de DNAr 5S foram constatados nas três populações, dois deles localizados intersticialmente em um par metacêntrico e dois na região telomérica de um par acrocêntrico (Figuras 6a, b e c). O número, a localização e a posição dos sítios de DNAr 5S podem ser também variáveis em *Astyanax*, pois já foram observados de dois a oito loci intersticiais ou terminais. Entretanto, a ocorrência de dois pares de cromossomos portadores desses cístrons tem sido predominante, com um cromossomo metacêntrico de tamanho médio constantemente marcado nas cinco populações analisadas por Almeida-Toledo *et al.* (2002), que consideram esse fato como uma característica conservada no gênero. Entretanto, Peres *et al.* (2008) destacam que essa não deve ser considerada uma característica diagnóstico do gênero, pois foi observada também em outros gêneros da mesma família. A ocorrência de um par acrocêntrico com sítio terminal no braço menor também foi destacada para outras espécies do complexo *A. scabripinnis* (FERRO *et al.*, 2001; ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002, MANTOVANI *et al.*, 2005; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2006b; PERES *et al.* 2008; VICARI *et al.*, 2008).

Em *Astyanax* sp. CC e Q foi observada a sintenia de sítios de DNAr 5S e 18 (Figura 5a e b). A co-localização dos sítios ribossômicos 5S e 18S já foi descrita anteriormente em populações de *Astyanax* pertencentes ao complexo *A. scabripinnis*, mas apenas em relação ao cromossomo metacêntrico médio, correspondente ao 2º ou 3º par do complemento (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002; MANTOVANI *et al.*, 2005). Nas populações de *Astyanax* sp CC e *Astyanax* sp Q,

além de sintenia em um cromossomo metacêntrico, foi também visualizada essa situação em um cromossomo acrocêntrico.

As três populações aqui estudadas estão praticamente isoladas geograficamente (Figura 1), pois os córregos dos Caetano e Quilombo (*Astyanax* sp CC e Q), não apresentam comunicação entre si, porém os peixes do açude da Fazenda Lageado (*Astyanax* sp A) podem chegar ao Córrego dos Caetano, uma vez que ele deságua nesse local. A estrutura cariotípica geral de *Astyanax* sp. CC e Q são mais divergentes entre si, provavelmente decorrentes de seu isolamento geográfico, enquanto que a estrutura cariotípica de *Astyanax* sp. A, apresenta uma maior semelhança com a de *Astyanax* sp. Q, apesar do isolamento geográfico entre esses pontos. A formação do açude é recente e seu ambiente difere das características dos córregos, provavelmente esses fatores estariam estimulando uma seleção entre indivíduos que compõem sua população, resultando em características cariotípicas que a diferem quando comparadas com as outras duas populações.

No tocante aos sítios de NORs (AgNORs e DNAr 18S), de DNAr 5S e CMA₃⁺ há mais concordância do que diferenças entre as três populações, visto que, de uma maneira geral, os resultados são concordantes entre elas, embora possam ocorrer alguns cromossomos marcadores específicos para cada população. Destaca-se, entretanto, a aparente ausência de sintenia nos espécimes de *Astyanax* sp. A. Assim sendo, coletivamente, os dados obtidos indicam que as populações analisadas já apresentam certo grau de divergência entre elas, não podendo, portanto, serem consideradas como uma unidade do ponto de vista evolutivo. A investigação de outros marcadores cromossômicos, como diferentes classes de DNAs repetitivos, poderão contribuir para o melhor entendimento deste processo de diferenciação entre as populações, bem como fornecer novos subsídios para uma definição de seu status taxonômico

Agradecimentos: Dr. Francisco Langeani Neto, pela identificação dos exemplares; Dr. Fausto Foresti por me receber em seu laboratório, Ms. Patrícia Elda Sobrinho por ceder as Sondas de DNAr 5S e 18S e Dra. Débora Diniz, pela contribuição; CAPES, CNPq, FAPEMIG, and UFU (Brazil).

