

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 19/05/2018.

**ESTUDOS EVOLUTIVOS NO GÊNERO *Astyanax*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE): ANÁLISES  
COMPARATIVAS BASEADAS NOS DIFERENTES  
NÚMEROS DIPLOIDES DESCRITOS PARA O  
GÊNERO**

**DIOVANI PISCOR**

**RIO CLARO – SP  
Maio/2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



DIOVANI PISCOR

ESTUDOS EVOLUTIVOS NO GÊNERO *Astyanax*  
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE): ANÁLISES  
COMPARATIVAS BASEADAS NOS DIFERENTES  
NÚMEROS DIPLOIDES DESCRITOS PARA O  
GÊNERO

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Pasquali Parise-Maltempi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) do Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

RIO CLARO – SP  
Maio/2016

597 Piscor, Diovani  
P676e Estudos evolutivos no gênero Astyanax (Characiformes,  
Characidae) : análises comparativas baseadas nos diferentes  
números diploides descritos para o gênero / Diovani Piscor. -  
Rio Claro, 2016  
163 f. : il., figs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientadora: Patricia Pasquali Parise Maltempi

1. Peixe. 2. Citogenética. 3. DNA repetitivo. 4. Evolução  
cariotípica. 5. Relógio molecular. 6. Citocromo c oxidase 1. I.  
Título.

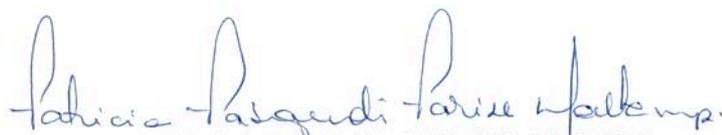
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDOS EVOLUTIVOS NO GÊNERO *Astyanax* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE): ANÁLISES COMPARATIVAS BASEADAS NOS DIFERENTES NÚMEROS DIPLOIDES DESCRITOS PARA O GÊNERO

AUTOR: DIOVANI PISCOR

ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

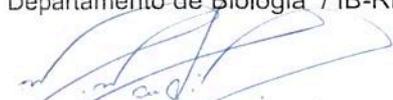
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



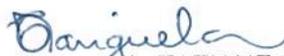
Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI  
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA  
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Prof. Dr. MATEUS MONDIN  
Departamento de Genética / ESALQ/USP



Pós Doutoranda TATIANE CASAGRANDE MARIGUELA  
Departamento de Zoologia / IB-Rio Claro



Prof. Dr. ORLANDO MOREIRA FILHO  
Departamento de Genética e Evolução / UFSCAR

Rio Claro, 19 de maio de 2016

*... dedico esse trabalho aos meus pais  
Valéria e Pedro que me apoiaram sempre  
nos momentos mais difíceis ... e ao meu  
filho Caio, o qual me ensina diariamente a  
arte da sabedoria e da paciência ...*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela estrutura cedida durante os quatro últimos anos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) por toda ajuda quando necessária.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Pasquali Parise Maltempi por acreditar em mim me dando a oportunidade de conquistar mais um passo na minha carreira profissional, pela amizade, pelos conhecimentos adquiridos durante o Mestrado e o Doutorado e pelos ensinamentos que me conduziram para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sanae Kasahara pela amizade, atenção e gentileza que sempre me recebeu, ajudando-me nas diversas dúvidas, pelas dicas valiosas que me ajudaram muito no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Diogo C. Cabral de Mello pelo auxílio em diversos momentos de dúvidas, e pela disposição em ajudar sempre quando necessário.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes pela amizade e pelas conversas e trocas de experiências, as quais ajudaram na minha formação docente.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem S. Fontanetti Christofolletti pela oportunidade de realizar o estágio docência na disciplina de Embriologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes, o qual foi o inicial e grande incentivador para a minha jornada na carreira científica.

A todos os professores do Departamento de Biologia, UNESP Rio Claro – SP, que contribuíram para a minha formação.

A todos meus professores da Unidade Universitária de Mundo UEMS – MS, que contribuíram para a minha formação acadêmica inicial.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Biologia UNESP, Rio Claro – SP que de forma direta auxiliaram nos diversos experimentos no laboratório, em especial aos: Thiago Gazoni, Flávia Marcorin, Keteryne, Rafael Borba, Octavio M. Palacios Gimenez, Diogo Milani, Vanessa B. Bardella, Brenda e André Arnosti.

À Cris, desenhista e secretária, do Departamento de Biologia da UNESP, Rio Claro – SP pela ajuda com a organização das figuras.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1. Considerações filogenéticas e taxonômicas do grupo <i>incertae sedis</i> em Characidae.....	02
1.2. História evolutiva e biogeográfica do gênero <i>Astyanax</i> .....	03
1.3. O primeiro par metacêntrico como marcador cromossômico .....	06
1.4. Considerações sobre as variações do número diploide e alguns exemplos de estudos cromossômicos revelados por técnicas clássicas no gênero <i>Astyanax</i> .....	07
1.5. Cromossomos supranumerários e suas características em <i>Astyanax</i> .....	09
1.6. Localização cromossômica de sequências repetitivas no táxon .....	12
<b>2. HIPÓTESES .....</b>	<b>16</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>5. MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. Estimulação de células mitóticas .....	25
5.2. Obtenção de cromossomos mitóticos .....	25
5.3. Análise morfométrica dos cromossomos .....	26
5.4. Montagem dos cariótipos.....	27
5.5. Montagem de idiogramas e cromossomos específicos.....	27
5.6. Localização da heterocromatina .....	27
5.7. Localização das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata.....	28
5.8. Dupla coloração CMA <sub>3</sub> /DAPI com cromossomos desnaturados .....	28
5.9. Extração de DNA genômico.....	29
5.10. Obtenção de sondas de DNA repetitivos por PCR.....	30
5.11. Marcação das sondas via PCR.....	33
5.12. Marcação das sondas via <i>nick translation</i> .....	34
5.13. Obtenção das sondas de microssatélites.....	34
5.14. Obtenção da sonda de DNA telomérico e FISH específico .....	35

5.15. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) – técnica 1.....	35
5.16. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) – técnica 2 .....	37
5.17. Amplificação do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI).....	38
5.18. Sequenciamento de DNA .....	39
5.19. Relógio molecular utilizando o gene mitocondrial COI .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 52**

6.1. CAPÍTULO I – CHROMOSOMAL MICROSTRUCTURE DIVERSITY IN THREE <i>Astyanax</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) SPECIES: A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CHROMOSOMAL LOCATIONS OF THE 18S AND 5S rDNAs .....	53
--	----

Referências do Capítulo I .....	61
---------------------------------	----

6.2. CAPÍTULO II – CHROMOSOMAL MAPPING OF H3 HISTONE AND 5S rDNA IN EIGHT SPECIES OF <i>Astyanax</i> (PISCES, CHARACIFORMES) WITH DIFFERENT DIPLOID NUMBERS: SYNTENIC OF REPETITIVE GENES .....	66
---	----

Referências do Capítulo II .....	71
----------------------------------	----

6.3. CAPÍTULO III - DISTINCT CLASSICAL AND MOLECULAR CYTOGENETICS BETWEEN <i>Astyanax marionae</i> AND <i>Astyanax fasciatus</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE): A COMPARATIVE ORGANIZATION OF THE HETEROCHROMATIN AND REPETITIVE GENES .....	74
--	----

Referências do Capítulo III .....	83
-----------------------------------	----

6.4. CAPÍTULO IV - HIGHLY SIMILAR MORPHOLOGIES BETWEEN CHROMOSOMES BEARING U2 snRNA GENE CLUSTERS IN THE GROUP <i>Astyanax</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE): AN EVOLUTIONARY APPROACH IN SPECIES WITH 2N = 36, 46, 48, AND 50 .....	91
--	----

Referências do Capítulo IV .....	100
6.5. CAPÍTULO V - MICROSATELLITE ORGANIZATION IN THE B CHROMOSOME AND A CHROMOSOME COMPLEMENT IN <i>Astyanax</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) SPECIES .....	106
Referências do Capítulo V .....	113
6.6. CAPÍTULO VI - EVOLUTIONARY INFERENCES FOR THE ORIGIN OF CHROMOSOMAL CHARACTERISTICS IN THE GENUS <i>Astyanax</i> (CHARACIDAE, <i>INCERTAE SEDIS</i> ): A CYTOGENETIC AND MOLECULAR APPROACH .....	119
Referências do Capítulo VI .....	129
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>138</b>
<b>8. BIOGRAFIA.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>143</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Mapa das localizações hidrográficas Mesoamericanas das sobreposições dos grupos filogenéticos de *Astyanax* (Grupos I, II e III) propostos por Ornelas-Gracia et al. (2008) ..... **05**

### MATERIAIS

**Figura 1.** Mapa das localizações das espécies analisadas no presente trabalho. Observe que os números entre os parênteses são referentes aos números diploides das respectivas espécies; \*Espécies provenientes de lojas de aquário no Brasil e suas respectivas localidades de origem; \*\*Espécie com diferentes números diploides (2n = 46, 48 e 50) ..... **24**

### CAPÍTULO I

**Figure 1.** Giemsa stained chromosomes of *Astyanax*. **(A)** *A. abramis*. **(B)** *A. altiparanae*. **(C)** *A. eigenmanniorum*. Insets show Ag-NOR-bearing chromosomes pairs. Bar = 10 µm. .... **55**

**Figure 2.** Chromosomes showing the distribution of constitutive heterochromatin revealed by the C-banding technique. **(A)** *A. abramis*. **(B)** *A. altiparanae*. **(C)** *A. eigenmanniorum*. Bar = 10 µm..... **55**

**Figure 3.** Sequential CMA<sub>3</sub>/DAPI staining. **(A–B)** *A. abramis*. **(C–D)** *A. altiparanae*. **(E–F)** *A. eigenmanniorum*. DAPI is shown in blue and CMA<sub>3</sub> in green. Bar = 10 µm **56**

**Figure 4.** Chromosomes of *Astyanax* species after fluorescence *in situ* hybridization to detect 18S rDNA and 5S rDNA. **(A–B)** *A. abramis*. **(C–D)** *A. altiparanae*. **(E–F)** *A. eigenmanniorum*. **A, C,** and **E** 18S rDNA probe. **B, D,** and **F** 5S rDNA probe. Bar = 10 µm ..... **57**

**Figure 5.** Chromosome scheme showing the 5S rDNA location in *Astyanax* chromosomes. **(A)** First form. **(B)** Second form. **(C)** Third form. **(D)** Variant forms. **58**

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** Location of 5S rDNA and H3 histone clusters on chromosomes of *Astyanax* species. The arrows indicate the H3 histone clusters, the arrowheads indicate the 5S rDNA clusters and the slim arrowheads indicate chromosomes with 5S-H3 synteny. Note that in *A. mexicanus* single FISH experiments (using 5S rDNA and H3 histone probes) were performed on the same metaphase plate. Bar = 10 µm..... **69**

**Figure 2.** Diagram showing chromosome pairs carrying 5S rDNA and H3 histone clusters in the eight *Astyanax* species studied. (A) *A. abramis*, (B) *A. asuncionensis*, (C) *A. altiparanae*, (D) *A. bockmanni*, (E) *A. eigenmanniorum*, (F) *A. fasciatus*, (G) *A. mexicanus*, and (H) *A. schubarti* ..... **70**

### CAPÍTULO III

**Figure 1.** Cytogenetic data of *A. marionae*. A. Karyotype. B. Metaphase C-banded. C. Chromosomal location of H3 histone and 5S rDNA clusters. Arrowhead indicates the H3 histone cluster and asterisk indicates the 5S rDNA cluster. Bar = 10 µm. .... **87**

**Figure 2.** Chromosomes stained with Giemsa. A. Karyotype of *A. fasciatus* from the Cabeça river tributary (2n = 50). B. Karyotype of *A. fasciatus* from the Ribeirão Claro river tributary (2n = 48). C. Karyotype of *A. fasciatus* from the Corumbataí river tributary (2n = 50). Bar = 10 µm. .... **88**

**Figure 3.** C-banding, H3 histone and 5S rRNA gene clusters location in karyomorphs of *A. fasciatus*. A. Metaphase C-banded of *A. fasciatus* from the Cabeça river tributary (2n = 50). B. Metaphase C-banded of *A. fasciatus* from the Ribeirão Claro river tributary (2n = 48). C. Metaphase C-banded of *A. fasciatus* from the Corumbataí river tributary (2n = 50). D. H3 histone and 5S rDNA clusters of *A. fasciatus* from the Corumbataí river tributary. E. H3 histone and 5S rDNA clusters of *A. fasciatus* from the Ribeirão Claro river tributary. F. H3 histone and 5S rDNA clusters of *A. fasciatus* from the Cabeça river tributary. The arrow indicates the metacentric chromosome with syntenic clusters (H3-5S), the arrowhead indicates the H3 histone cluster, and asterisk indicates the 5S rDNA cluster. Bar = 10 µm. .... **89**

**Figure 4.** Map of the hydrographic basins and repetitive location on the chromosomes of *A. marionae* and *A. fasciatus* ..... **90**

### CAPÍTULO IV

**Figure 1.** Locations of U2 snDNA and 5S rDNA clusters on chromosomes of *Astyanax* species with 2n = 50 chromosomes. (A) *A. abramis*, (B) *A. asuncionensis*, (C) *A. altiparanae*, (D) *A. bockmanni*, (E) *A. eigenmanniorum*, and (F) *A. mexicanus*. Karyotypes indicate the chromosome pairs with U2 snDNA clusters, and boxes indicate pairs with 5S rDNA clusters. Bar = 10 µm ..... **104**

**Figure 2.** Locations of U2 snDNA and 5S rDNA clusters on chromosomes of *A. marionae* (2n = 48), *A. schubarti* (2n = 36), and two *A. fasciatus* populations (karyomorph I, 2n = 50 and karyomorph II, 2n = 46). (A) *A. aff. fasciatus* (karyomorph I), (B) *A. marionae*, (C) *A. fasciatus* (karyomorph II), and (D) *A. schubarti*. Karyotypes indicate the chromosome pairs with U2 snDNA clusters, and boxes indicate pairs with 5S rDNA clusters. Bar = 10 µm ..... **105**

**Figure 3.** Diagram indicating the chromosome pairs bearing U2 snDNA clusters in the nine *Astyanax* species. (A) Species with very similar chromosome pairs (pericentromeric regions), (B) *A. mexicanus*, with only one chromosome pair carrying U2 snDNA (pericentromeric region), and (C) *A. schubarti*, with two chromosome pairs carrying U2 snDNA (pair 7, interstitial location, and pair 14, pericentromeric location). U2 snDNA clusters are shown in red ..... **105**

## CAPÍTULO V

**Figure 1.** C-banded metaphases of: **(A)** *A. altiparanae*, **(B)** *A. marionae*, **(C)** *A. fasciatus*, and **(D)** *A. schubarti*. Bar = 10 µm..... 109

**Figure 2.** Microsatellite distribution on chromosomes of *Astyanax* species. Bar = 10 µm. .... 110

**Figure 3.** Chromosomal location of 5S rDNA and GATA repeats in *Astyanax* species. Arrows indicate fluorescent signals. Bar = 10 µm..... 111

**Figure 4.** Fiber-FISH examination of *Astyanax* chromosomes. The 5S rDNA and (GATA)<sub>8</sub> probes are co-located ..... 112

**Figure 5.** Microsatellite distribution and constitutive heterochromatin revealed by the C-band technique in *A. mexicanus*. Arrows indicate the B chromosome, and boxes indicate fluorescent signals on the B chromosome. Bar = 10 µm ..... 112

## CAPÍTULO VI

**Figure 1.** Karyotypes: **(A)** *A. altiparanae*; **(B)** *A. marionae*; **(C)** *A. fasciatus*; **(D)** *A. schubarti*. The chromosomes Ag-NORs are indicate in the boxes..... 133

**Figure 2.** Chromosomes C-banded: **(A)** *A. altiparanae*; **(B)** *A. marionae*; **(C)** *A. fasciatus*; **(D)** *A. schubarti*..... 133

**Figure 3.** Chromosomes with CG-rich regions and fluorescent signals of repetitive sequences. **(A)** *A. altiparanae*; **(B)** *A. marionae*; **(C)** *A. fasciatus*; **(D)** *A. schubarti*. .. 134

**Figure 4.** DAPI and fluorescent signals of repetitive sequences in *S. notomelas*. The arrows indicate the repetitive clusters. .... 135

**Figure 5.** Cladogram adapted from Coutinho-Sanches and Dergam (2015). Note that three well-structured groups are formed. Red numbers indicate the separation in Millions of year ago (MYA) and the asterisks indicate the South American groups ..... 135

**Figure 6.** Schematic cladogram mounted from the molecular data of Coutinho-Sanches and Dergam (2015). Note that cytogenetic data were plotted in scheme..... 136

**Figure 7.** Molecular clock using COI gene. Note that the larger numbers represent the time in Millions of years..... 137

## LISTA DE TABELAS

### MATERIAIS

**Tabela 1.** Relação das espécies coletadas, número de indivíduos e procedências. ... **23**

### CAPÍTULO I

**Table 1.** Literature review of the number of chromosomes bearing ribosomal DNA (rDNA) in *Astyanax* species. .... **59**