4.4. Referencias Bibliográficas

- Abel, L. D. S.; Mantovani, M. & Moreira-Filho, O. (2006) Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*. **29**: 448-452.
- Almeida-Toledo, L. F.; 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). *Cytogenetics and Genome Research*. **97**: 229-233.
- Alves, A. L. & Martins-Santos, I. C. (2002) Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with $2n = 48$ chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* 67: 117-122.
- Amemiya, C. T. & Gold, J. R. (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* **1986**: 226-231.
- Artoni, R. F.; Molina, W. F.; Bertollo, L. A. C. & Galetti-Júnior, P. M. (1999) Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*. **22**: 39-44.
- Bertaco, V. A. & Lucena, C. A. S (2006) Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*. **4**(1): 53-60.
- Bertollo, L. A. C.; Takahashi, C. S.; Moreira-Filho, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetic*. **1**: 103-120.
- Christian, A.; McNiel, E.; Robinson, J.; Drabek, R.; LaRue, S.; Waldren, C. & Bedford, J. (1998) A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetic Cell Genetics*. **82**: 172-179.
- Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica* 124: 301-306.
- Fernandes, C. A. *Estudos citogenéticos em três espécies do gênero Astyanax, com ênfase no DNA ribossomal*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 74f. (2006).
- Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2006a) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **29**: 464-468.

- Fernandes, C. A. & Martins-Santos, I. C. (2006b) Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. *Caryologia*, **59**: 253-259.
- Ferro, D. A. M.; Néo, D. M.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. *Genetica* **110**: 55-62
- Howell, W. M. (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* **44**: 367-370.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014-1015.
- Kavalco K. F. & 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 K. F.; Pazza R.; Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic. Genome Research*. **106**: 107-110
- Kavalco, K. F.; Pazza, R.; Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2007) Satellite DNA sites in four species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, **30**: 529-535.
- Kavalco, K. F.; Pazza, R. & Almeida-Toledo, L. F. (2009) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* **136**: 135–139.
- Levan, A & Fredga, K. (1964) Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosome, *Hereditas* **52**: 201-220.
- Maistro, E. L.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae), *Genetics and Molecular Biology*, **23**: 365-369.
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A. & Moreira-Filho, O. (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae), *Genetics and Molecular Biol*
- Mantovani, M.; Abel, L. D. S.; Mestriner, C. A. & Moreira-Filho, O. (2005) O Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* **123**: 211-216.

- Mestriner, C. A.; Galetti-Júnior, P. M.; Valentini, S. R.; Ruiz, I. R. G.; Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. & Camacho, J. P. M. (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome, *Heredity* **85**: 1-9.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (1991) *Astyanax scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics*. **14**: 331-357.
- Peres, W. A. M.; Bertollo, L. A. C. & Moreira-Filho, O. (2008) Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, **31**: 222-226.
- Pinkel, D.; Straume, T. & Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 2934-2938.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, C. 2003 *Check List of Freshwater of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs.742 p.
- Schweizer, D. (1976) Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324
- Vicari, M. R.; Noletto, R. F.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, **31**: 173-179.

Tabela 4.1: Fórmula cariotípica e número fundamental das 3 populações de *Astyanax* do grupo *A. paranae* analisadas.

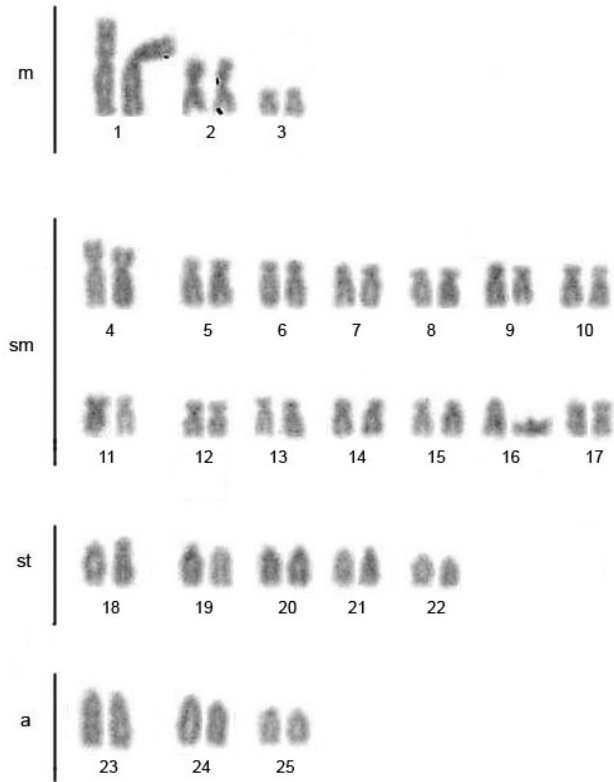
	2n	Fórmula Cariotípica	Número Fundamental
<i>Astyanax</i> sp CC	50	6m + 28sm + 10st + 6a	94
<i>Astyanax</i> sp Q	50	10m + 26sm + 6st + 8a	92
<i>Astyanax</i> sp A	50	6m + 30sm + 6st + 8a	92