### CAPÍTULO III

**Table 1.** Cytogenetic data of the different populations of *A. fasciatus* from tributaries of Corumbataí river basin (São Paulo state, Brazil), and *A. marionae* from Chapada dos Guimarães (Mato Grosso state, Brazil) studied in the present paper..... **86**

### CAPÍTULO IV

**Table 1.** Chromosomal data in species of *Astyanax* with U2 snDNA clusters..... **103**

### CAPÍTULO V

**Table 1.** Microsatellite organization on the chromosomes of the A complement in *Astyanax* species..... **108**

## RESUMO

O gênero *Astyanax* atualmente é visto como um grupo com incertezas filogenéticas, configurando-se até o presente momento como polifilético dentro da família Characidae. Atualmente, são descritas aproximadamente 150 espécies no gênero, e este se distribui sobre a região Neotropical com ocorrências desde o sul dos Estados Unidos até a região da Patagônica na Argentina. Dentro da região de ocorrência o gênero apresenta espécies com  $2n = 36$  cromossomos apenas para *Astyanax schubarti* e *Astyanax correntinus*,  $2n = 46$  para, por exemplo, *Astyanax fasciatus*,  $2n = 48$  para *Astyanax marionae*,  $2n = 50$  para *Astyanax altiparanae*, e  $2n = 52$  para *Astyanax* sp. Visto que o grupo apresenta variações significantes no número diploide, este trabalho teve como principal objetivo estudar o mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos numa abordagem evolutiva. Nove espécies de *Astyanax* foram analisadas: *A. altiparanae* e *A. schubarti* provenientes da bacia do rio Piracicaba (SP), *A. abramis*, *A. asuncionensis* e *A. marionae* provenientes da bacia do rio Paraguai (MT), *A. bockmanni* proveniente da bacia do rio Iguatemi (MS), *A. eigenmanniorum* e *A. mexicanus* provenientes de loja de aquário, e diferentes populações de *A. fasciatus* provenientes da bacia do rio Corumbataí (SP). Para tanto, foram mapeados os genes de RNAr (18S e 5S), histona H3, RNAsn U2, microssatélites e DNA telomérico. Ainda, foram realizados estudos envolvendo técnicas clássicas de citogenética (Ag-NOR, banda-C e coloração com CMA<sub>3</sub>/DAPI) e estudos do relógio molecular utilizando o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). São discutidos, ainda, parâmetros da evolução cromossômica e hipóteses sobre eventos particulares (cromossômicos e evolutivos) no grupo *Astyanax*.

**Palavras-chave:** DNA repetitivo, evolução cariotípica, FISH, relógio molecular, citocromo c oxidase I.

## ABSTRACT

The genus *Astyanax* is currently seen as a group with phylogenetic confusion, setting up to date as polyphyletic within the family Characidae. Currently, there are about 150 described species in the genus, and this is distributed on the Neotropical region from the southern United States to the region of Patagonia in Argentina. Within the region of occurrence of the genus shows species with  $2n = 36$  chromosomes only *Astyanax schubarti* and *Astyanax correntinus*,  $2n = 46$ , for example, to *Astyanax fasciatus*,  $2n = 48$  to *Astyanax marionae*,  $2n = 50$  to *Astyanax altiparanae*, and  $2n = 52$  to *Astyanax* sp. Since the group presents significant variations in the diploid number, this work focused primarily on the study of chromosomal mapping of repetitive DNAs with an evolutionary approach. Nine species of *Astyanax* were examined: *A. altiparanae* and *A. schubarti* from the Piracicaba River basin (SP), *A. abramis*, *A. asuncionensis* and *A. marionae* from the Paraguay River basin (MT), *A. bockmanni* from the Iguatemi River basin (MS), *A. eigenmanniorum* and *A. mexicanus* from the aquarium store, and *A. fasciatus* from the Corumbataí River basin (SP). Therefore, the genes mapped were rRNA (18S and 5S), histone H3, U2 snRNA, microsatellites and telomeric DNA. Further, studies were conducted involving classical cytogenetic techniques (Ag-NOR, C-band and staining with CMA<sub>3</sub>/DAPI) and the molecular clock using the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI). Are also discussed, parameters of chromosomal evolution and hypothesis about particular events (chromosomal and evolutionary) in the group *Astyanax*.

**Keywords:** repetitive DNA, karyotype evolution, FISH, molecular clock, cytochrome c oxidase I.

# ***JNTRDUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações filogenéticas e taxonômicas do grupo *incertae sedis* em Characidae

Dentro da ordem Characiformes a família Characidae é o grupo com maior número de espécies. De acordo com Eschmeyer e Fong (2016) são 12 subfamílias e mais três clados (*Astyanax*, *Jupiaba* e *Nematobrycon*) e 1350 espécies, sendo destas 1103 consideradas válidas. Seus representantes estão presentes em diversos ambientes de água doce e distribuem-se no continente Americano desde o Texas e o Novo México nos Estados Unidos até o norte da Patagônia na Argentina (PAGE, BURR, 1991; ALMIRÓN et al., 1997).

A família Characidae apresenta peixes de pequeno e médio portes, como por exemplo exemplares do gênero *Astyanax*. Ao longo dos anos, muitos integrantes dessa família sofreram modificações na sua classificação. Sabe-se que as relações filogenéticas entre vários membros do grupo são incertas, no aspecto de representarem um grupo polifilético, o que é muito discutido até o presente momento.

A subfamília Tetragonopterinae, antes considerada como a subfamília com o maior número de espécies em Characidae (GÉRY, 1977), foi considerada como um grupo polifilético por Lima et al. (2003). A partir de então, somente o gênero *Tetragonopterus* foi mantido na subfamília e todos os demais gêneros de Tetragonopterinae foram alocados em *incertae sedis* dentro de Characidae (LIMA et al., 2003).

Entre os gêneros alocados em *incertae sedis* estão alguns dos grupos com maior número de espécies e taxonomicamente confusos de Characidae, como *Hyphessobrycon* (aproximadamente 170 espécies), *Astyanax* (aproximadamente 150 espécies), *Moenkhausia* (aproximadamente 90 espécies), *Bryconamericus* (aproximadamente 75 espécies), *Hemigrammus* (aproximadamente 70 espécies), entre outros (ESCHMEYER et al., 2016). Por outro lado, estudos recentes propõem hipóteses que levam à incerteza da manutenção de alguns gêneros em *incertae sedis*, como é o caso do gênero *Bryconamericus*, que foi alocado

em *incertae sedis* por Lima et al. (2003), mas que em estudos envolvendo dados moleculares, foi considerado polifilético, porém pertencente à subfamília Stevardiinae em Characidae (OLIVEIRA et al., 2011; THOMAZ et al., 2015).

Por outro lado, estudos com análises de sequências de DNA reforçam a ideia de que *Astyanax* não é um grupo natural dentro de Characidae (OLIVEIRA et al., 2011). Outros estudos, com base em análise de caracteres morfológicos, também têm apontado para o fato de que *Astyanax* seja um grupo polifilético em Characidae (MIRANDE, 2009; 2010; JAVONILLO et al., 2010).

## 1.2. História evolutiva e biogeográfica do gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é um bom modelo para investigar a importância relativa de padrões biogeográficos de vicariância e dispersão (ORNELAS-GARCÍA et al., 2008). Isto pode ser facilmente entendido, pois o gênero é amplamente distribuído na região Neotropical (MARINHO, LIMA, 2009), apresentando alta plasticidade fenotípica e capacidade de adaptação a diversos habitats (LOZANO-VILANO, CONTRERAS-BALDERAS, 1990; JEFFERY, 2001; DOWLING et al., 2002; STRECKER et al., 2003 *apud* ORNELAS-GARCÍA et al., 2008).

A região Neotropical, que compreende desde o México até o sul da América do Sul, é uma região com grande potencial e constantes avanços em estudos envolvendo a biogeografia histórica, visto que esta se configura como um território com grande biodiversidade (GOLDANI, 2012).