Legenda: CC – Córrego dos Caetano, Q – Córrego Quilombo, A – açude da Fazenda Lageado.

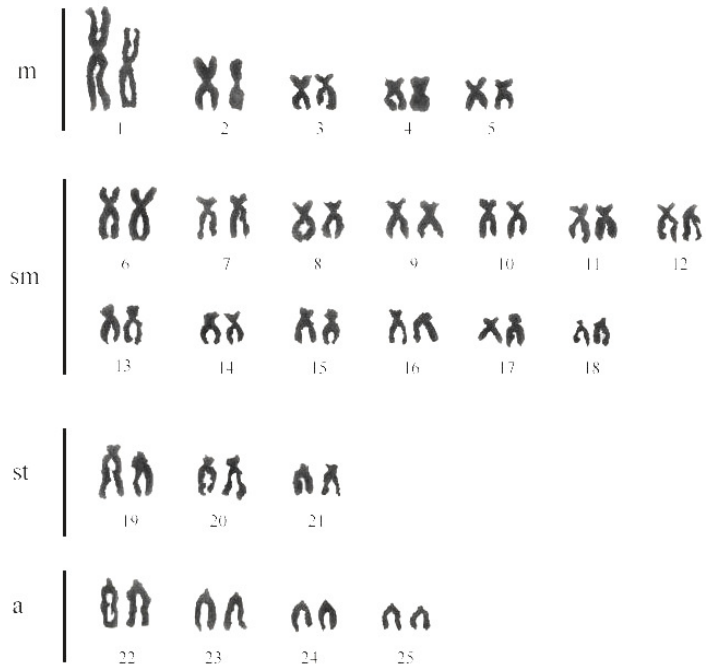


Figura 1: Foto de satélite retirada do software online Google Earth, mostrando a localização dos pontos de coleta em relação ao Rio Araguari.

a.



b.



C.