Dentro da região Neotropical, a Mesoamérica é uma das mais complexas áreas biogeográficas no mundo (CONTRERAS-BALDERAS, LOZANO-VILANO, 1996; MORRONE, 2002; ZALDIVAR-RIVERON et al., 2004; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2006; HUIDOBRO et al., 2006 *apud* ORNELAS-GARCÍA et al., 2008). Colonizações mais recentes da Mesoamérica por peixes primários de água doce (peixes que não toleram a salinidade da

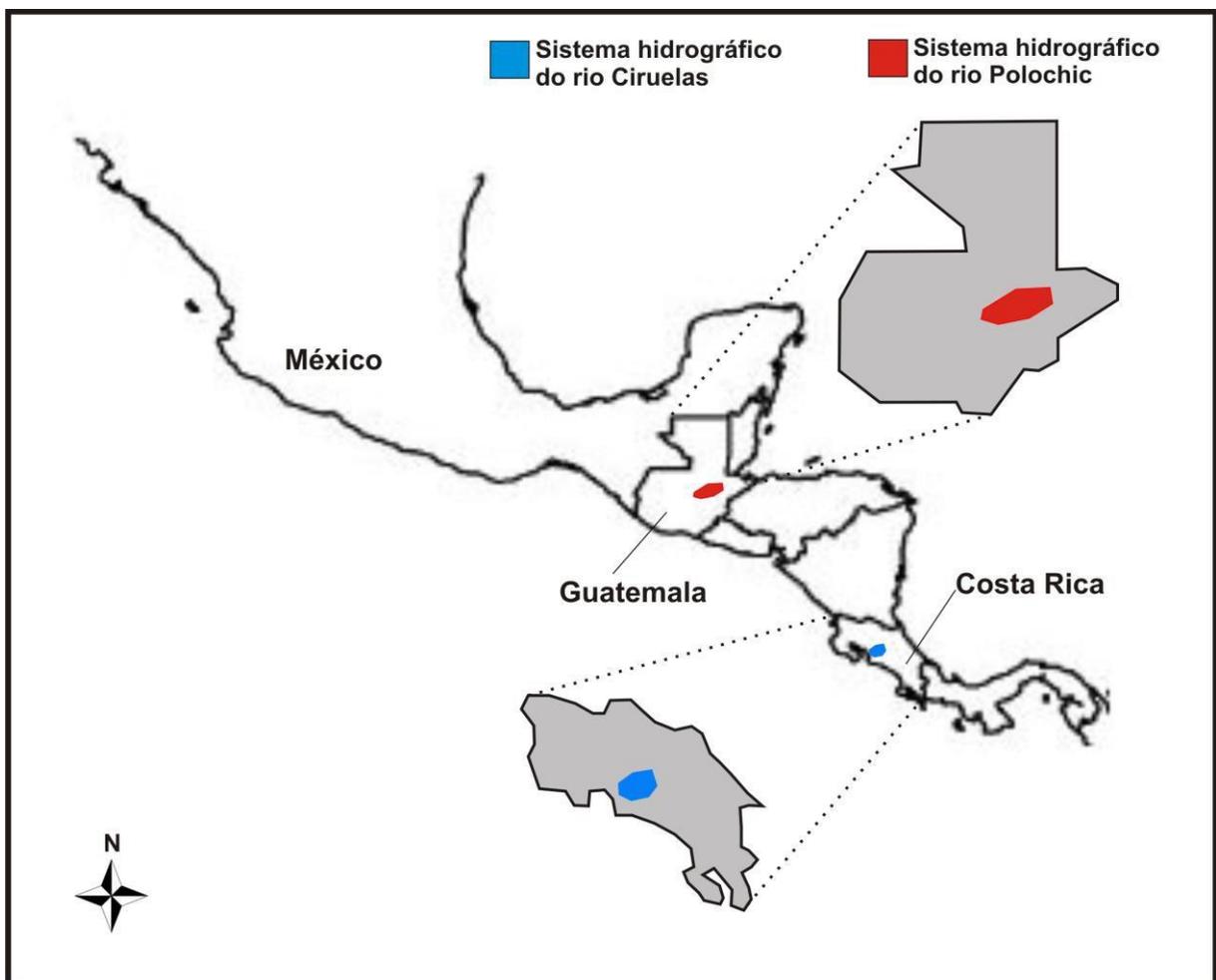
água marinha) através do Estreito do Panamá foram evidenciadas por estudos filogeográficos de caracídeos (por exemplo, *Brycon*, *Bryconamericus*, *Eretmobrycon* e *Cyphocharax*). Esses estudos indicam várias ondas de expansão rápida da América do Sul durante o Plioceno (aproximadamente 3,3 milhões de anos atrás – Ma) (REEVES, BERMINGHAM, 2006 *apud* ORNELAS-GARCÍA et al., 2008).

O encerramento do Estreito do Panamá, no Plioceno (~3,3 Ma), têm sido postulado como uma das causas mais importantes do intercâmbio da fauna entre as regiões Neártica e Neotropical (BUSSING, 1985 *apud* ORNELAS-GARCÍA et al., 2008). As mudanças climáticas também são colocadas em pauta para a explicação da distribuição da fauna de peixes da Mesoamérica (REEVES, BERMINGHAM, 2006 *apud* ORNELAS-GARCÍA et al., 2008). Segundo Reeves e Bermingham (2006) e Strecker et al. (2004) *apud* Ornelas-García et al. (2008), o fechamento do Estreito do Panamá, aproximadamente 3,3 Ma, forneceu a primeira oportunidade para colonização da América Central por peixes da América do Sul.

De acordo com Strecker et al. (2004) a ictiofauna primária de água doce da América Central é pobre, provavelmente, por causa da origem geológica tardia da maioria das partes desta região geográfica e sua longa separação da América do Sul. Segundo os autores, os únicos grupos de peixes neotropicais a chegarem à América do Norte são representados por espécies do gênero *Rhamdia* e espécies do “complexo *Astyanax fasciatus*”.

Um padrão filogeográfico de estruturação norte-sul da região da Mesoamérica foi proposto por Ornelas-García et al. (2008). Segundo os autores, os grupos filogenéticos de *Astyanax* (Mesoamérica), geralmente, não são sobrepostos, com exceção dos grupos I (México e América Central superior) e II (centro da América Central), que se sobrepõem na parte superior da bacia do Polochic da Guatemala, e grupos II e III (baixa América Central – inclui populações de *A. fasciatus* das bacias Ciruelas e Chires sobre a inclinação do Pacífico da Costa Rica), que se sobrepõem na bacia do Ciruelas da Costa Rica (ver mapa da Figura 1). Entretanto, Ornelas-García et al. (2008) concordam com a hipótese amplamente aceita de uma origem sul-americana para as espécies de *Astyanax* e outros caracídeos da América Central (GAYET et al., 2001; CALCAGNOTTO et al., 2005; REEVES, BERMINGHAM, 2006).

Poucos estudos neste sentido são explorados para o gênero *Astyanax*, porém sabe-se que eventos geológicos e climáticos contribuíram muito para a colonização de espécies deste gênero da América do Sul para a América Central. Em suma, é aceitável que, como dito anteriormente por alguns autores, o gênero *Astyanax*, assim como outros membros de Characidae, tiveram sua origem na América do Sul, porém não é muito discutido na literatura a biogeografia e a história evolutiva de *Astyanax* na América do Sul.



**Figura 1.** Mapa das localizações hidrográficas Mesoamericanas das sobreposições dos grupos filogenéticos de *Astyanax* (Grupos I, II e III) propostos por Ornelas-Gracia et al. (2008).

### 1.3. O primeiro par metacêntrico como marcador cromossômico

Uma característica marcante compartilhada por muitas espécies de Characidae é o primeiro par cromossômico metacêntrico maior do que os demais cromossomos do complemento A (SCHEEL, 1973). A partir desse trabalho, a constatação foi corroborada por diferentes autores, tais como Salvador e Moreira-Filho (1992), Maistro et al. (1992), Margarido e Galetti (1996), Vicente et al. (1996), sendo este conhecimento, hoje, amplamente difundido e observado em Characidae.

Dentro de *incertae sedis* o primeiro par grande é compartilhado também entre a maioria das espécies, com algumas exceções. Por exemplo, em *Hyphessobrycon* as espécies com  $2n = 50$  cromossomos possuem o primeiro par metacêntrico grande, como observado para as espécies *Hyphessobrycon anisitsi*, *Hyphessobrycon leutkenii* e *Hyphessobrycon reticulatus* (MENDES et al., 2011; CARVALHO et al., 2002). Porém, a espécie *Hyphessobrycon eques* com  $2n = 52$  cromossomos, por mais que apresente o par metacêntrico maior que os demais cromossomos, este par não é tão notável como o par marcador de *H. anisitsi*, *H. leutkenii* e *H. reticulatus*, pelo menos considerando o tamanho do primeiro par em relação aos demais cromossomos.

Nos gêneros *Moenkhausia* e *Hemigrammus* (também *incertae sedis*) a característica marcante do primeiro par metacêntrico relativamente maior que os demais cromossomos também é aplicada aos cromossomos das poucas espécies analisadas citogeneticamente descritas na literatura, tais como *Moenkhausia sanctaefilomenae* (PORTELA-CASTRO et al., 2001), *Moenkhausia oligolepis* (SANTOS, 2010), e *Hemigrammus marginatus* (GUIDINI, 2007).