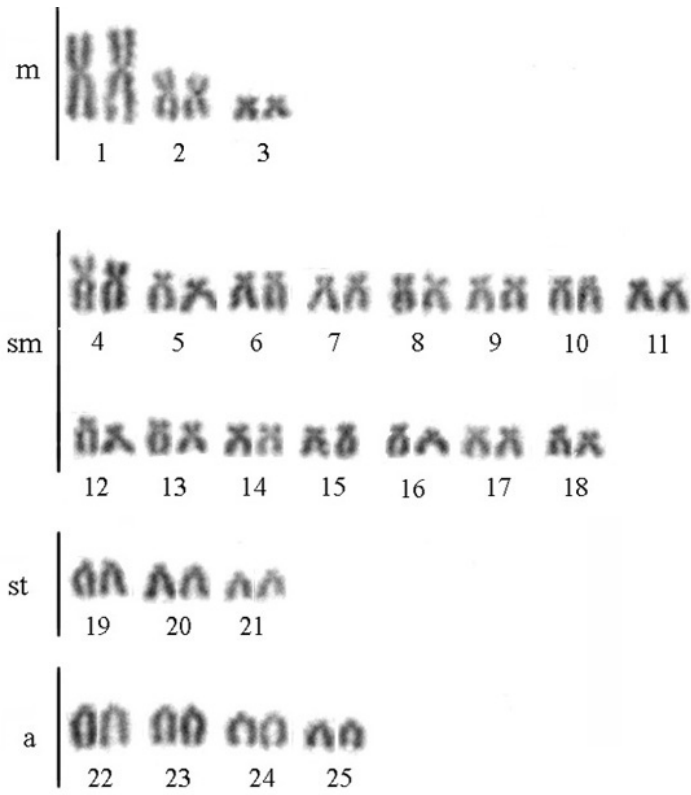


Figura 2: Cariótipos de *Astyanax* sp. CC (a); *Astyanax* sp. Q (b) e *Astyanax* sp. A (c).