Outro gênero de *incertae sedis* que apresenta algumas peculiaridades no que diz respeito ao par marcador metacêntrico de Characidae, é *Astyanax*. Neste gênero o número diploide varia de  $2n = 36$  a  $2n = 52$  cromossomos, sendo o mais frequente o número diploide  $2n = 50$  cromossomos. Nas espécies deste gênero o par marcador de Characidae é compartilhado por todas as espécies analisadas do ponto de vista citogenético, independente

da variação numérica cromossômica, ressaltando que em *Astyanax schubarti* e *Astyanax correntinus* (únicas espécies de *Astyanax* com número diploide  $2n = 36$ ), o par marcador de Characidae é o segundo par metacêntrico grande do cariótipo, considerando que *A. schubarti* possui um primeiro par metacêntrico ainda maior do que o primeiro par marcador de Characidae (DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2001) e *A. correntinus* possui um par submetacêntrico maior do que todos os demais cromossomos (PAIZ et al., 2015).

Os cromossomos de *A. schubarti* e *A. altiparanae* foram analisados por Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2005) após a incorporação do análogo de base 5-Bromodeoxiuridina (5-BrdU) que constataram que alguns cromossomos apresentavam homeologias. Um exemplo é o cromossomo 1 de *A. schubarti* que corresponde aos cromossomos 3 e 14 de *A. altiparanae* (o cromossomo 14 de *A. altiparanae* corresponde ao braço curto do cromossomo 1 de *A. schubarti*, e o cromossomo 3 de *A. altiparanae* corresponde ao braço longo do cromossomo 1 de *A. schubarti*). Outro exemplo é o cromossomo 2 de *A. schubarti* que corresponde, inteiramente, ao cromossomo 1 de *A. altiparanae*.

Esta característica cromossômica (primeiro par cromossômico metacêntrico grande) tão pouco explorada em *Astyanax* desde os primeiros estudos citogenéticos entre as décadas de 1970 e 1980, reforça a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a evolução dos cromossomos no grupo.

#### **1.4. Considerações sobre as variações do número diploide e alguns exemplos de estudos cromossômicos revelados por técnicas clássicas no gênero *Astyanax***

Estudos citogenéticos sobre o gênero *Astyanax* têm mostrado considerável variação do número diploide, desde  $2n = 36$  cromossomos, por exemplo, para *A. schubarti* (Morelli et al., 1983),  $2n = 46$  para *Astyanax fasciatus* (FERREIRA-NETO et al., 2012),  $2n = 48$  para *Astyanax scabripinnis* (FERNANDES, MARTINS-SANTOS, 2003),  $2n = 50$  para a maioria das espécies, como para *A. altiparanae* e *Astyanax bockmanni* (FERNANDES, MARTINS-

SANTOS, 2004; KAVALCO et al., 2009), e recentemente foi descrito um cariótipo com  $2n = 52$  no gênero para *Astyanax* sp. (TENÓRIO et al., 2013).

Além da variação do número diploide, várias fórmulas cariotípicas são descritas para as diferentes espécies e populações de uma mesma espécie do gênero. Como exemplo tem-se o estudo de Medrado et al. (2008), no qual três populações de *A. fasciatus* pertencentes a diferentes bacias hidrográficas no estado da Bahia apresentaram número diploide de  $2n = 48$  cromossomos e três fórmulas cariotípicas diferentes, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies.

Complexos de espécies são comuns em *Astyanax*, por exemplo o “complexo *Astyanax scabripinnis*” sugerido por Moreira-Filho e Bertollo (1991) no qual o número diploide varia em  $2n=46$ ,  $2n=48$  e  $2n=50$  cromossomos, e o “complexo *Astyanax fasciatus*” onde número pode variar desde  $2n=45$  a  $2n=50$  cromossomos (CENTOFANTE et al., 2003), podendo estes apresentarem ou não cromossomos supranumerários (NÉO et al., 2000a,b ; FERREIRA-NETO et al., 2012).

A distribuição da macroestrutura da heterocromatina é bem estudada no gênero *Astyanax*. Por exemplo, Fernandes e Martins-Santos (2003) analisaram duas populações de *A. scabripinnis* da bacia do rio Ivaí (estado do Paraná, Brasil) e observaram um padrão similar de distribuição da heterocromatina constitutiva entre as duas populações, porém foi notada uma variação inter e intraindividual de blocos heterocromáticos. Segundo os autores, blocos grandes e fortemente corados foram observados nas regiões teloméricas em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Mantovani et al. (2000) também relataram um similar polimorfismo interindividual em populações de *A. scabripinnis* provenientes dos córregos Centenário e Marrecas (bacia do rio Paranapanema). Outras populações também apresentaram variação inter e intraindividual de blocos de heterocromatina assim como diferentes números de cromossomos Ag-positivos (por exemplo, MANTOVANI et al., 2004; FERNANDES, MARTINS-SANTOS, 2006; MEDRADO et al., 2008)

As regiões organizadoras de nucléolo (RONS) são estudadas amplamente no gênero, apresentando variações de números e posições. Medrado et al. (2008), por exemplo,

relataram para três populações de *A. fasciatus*, pertencentes a rios de bacias da região nordeste do Brasil, três padrões de marcações Ag-RONs. Os autores descrevem que a população do rio Contas apresentou marcação na posição terminal do braço longo de um par subtelocêntrico e outro submetacêntrico, além de uma marcação na posição terminal do braço curto de um par metacêntrico. No entanto, as outras duas populações do rio Preto da Costa e córrego Mineiro apresentaram um par subtelocêntrico impregnado pelo íon prata, sendo que o mesmo parece ser o par Ag-RON principal (MEDRADO et al., 2008). Outros autores, relataram variações em número inter e intraindividual de cromossomos Ag-RONs marcados nas posições teloméricas para *A. paranae* e *A. scabripinnis* (VICARI et al., 2008a).

Regiões ricas em bases GC, as quais geralmente estão localizadas em segmentos heterocromáticos e/ou marcam regiões Ag-RONs, também são estudadas para espécies de *Astyanax* através da coloração por cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). De acordo com Fernandes e Martins-Santos (2004), duas populações de *A. altiparanae* (uma dos rio Paraná e outra do rio dos Índios) apresentaram dois padrões de localização de regiões GC-ricas: a população do rio dos Índios mostraram que a maioria dos cromossomos das Ag-RONs eram ricos em bases GC (dos 10 cromossomos com marcações Ag-RONs, sete cromossomos mostraram marcações GC-ricas), enquanto que a população do rio Paraná mostrou que além dos cromossomos Ag-RONs, outros cromossomos apresentaram regiões ricas em bases GC (o braço curto do par 20, o qual é Ag-RON e heterocromático, e mais três cromossomos que não são Ag-RONs e nem heterocromáticos). Esses são alguns exemplos de variações de localização e posição da macroestrutura da heterocromatina, das RONS e de sítios CMA<sub>3</sub>, porém, vários outros trabalhos demonstram que condições cromossômicas polimórficas são comuns para as espécies de *Astyanax*.

### **1.5. Cromossomos supranumerários e suas características em *Astyanax***

Cromossomos atípicos que não fazem parte do complemento A são denominados cromossomos Bs, supernumerários, supranumerários ou cromossomos extras. A ocorrência

desse tipo de cromossomo entre os indivíduos de uma população pode ser esporádica ou ser comumente encontrada para muitos representantes, podendo mostrar uma alta frequência entre os integrantes da população. É possível encontrar também variações em relação à morfologia, tamanho e número desse tipo de cromossomos (PAULS e BERTOLLO, 1983, 1990; VENERE et al., 1999; CAVALLARO et al., 2000; FERNANDES e MARTINS-SANTOS 2005; ARTONI et al., 2006).

Com relação à morfologia, os cromossomos supranumerários podem diferir entre os indivíduos de uma mesma espécie. Fernandes e Martins-Santos (2005) ao analisarem citogeneticamente exemplares de *A. scabripinnis* do córrego Tatupeba, bacia do rio Ivaí, encontraram três citótipos distintos referentes à presença de cromossomos supranumerários. No primeiro citótipo os indivíduos exibiram um macrocromossomo B do tipo metacêntrico totalmente heterocromático, no segundo citótipo os indivíduos portavam macrocromossomos B dos tipos metacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico, parcialmente heterocromáticos, e no terceiro citótipo os exemplares apresentaram macrocromossomos B dos tipos metacêntrico e acrocêntrico, também parcialmente heterocromáticos.

Relacionado ao tamanho, os cromossomos supranumerários exibem notável variação no gênero *Astyanax*, apresentando macromossomos B (MAISTRO et al., 1992; VICENTE et al., 1996; MOREIRA-FILHO et al., 2001; FERRO et al., 2003) bem como microcromossomos B (STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993; KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007; HASHIMOTO et al., 2008).