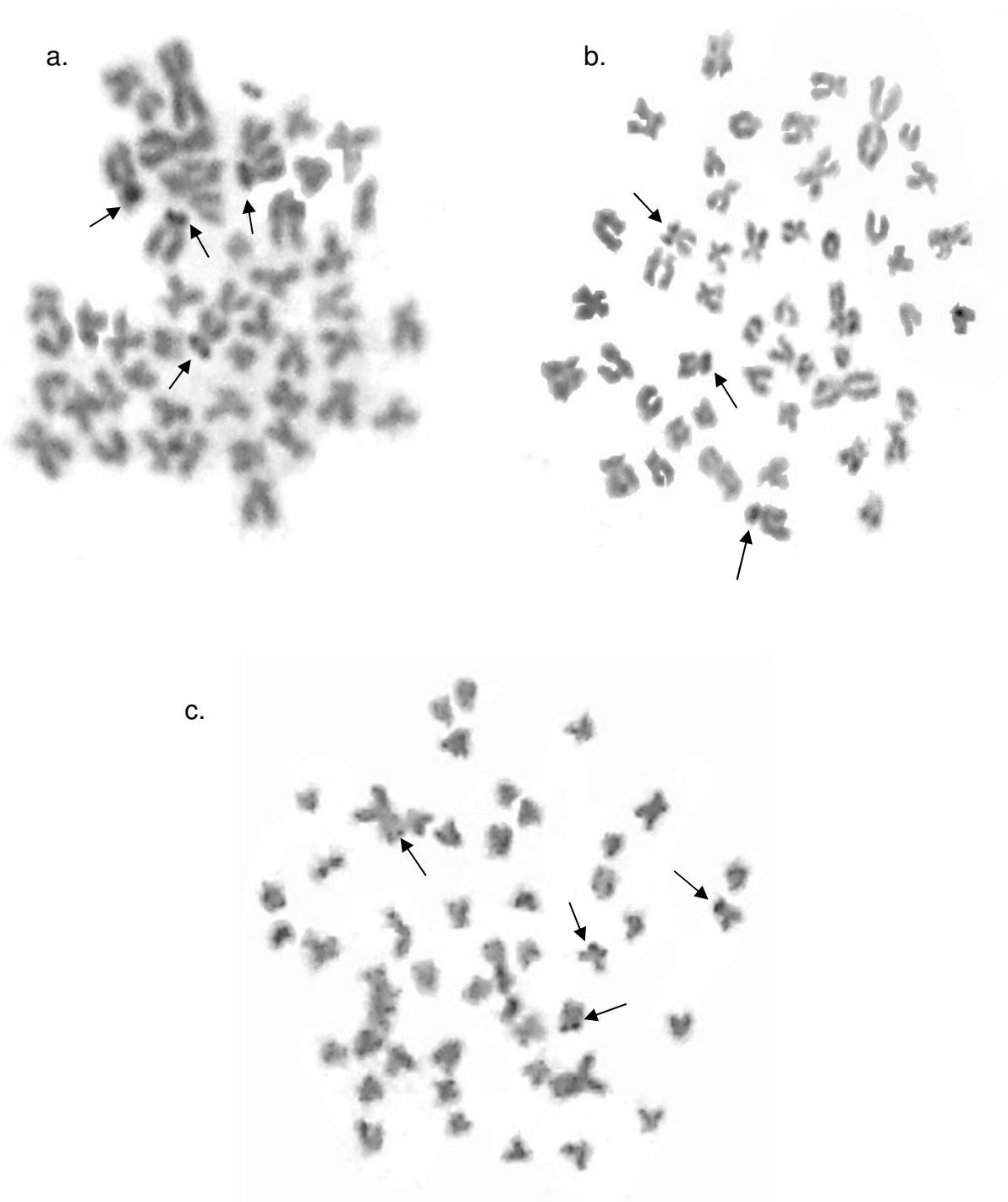


Figura 3: Metáfases de *Astyanax* sp. CC, Q e A evidenciando AgNORs. As setas indicam os sítios mais evidentes de NORs.

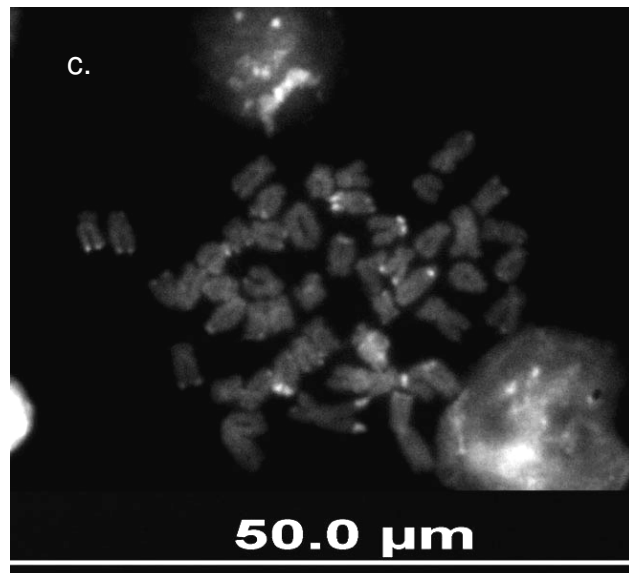
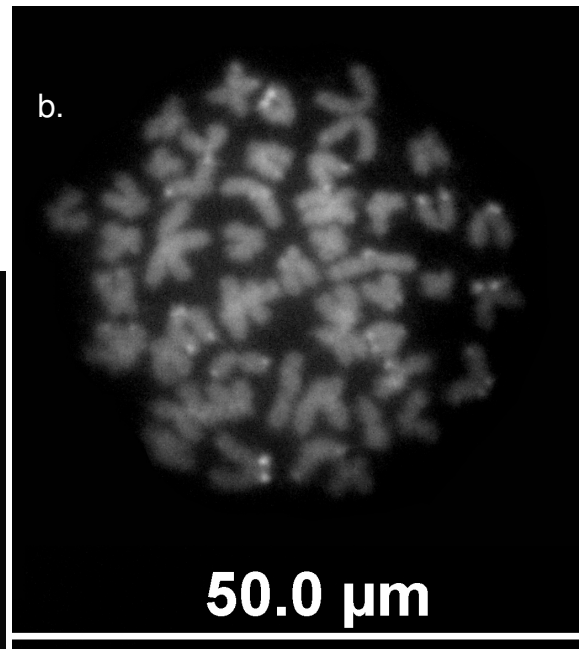
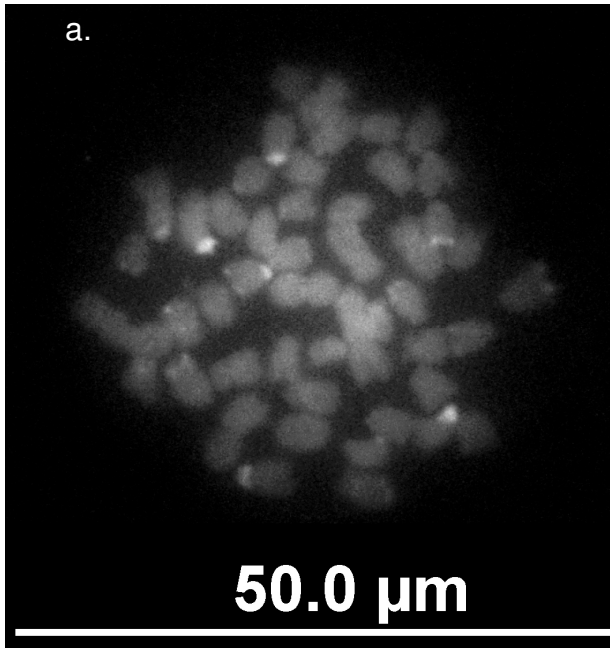


Figura 4: Metáfases de *Astyanax* sp. CC, Q e A evidenciando sítios CMA₃ positivos. As cabeças de seta destacam os cromossomos portadores de sítios CMA₃⁺ biteloméricos.

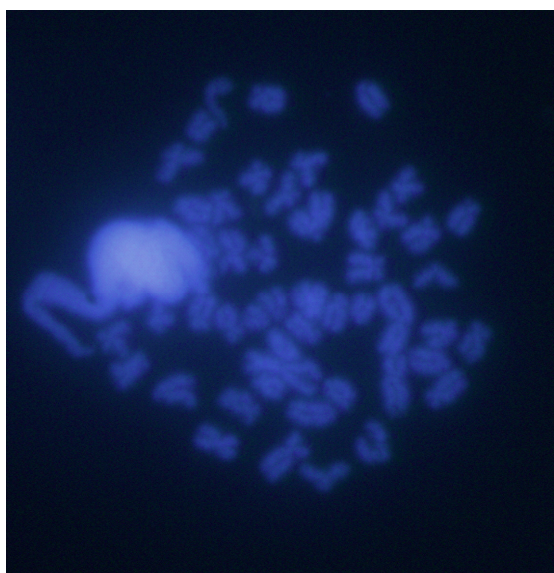
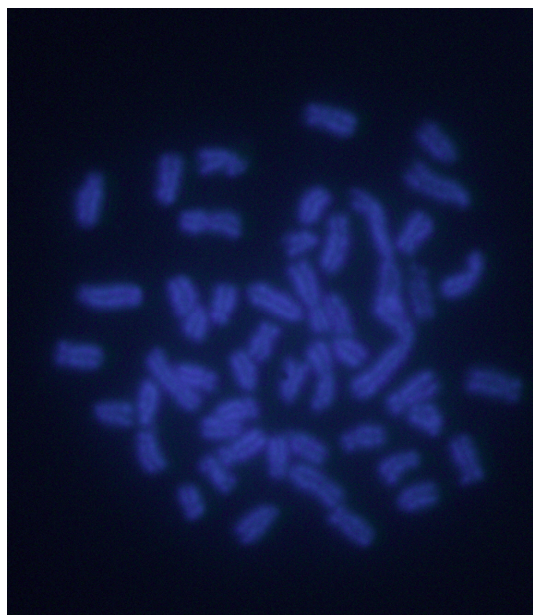
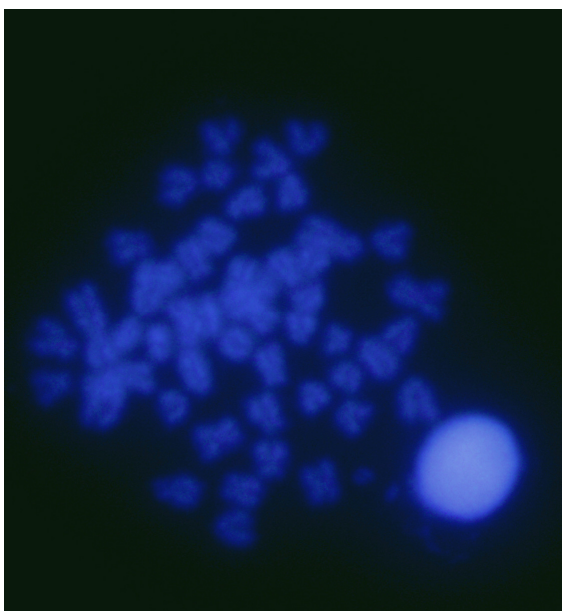


Figura 5: Metáfases de *Astyanax* sp. CC, Q e A submetidas ao tratamento com DAPI.