Os cromossomos B também podem variar em número nas espécies do gênero *Astyanax*. Inicialmente, os cromossomos B foram estudados em *A. scabripinnis* a qual apresentou populações com zero, um ou dois cromossomos extras (ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997; NÉO et al., 2000a, b; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2005).

Apesar do aumento das informações disponíveis sobre a morfologia, herança, estrutura e outros aspectos relacionados aos cromossomos B em peixes, a exata origem e significado funcional desses elementos genômicos ainda permanece desconhecida

(SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; PORTO-FORESTI et al., 1997; JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006), portanto hipóteses têm sido propostas para explicação de tal elemento no genoma. Uma delas foi proposta por Salvador e Moreira-Filho (1992), os quais realizaram o estudo da origem dos cromossomos supranumerários em uma população de *A. scabripinnis*, proveniente do município de Campos do Jordão e, segundo os autores, o elemento B nessa população poderia estar associado a não-disjunção mitótica do primeiro par metacêntrico durante a divisão celular, seguida por um processo de heterocromatização total ou parcial desse cromossomo extra.

Outros autores têm proposto a origem de cromossomos B a partir da formação de isocromossomos. Ao estudarem a espécie *A. scabripinnis*, Mestriner et al. (2000) detectaram a presença de sequências repetitivas (*As51*), também detectadas sobre cromossomos do complemento A, em ambos os braços do cromossomo B, reforçando, dessa forma, argumentos favoráveis sobre a hipótese de origem desses macrocromossomos extras pela formação de isocromossomos.

Apesar da tendência de citar a espécie *A. scabripinnis* como um modelo de estudo para cromossomos B em peixes, provavelmente devido ao número de estudos descritos disponíveis sobre a mesma, outras espécies do gênero *Astyanax* também apresentam cromossomos B em seus complementos. Por exemplo, Torres-Mariano e Morelli (2008) relataram a ocorrência de cromossomos supernumerários em *Astyanax eigenmanniorum*, Hashimoto et al. (2008) relataram a presença de cromossomos extras nos complementos de *A. altiparanae*, Daniel et al. (2012) em *A. bockmanni* e Silva et al. (2014) em *Astyanax paranae*.

Em um estudo recente, realizado em *A. paranae* por Silva et al. (2014), foi discutido que a hipótese para origem dos cromossomos Bs (um cromossomo grande metacêntrico e um cromossomo grande submetacêntrico) seria através de isocromossomos, uma vez que os autores verificaram que os dois braços cromossômicos tiveram marcações com sondas obtidas por microdissecção cromossômica de um único braço do cromossomo B metacêntrico grande. Segundo os autores foram identificados ainda, através do mapeamento de DNA

repetitivo (DNAr 18S e genes de Histonas), os prováveis pares do complemento A que originaram estes cromossomos Bs (pares 2 e 23).

Por fim, grandes esforços têm sido realizados na tentativa de entender a origem dos cromossomos B e explicar possíveis funções no genoma, porém, é notável que estes elementos não possuem uma origem ou função comum para os diferentes organismos.

#### 1.6. Localização cromossômica de sequências repetitivas no táxon

O gênero *Astyanax* é o grupo mais estudado citogeneticamente entre os *incertae sedis*. Dentre as espécies do grupo extensivamente estudadas estão *A. altiparanae*, *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* e uma das sequências repetitivas mais estudadas nesse grupo é a do DNA ribossomal (DNAr) 18S, parte da família multigênica do DNAr 45S.

A sequência do rDNA 18S apresenta variedade de localizações cromossômicas em *Astyanax*, principalmente entre as populações de uma mesma espécie. Por exemplo, Fernandes e Martins-Santos (2006) relataram para quatro populações de *A. altiparanae* provenientes da bacia do rio Paraná, quatro sítios de DNAr 18S para as populações do rio Paraná, córrego Tatupeba e córrego Maringá, e sete sítios de DNAr 18S para a população do córrego Keçaba. Por outro lado, a população de *A. altiparanae* do córrego Monjolinho (bacia do Alto Paraná, São Carlos, SP) apresentou apenas dois sítios de DNAr 18S (PERES et al., 2008). Além desses trabalhos, há outros relatando diferentes números e posições de sítios de DNAr 18S para as espécies de *Astyanax* (por exemplo, FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004, 2005, 2006; KAVALCO; ALMEIDA-TOLEDO, 2007; HASHIMOTO et al., 2008; PERES et al., 2008; FERREIRA-NETO et al. 2012; PISCOR et al., 2015).

Outra sequência repetitiva extensivamente estudada no gênero *Astyanax* é a do DNAr 5S, que mostra padrões conservados para algumas espécies do gênero. Um desses padrões é compartilhado entre *A. fasciatus*, *A. scabripinnis*, *Astyanax parahybae*, *Astyanax* sp. B, *A. paranae*, *A. bockmanni*, *A. eigenmanniorum* e *Astyanax abramis*, as quais apresentaram um par metacêntrico marcado na porção pericentromérica e um par acrocêntrico ou

subtelocêntrico marcado na porção subterminal (ALMEIDA-TOLEDO et al. 2002; KAVALCO et al., 2004; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008b; KANTEK et al., 2008; KAVALCO et al., 2009; PISCOR et al., 2015). Outro padrão notável, de localização cromossômica de DNAr 5S, que pode ser observado em *A. altiparanae*, em *Astyanax bimaculatus* e em *Astyanax lacustris* é a presença de um par submetacêntrico com marcações pericentroméricas (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006; DOMINGUES et al., 2007; FERREIRA-NETO et al., 2009; KAVALCO et al., 2011). Um terceiro padrão compartilhado entre *Astyanax janeiroensis*, *Astyanax* sp. C e *Astyanax* sp. D consiste na presença de um par acrocêntrico na posição pericentromérica marcado pelo DNAr 5S (KANTEK et al., 2008; VICARI et al., 2008b).

Além das sequências repetitivas mais comumente estudadas, como o DNAr 18S e 5S, outras sequências repetitivas têm sido analisadas, como por exemplo o DNA satélite *As51*, que foi caracterizado nos cromossomos de algumas espécies de *Astyanax*. De acordo com Mantovani et al. (2004) duas populações de *A. scabripinnis* com os números diploides  $2n = 48$  e  $2n = 50$  cromossomos mostraram que, através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), regiões de DNA satélite *As51* estão sobre regiões similares de heterocromatina revelada pela técnica de banda-C. Os autores verificaram que os grandes blocos heterocromáticos estavam localizados nas posições terminais dos braços longos, principalmente em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Também foi notada variação de número e quantidade de heterocromatina distal e de marcações *As51* em ambas as populações (MANTOVANI et al., 2004).

O padrão de distinção da heterocromatina é um dos melhores marcadores cromossômicos para a separação das populações de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MAISTRO et al., 1998) e *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006). Do mesmo modo, estudos com DNA satélite *As51* demonstraram que grandes blocos de heterocromatina em *A. fasciatus* e *A. scabripinnis* apresentaram similaridade com esse tipo de satélite, indicando que o processo de diferenciação da heterocromatina-*As51* pode estar envolvido na evolução cromossômica dessas duas espécies (KANTEK et al., 2009). A sequência *As51*

também foi observada em outras espécies, tais com *A. paranae*, *Astyanax janeiroensis*, *A. scabripinnis*, *Astyanax* sp. D, *A. fasciatus* e *Astyanax hastatus* (KANTEK et al., 2009; KAVALCO et al., 2009). Kavalco et al. (2009) estudaram quatro populações de *A. hastatus* da bacia do rio Guapimirim (RJ) e verificaram três citótipos distintos, os quais não apresentaram nenhum sinal positivo através da técnica de FISH com sonda de DNA satélite As51.

Além dessas sequências repetitivas, outra sequência estudada em *Astyanax* é a do gene de histona H1. Hashimoto et al. (2011) estudaram a localização cromossômica da histona H1 em três espécies de *Astyanax*, mostrando que as espécies apresentaram dois pares cromossômicos marcados e, que um destes apresentava sintonia dos genes de DNAr 5S e da histona H1 em um par metacêntrico em *A. bockmanni* (par 2) e *A. fasciatus* (par 3), e um par submetacêntrico em *A. altiparanae* (par 12). Os autores verificaram ainda que o padrão de localização cromossômica dos genes de histona H1-DNAr 5S (sintonia), juntamente com a análise baseada nas sequências de histona H1, demonstraram que *A. fasciatus* e *A. bockmanni* estão intimamente relacionadas.

Outros genes, recentemente mapeados nos cromossomos de espécies do gênero *Astyanax*, como *A. paranae*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni*, *A. altiparanae* e *A. jordani*, são aqueles envolvidos no processo de *splicing*, os genes da família DNAsn U (SILVA et al., 2015). Nesse estudo foi mostrado que os genes de RNAsn U2 são organizados em dois pares cromossômicos, exceto em *A. jordani* que apresentou sinais fluorescentes em apenas um par. Os autores também mostraram que os genes RNAsn U1 e U2 exibiram forte conservação em número de sítios cromossômicos por genoma, mas estes genes estão organizados em diferentes pares (SILVA et al., 2015).

Elementos transponíveis também têm sido mapeados nos cromossomos de algumas espécies do gênero. Pessenda (2012) estudou a localização cromossômica do retrotransposon *Rex1* em *A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, *A. eigenmanniorum* e *A. fasciatus*, e verificou que estas espécies apresentaram um padrão disperso para esta sequência. Segundo Silva et al. 2013, nas duas populações de *A. bockmanni* por eles analisadas, os

elementos *Rex3* estão compartimentalizados nas regiões de heterocromatina telomérica, assim como regiões eucromáticas e em sintonia com o DNAr 18S.

Por fim, estudos envolvendo diversas sequências repetitivas apresentados por diferentes autores para o gênero *Astyanax*, vêm confirmando ser este um grupo bastante interessante para estudos desse tipo, e que a localização cromossômica de sequências repetitivas em peixes pode ser de grande importância em comparações genômicas e evolutivas neste grupo.

225 **References**

226

227 1. Eschmeyer WN, Fong JD. Catalog of Fishes. 2015; online available at  
228 <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

229

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

233

234 3. Fernandes CA, Martins-Santos IC; Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax*  
235 *altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 2004;141:328–332.

236

237 4. Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an  
238 ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* 2009;136:135–139.

239

240 5. Torres-Mariano AR, Morelli S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces,  
241 Characidae) from the Araguari river, Uberlândia, MG, Brazil. *Braz J Biol* 2006;66(1A):161–165.

242

243 6. Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax*  
244 *scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol* 2000;23(2):365–369.

245

246 7. Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, *et al.*  
247 Cytogenetics three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei,  
248 Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comp Cytogenet* 2012;6(1):29–  
249 40.

250

251 8. Fernandes CA, Martins-Santos IC. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in  
252 *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná  
253 river basin, Brazil. *Genet Mol Biol* 2006;29(3):464–468.

254

255 9. Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal  
256 genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 2008;31:222–  
257 226.

258

259 10. Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F. Chromosome  
260 mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei,  
261 Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 2011;134:64–71.

262

263 11. Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, *et*  
264 *al.* Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei,  
265 Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*  
266 2013;141(7):329–336.

267

268 12. Silva DMZdA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel  
269 SN, *et al.* Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting  
270 and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS ONE*  
271 2014;9(4):e94896.

272

273 13. Silva DMZdA, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Chromosomal  
274 mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae)  
275 reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S  
276 rDNA. *Cytogenet Genome Res* 2015;146:144–152.

- 277  
278 14. Piscor D, Parise-Maltempi PP. Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes  
279 in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic  
280 conservation of repetitive genes. *Genome* 2016;59(3):167–172.  
281  
282 15. Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Polymorphic nature of nucleous organizer  
283 regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 1981;31:134–141.  
284  
285 16. Piscor D, Ribacinko-Piscor DB, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP. Cytogenetic analysis  
286 in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S  
287 rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Mol Cytogenet* 2013;6:13.  
288  
289 17. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor  
290 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.  
291  
292 18. Pendás AM, Morán P, Freije JP, García-Vázquez E. Chromosomal location and nucleotide  
293 sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet*  
294 1994;67:31–36.  
295  
296 19. Martins C, Galetti Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish  
297 (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 1999;7:363–367.  
298  
299 20. Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC. Chromosomal mapping of repetitive  
300 DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly  
301 H3 histone spreading. *PLoS ONE* 2013;8:e66532.  
302  
303 21. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity,  
304 fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934–2938.  
305  
306 22. Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in  
307 the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA  
308 and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome  
309 and A complement. *Heredity* 2010;104:393–400.  
310  
311 23. Moreira-Filho O, Bertollo LAC. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species  
312 complex. *Rev Bras Genet* 1991;14:331–357.  
313  
314 24. Pazza R, Kavalco SAF, Bertollo LAC. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus*  
315 (Teleostei, Characidae) 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of 18S and 5S  
316 ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome*  
317 *Res* 2006;112:313–319.  
318  
319 25. Paiz LM, Baumgärtner L, da Graça WJ, Margarido VP. Basic cytogenetics and physical  
320 mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected  
321 in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics  
322 of the genus. *Comp Cytogenet* 2015;9(1):51–65.  
323  
324 26. Piscor D, Alves AL, Parise-Maltempi PP. Chromosomal microstructure diversity in three  
325 *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: comparative analysis of the chromosomal  
326 locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish* 2015;12(1):81–90.  
327  
328 27. Vicari MR, Noletto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC Comparative cytogenetics  
329 among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical*  
330 *inferences. Genet Mol Biol* 2008;31:173–179.

- 331  
332 28. Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, *et al.* Karyotype  
333 and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish  
334 *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Mol Cytogenet* 2013;6:51.  
335
- 336 29. Merlo MA, Pacchiarini T, Portela-Bens S, Cross I, Manchado M, Rebordinos L. Genetic  
337 characterization of *Plectorhinchus mediterraneus* yields important clues about genome  
338 organization and evolution of multigene families. *BMC Genet* 2012;13:33.  
339
- 340 30. Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. Comparative  
341 chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species  
342 (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G.*  
343 *pantanal*. *Cytogenet Genome Res* 2014;142:286–292.  
344
- 345 31. Dowling, TE, Martasian DP, Jeffery WR. Evidence for multiple genetic forms with similar  
346 eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Mol Biol Evol* 2002;19(4):446–  
347 455.  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381

257 **References**

- 258 ALMIRÓN, A.; AZPELIQUETA, M.; CASCIOTTA J.; LÓPEZ CAZORLA, A.  
 259 Ichthyogeographic boundary between the Brazilian and Austral subregions in South  
 260 America, Argentina. **Biogeographica**. v. 73, n. 1, p. 23–30, 1997.  
 261
- 262 BARTOLI, G.; SARNTHEIN, M.; WEINELT, M.; ERLLENKEUSER, H.; GARBE-  
 263 SCHONBERG, D.; LEA, D. W. Final closure of Panama and the onset of northern  
 264 hemisphere glaciation. **Earth and Planetary Science Letters**. v. 237, n.1–2, p. 33–44,  
 265 2005.  
 266
- 267 BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P: Comparative mtDNA phylogeography of neotropical  
 268 freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central  
 269 America. **Molecular Ecology**. v. 7, n.4, p. 499–517, 1998.  
 270
- 271 BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal  
 272 mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B  
 273 chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PLoS ONE**. v. 8, p. e66532, 2013.  
 274
- 275 CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of  
 276 repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an  
 277 association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity  
 278 between the B chromosome and A complement. **Heredity**. v. 104, p. 393–400, 2010.  
 279
- 280 CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform  
 281 fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular**  
 282 **Phylogenetics and Evolution**. v. 36, n.1, p. 135–153, 2005.  
 283
- 284 CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; BUCKUP, P. A.; MOREIRA-FILHO, O.  
 285 Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species  
 286 (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**. v. 138, n. 3, p. 213–218, 2003.  
 287
- 288 COATES, A.; OBLANDO, J. A. **The geologic evolution of the Central America Isthmus.**  
 289 In *Evolution and Environmental in Tropical America* Edited by: Jackson JBC, Budd AF,  
 290 Coates AG. Chicago: Chicago University Press, Chicago; 1996:21–56.  
 291
- 292 CONCHEIRO-PEREZ, G. A.; RICAN, O.; ORTI, G.; BERMINGHAM, E.; DOADRIO, I.;  
 293 ZARDOYA, R. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei:  
 294 Cichlidae) based on sequences of the cytochrome *b* gene. **Molecular Phylogenetics and**  
 295 **Evolution**. v. 43, n. 1, p. 91–110, 2007.  
 296
- 297 COUTINHO-SANCHES, N.; DERGAM, J. A. Cytogenetic and molecular data suggest  
 298 *Deuterodon pedri* Eigenmann, 1907 (Teleostei: Characidae) is a member of an ancient  
 299 coastal group. **Zebrafish**. v. 12, n. 5, p. 357–365, 2015.  
 300
- 301 DOBIGNY, G.; DUCROZ, J. F.; ROBINSON, T. J.; VOLOBOUÉV, V. Cytogenetics and  
 302 cladistics. **Systematic Biology**. v. 53, p. 470–484, 2004.  
 303
- 304 ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D.; VAN-DER-LAAN R. Catalog of Fishes.  
 305 <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>  
 306 (acesso em 4/4/2016).  
 307
- 308 FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of two  
 309 populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) of the Ivaí basin PR Brazil.  
 310 **Cytologia**. v. 68, p. 289–293, 2003.  
 311