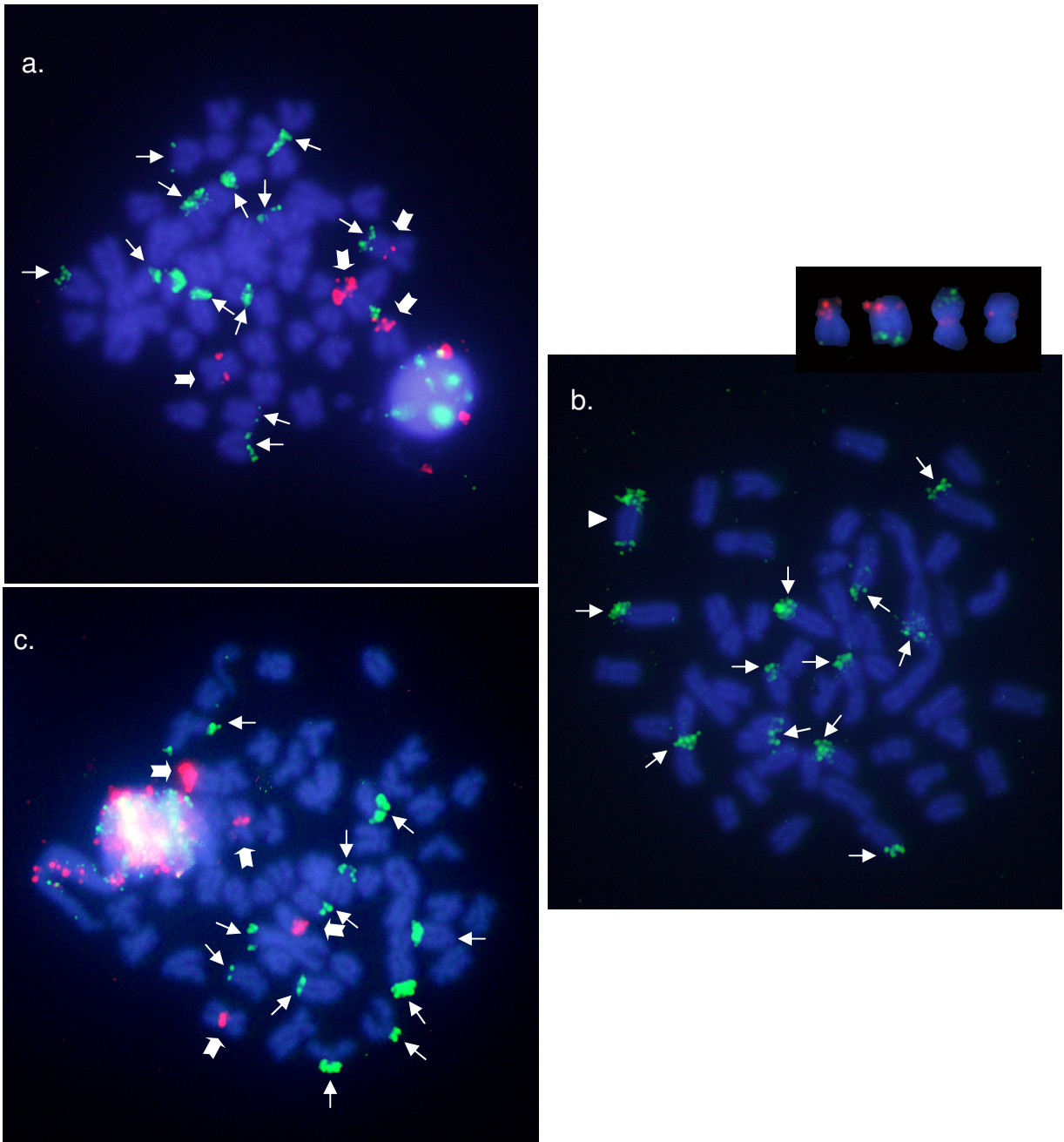


Figura 6: Metáfases de *Astyanax* sp. CC, Q e A evidenciando sítios de DNAr 5S (vermelho – setas largas) e 18S (verdes – setas estreitas). Note a ocorrência de um cromossomo com sítios de DNAr 18S biteloméricos em (b), indicado pela cabeça de seta e de sintenia em cromossomos metacêntricos (a e c) e acrocêntricos (c).