- 312 FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. Polymorphic nature of  
313 nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenetics Cell Genetics**. v. 31, p. 137-144, 1981.  
314
- 315 HASHIMOTO, D. T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; FORESTI, F.; Oliveira C,  
316 Foresti F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes clusters in three  
317 species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. v.  
318 134, p. 64–71, 2011.  
319
- 320 HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions  
321 with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015,  
322 1980.  
323
- 324 ITURRALDE-VINENT, M. A.; MACPHEE, R. D. E. Paleogeography of the Caribbean region:  
325 Implications for cenozoic biogeography. **Bulletin of the American Museum of Natural  
326 History**. p. 1–95. 1999.  
327
- 328 JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships  
329 among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based  
330 on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 54, p. 498–511,  
331 2010.  
332
- 333 KAVALCO, K. F.; PAZZA R.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *Astyanax bockmanni* Vari and  
334 Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**. v. 136, n. 1, p.  
335 135–139, 2009.  
336  
337
- 338 KRINSKI, D.; MIYAZAWA, C. S. Cytogenetic analysis of three species of *Astyanax* genus  
339 (Pisces, Characidae, *Incertae sedis*) from freshwaters of upper Paraguay basin, Mato  
340 Grosso state, Brazil. **Journal of Life Science**. v. 8, n. 1, p. 51–57, 2014.  
341
- 342 LANDEEN, E. L.; PRESGRAVES, D. C. Evolution: from autosomes to sex chromosomes –  
343 and back. **Current Biology**. v. 23, p. R848-R850, 2013.  
344
- 345 LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.;  
346 HAROLD, A. et al. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.  
347 E.; FERRARIS Jr., C. J., (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and  
348 Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. 2003. p. 106–169.  
349
- 350 METCALFE, C. J.; BULAZEL, K.; FERRERI, G. C.; SCHROEDER-REITER, E.; WARNER,  
351 G.; RENS W.; OBERGFELL, C.; ELDRIDGE, M. D. B; O'NEILL, R. J. Genomic instability  
352 within centromeres of interspecific marsupial hybrids. **Genetics**. v. 177, p. 2507–2517,  
353 2007.  
354
- 355 MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Microsatellite organization in the grasshopper  
356 *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable  
357 spreading in the A and B chromosomes. **PLoS One**. v. 9, p. e97956, 2014.  
358
- 359 MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from  
360 characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**. v. 8, p. 385–568, 2010.  
361
- 362 MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a  
363 species complex. **Revista Brasileira de Genética**. v. 14, p. 331–357, 1991.  
364
- 365 MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO,  
366 S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic  
367 variability. **Caryologia**. v. 36, p. 235–244, 1983.

- 368  
369 OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.;  
370 VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetic relationships within the speciose family  
371 Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and  
372 extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**. v. 11, p. 275, 2011.  
373
- 374 ORNELAS-GARCÍA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO I. Evolutionary  
375 history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in  
376 Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**. v.  
377 8, p. 340, 2008.
- 378
- 379 PAGE, L. M.; BURR B. M. **A field guide to freshwater fishes of North America north of**  
380 **Mexico**. Houghton Mifflin Company, Boston. 1991. p. 432.  
381
- 382 PANSONATO-ALVES, J. C.; HILSDORF, A. W. S., UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. M. Z. A.;  
383 OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome c  
384 oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax*  
385 *fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v. 141, p.  
386 133–142, 2013.
- 387
- 388 PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location  
389 and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA.  
390 **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 67, p. 31–36, 1994.  
391
- 392 PERDICES, A.; BERMINGHAM, E. A. M.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus  
393 *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and**  
394 **Evolution**. v. 25, p. 172–189, 2002.  
395
- 396 PERDICES, A.; DOADRIO, I.; BERMINGHAM, E. A. M. Evolutionary history of the  
397 synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands  
398 inferred from their molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 37,  
399 n. 2, p. 460–473, 2005.  
400
- 401 PINKEL, D.; STRUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high  
402 sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**.  
403 v. 83, p. 2934–2938, 1986.  
404
- 405 PISCOR, D.; RIBACINKO-PISCOR, D. B.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI P. P.  
406 Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first  
407 description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. **Molecular**  
408 **Cytogenetics**. v. 6, p. 13, 2013.  
409
- 410 PISCOR, D.; ALVES, A. L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal microstructure  
411 diversity in three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: comparative analysis of  
412 the chromosomal locations of the 18S and 5S rDNAs. **Zebrafish**. v. 12, n. 1, p. 81–90,  
413 2015.  
414
- 415 PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA  
416 genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers:  
417 syntenic conservation of repetitive genes. **Genome**. v. 59, n. 3, p. 167–172, 2016.  
418
- 419 REEVES, R. G.; BERMINGHAM, E. Colonization, population expansion, and lineage  
420 turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. **Biological Journal of the**  
421 **Linnean Society**. v. 88, n.2, p. 235–255, 2006.  
422

- 423 ROSEN, D. E. Vicariance Model of Caribbean Biogeography. **Systematic Zoology**. v. 24,  
424 n. 4, p. 431–464, 1975.  
425
- 426 ROSEN, D. E. Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. **Systematic**  
427 **Zoology**. v. 27, p. 159–188, 1978.  
428
- 429 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. vol. 3. Set.  
430 Cold Spring Harbor Laboratory Publisher, 2001.  
431
- 432 SILVA, D. M. Z. A.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.;  
433 RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P.  
434 M.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH  
435 mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae*  
436 (Teleostei, Characiformes). **PLoS ONE**. v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.  
437
- 438 SILVA, D. M. Z. A.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.;  
439 FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of  
440 *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA  
441 sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**. v.  
442 146, p. 144–152, 2015.  
443
- 444 SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.  
445 **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 304–306, 1972.  
446
- 447 TENÓRIO, R. C. C. O.; VITORINO, C. A.; SOUZA, I. L.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C.  
448 Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the  
449 cytotaxonomy of the group. **Neotropical Ichthyology**. v. 11, n. 3, p. 553–564, 2013.  
450
- 451 WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of  
452 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.;  
453 SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR Protocols: a guide to methods and**  
454 **applications**. Academic Press, New York, USA. 1990. p. 315–322.  
455

***CONCLUSÕES***

## 7. CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos e as análises compreendidas nesta tese, é possível concluir que:

- 1) Entre as espécies estudadas, as que apresentaram características cromossômicas mais distintas foram *A. schubarti* ( $2n = 36$ ) restrita a rios paulistas, *A. marionae* ( $2n = 48$ ) da bacia do rio Paraguai e *A. mexicanus* ( $2n = 50 + 1B$ ) com distribuição entre sul da América do Norte e a América Central.
- 2) A localização do DNAr 5S parece ser conservada para alguns grupos dentro de *Astyanax*, diferentemente do DNAr 18S, o qual apresenta enorme variabilidade em termos de localização cromossômica e número de sítios.
- 3) Os genes de histona H3 apresentam localizações em cromossomos com morfologias similares para as espécies da América do Sul, com exceção de *A. schubarti* ( $2n = 36$ ) e *A. marionae* ( $2n = 48$ ).
- 4) Os cromossomos portadores dos genes de RNAsn U2 mostraram o maior grau de similaridade morfológica no grupo *Astyanax*. Mesmo em espécies com traços morfológicos muito similares, como por exemplo, *A. marionae* e *A. fasciatus*, e localizações cromossômicas dos genes H3-5S tão distintas, os genes U2 apresentaram localizações muito similares entre as duas espécies e as demais da América do Sul, com exceção de *A. schubarti*.
- 5) O estudo dos microssatélites foi de fundamental importância nesse trabalho, pois os resultados permitiram constatar a proximidade de grupos com características bastante peculiares dentro de *Astyanax*. Por exemplo, por mais que em *A. marionae* e *A. schubarti* as localizações cromossômicas dos genes de histona

H3 foram distintas, estas duas espécies compartilham uma característica em comum (co-localização 5S-GATA).

- 6) Espécies da América do Sul apresentaram-se mais próximas entre si do que com *A. mexicanus* (peixe cego de caverna do México).
- 7) Estudos mais conclusivos foram possíveis, e capazes de responder questões fundamentais relacionadas a origem e evolução dos cromossomos do grupo *Astyanax*, a partir de análises mais completas, como exemplificado neste trabalho com uso de dados de natureza citogenética e molecular.
- 8) *Astyanax* se configura, atualmente, como um gênero muito complexo filogeneticamente, e uma revisão taxonômica deveria ser avaliada para o grupo, levando em consideração não apenas caracteres morfológicos ou dados moleculares, mas diversos aspectos como, por exemplo, ecologia, comportamento, ciclo de vida e também dados citogenéticos, entre outros.