Capítulo 5

Considerações e Conclusões Finais

5. Considerações e Conclusões Finais

Esse estudo consiste na análise citogenética de 4 populações de peixes do gênero *Astyanax* provenientes do Córrego dos Caetano, Córrego Quilombo, e Açude da Fazenda Lageado, contribuintes da bacia do Rio Araguari no município de Uberlândia (MG – Brasil).

Exemplares de *A. bockmanni* coletados no Córrego dos Caetano, foram descritos em um estudo anterior por Torres-Mariano e Morelli (2008) que determinaram o número de cromossomos, Ag-NOR, banda C e encontraram um ou dois cromossomos supranumerários em fêmeas. O presente trabalho complementou esses dados, mapeando fisicamente as NOR e o DNAr 5S; e caracterizando a heterocromatina que forma seus cromossomos supranumerários. Os resultados revelaram seis cromossomos portadores de NOR quando submetidos à AgNOR, CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S. Com a sonda de DNAr 5S foi possível observar 2 pares de cromossomos marcados e o DAPI revelou que a heterocromatina que compõe o cromossomo supranumerário é “rica” em AT.

Dados citogenéticos relativos a essa espécie são escassos com apenas mais duas populações de *A. bockmanni* da bacia do Rio Parapanema descritas citogeneticamente. Elas apresentaram resultados divergentes em relação às NORs e sítios ribossômicos 5S; e ausência de cromossomos supranumerários (KAVALCO *et al.*, 2009).

Com as particularidades inerentes a cada uma dessas populações é possível diferenciá-las e propor que *A. bockmanni* forme um grupo de espécies.

Foram descritas também, 3 populações de *Astyanax* sp gr *A. paranae*, pertencente ao complexo de espécies *A. scabripinnis*, aqui denominadas *Astyanax* sp CC, *Astyanax* sp Q e *Astyanax* sp A, de acordo com o local onde foram coletadas. Com as análises foi possível determinar o número e tipos de cromossomos que formam seu cariótipo, assim como seus números fundamentais. Apesar do número cromossômico ser igual entre elas, seus citótipos são diferentes. Foi possível também caracterizar as NORs, utilizando AgNOR, CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S; e o sítio ribossômico 5S. A comparação entre as três populações revelou que

elas apresentam algumas semelhanças. Em relação às NORs, são múltiplas, com uma média de 12 cromossomos com marcas positivas, tanto com CMA₃, quanto com FISH utilizando sonda de DNAr 18S, assim como a maioria das outras espécies do complexo *A. scabripinnis*. A sonda 5S revelou a presença de 4 cromossomos marcados nas três populações.

Apesar das semelhanças, cada uma dessas populações apresenta características que lhes são peculiares. Foi possível observar, por exemplo, marcas biteloméricas em um cromossomo acrocentrico do complemento nas populações de *Astyanax* sp CC e Q, porém em *Astyanax* sp A essa marca se encontra em um cromossomo submetacentrico. Com a FISH utilizando sonda 18S a marca bitelomérica foi destacada na população de *Astyanax* sp Q. Foram encontradas também marcas sintênicas dos sítios ribossômicos 5S e 18S nas populações de *Astyanax* sp CC e *Astyanax* sp Q, ausente em *Astyanax* sp A.

As diferenças aqui observadas provavelmente são consequência do isolamento geográfico entre essas populações, pois o Córrego dos Caetano e Córrego Quilombo estão completamente isolados entre si. O Açude deságua no Córrego dos Caetano fato este que, teoricamente, permite uma interação entre essas duas populações, porém quando seus dados são comparados, elas apresentam diferenças. Dessa forma, não devem ser consideradas como uma unidade do ponto de vista evolutivo. Para se definir sua taxonomia, são necessários estudos utilizando outros marcadores cromossômicos, tais como diferentes classes de DNAs repetitivos.