



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

CITOGENÉTICA MOLECULAR E EVOLUTIVA NA FAMÍLIA CHARACIDAE

Luana Pereira dos Santos

Orientadora: Sandra Morelli

Co-orientador: Roberto Ferreira Artoni

UBERLÂNDIA-MG

2014



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

CITOGENÉTICA MOLECULAR E EVOLUTIVA NA FAMÍLIA CHARACIDAE

Luana Pereira dos Santos

Orientadora: Sandra Morelli

Co-orientador: Roberto Ferreira Artoni

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA-MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237c
2014 Santos, Luana Pereira dos, 1984
Citogenética molecular e evolutiva na família *Characidae* / Luana Pereira dos Santos. - 2014.
110 f. : il.

Orientadora: Sandra Morelli.
Coorientador: Roberto Ferreira Artoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Peixes de água doce - Teses. 3. *Astyanax* (Peixe) - Citogenética - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Artoni, Roberto Ferreira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



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

CITOGENÉTICA MOLECULAR E EVOLUTIVA NA FAMÍLIA CHARACIDAE

Aluna: Luana Pereira dos Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Sandra Morelli

Examinadores:

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG)

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres (UFPE)

Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira (UFU)

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior (UFU)

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Ribeiro Torres (UEPI)

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (UFU)

Data da Defesa: 17/12/2014

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

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

“Os fatos são as peças que constituem a Ciência, mas a Ciência não começa com os fatos. Ela começa com as observações.” C.J. Herrick

Confio no Senhor de todo o meu coração e não dependo do meu próprio entendimento. Reconheço o Senhor em todos os meus caminhos e ELE me dirige os passos. Pv. 3:5-6

“A GRAÇA é um presente que custa tudo para o doador, e nada para quem a recebe!” Philip Yancey

Dedico este trabalho à minha família e especialmente
ao meu amigo, parceiro, conselheiro e marido
Fernando.

Agradecimentos

À Deus pela dádiva da vida, pelo cuidado inefável e por ter colocado em meu caminho todas as pessoas maravilhosas que contribuíram significativamente para a realização desta.

À minha mãe Erlinda que é a pessoa mais importante em toda minha formação pessoal, emocional e profissional que me alicerça com o seu exemplo de perseverança. Amo muito você! (seria impossível expressar em palavras toda minha gratidão).

Ao meu amado esposo Fernando pela inestimável ajuda nas coletas, viagens, ausências, por toda tolerância, companheirismo, compreensão, amor e cuidado! Te amo!

Às minhas irmãs e amigas Karina e Vielka pela torcida e companhia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutorado, ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento deste projeto.

À Universidade Federal de Uberlândia que me concedeu a oportunidade de concluir esta etapa e foi o elo entre as pessoas maravilhosas que aqui conheci.

Ao Laboratório de Citogenética Animal do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade e infra-estrutura necessária para a realização dos experimentos, coletas e viagens.

Ao Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) dirigido pelos professores Roberto, Marcelo, Marta e Viviane; ao técnico Miguel e aos colegas e parceiros Jonathan, Patrícia, Luiz e Marcela pelo proveitoso estágio, pelos ensinamentos, discussões e colaboração neste trabalho. Agradeço especialmente à Diana Cornélio pela acolhida, prestatividade e amizade.

À Professora Dra. Sandra Morelli, orientadora e amiga, pela orientação, amizade, companheirismo, confiança e pela oportunidade em fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao Professor Roberto Ferreira Artoni pelo privilégio de me receber em seu laboratório, por todos os ensinamentos, paciência, prestatividade, disponibilidade em me orientar e os inúmeros conselhos e palavras de motivação.

A todos os professores da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelos ensinamentos durante as disciplinas e à Coordenação do Programa.

À Universidade Federal do Tocantins, por nos cederem gentilmente o laboratório para a realização do processamento dos peixes.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia na pessoa do pesquisador Samuel Rezendo Paiva por nos emprestar o laboratório durante a coleta em Brasília.

À professora Dra Rute Magalhães Brito por toda amizade, dedicação e orientação durante esse período.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições neste trabalho.

Ao professor Ricardo Cardoso Benine da Universidade Estadual de São Paulo pela identificação dos exemplares.

Ao José Clidenor (Pé) técnico do laboratório pela amizade e toda ajuda durante as coletas.

Aos queridos amigos do Laboratório Dany, Sabrina, Edimar; à gentil e prestativa Tamiris e especialmente à amiga Carine pela ajuda nas saídas de campo, incentivo em todas as horas e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, sem falar nos ótimos momentos de alegria.

Ao Sr. Estácio proprietário da Fazenda Taboquinha por nos tê-la cedido para as coletas e ao Sr. Célio que nos emprestou o seu tablado para coleta das sardinhas.

Às amigas do coração Soraia, Tânia, Carla e toda família Getsêmani; à amiga Célia pela prazerosa companhia e pela revisão do manuscrito.

Lista de Figuras

CAPITULO I

Figura 1 – Mapa do Brasil indicando as principais bacias hidrográficas e em destaque (A) os locais de coleta dos espécimes estudados. Mapa do Estado do Tocantins indicando a bacia Araguaia-Tocantins e o local específico de coleta (B).....	17
Figura 2 – Consenso de máxima parcimônia para o gene mitocondrial da citocromo oxidase nas espécies de <i>Moenkhausia</i> (Benine et al., 2004).....	29
Figura 3 – Representação da relação entre linhagens da família Characidae mostrando a posição das espécies de <i>Moenkhausia</i> Clado 5 (Mariguela et al., 2013).....	30
Figura 4 – Exemplares de <i>M. oligolepis</i>	32
Figura 5 – Exemplares de <i>Astyanax paranae</i> de Lago Paranoá-DF (A) e de Indianópolis-MG (B).....	32
Figura 6 – Exemplar de <i>A. elachylepis</i>	33
Figura 7 – Exemplar de <i>A. goyacensis</i>	33

CAPITULO II

Figure 1 – <i>Astyanax goyacensis</i> chromosomes showing (a) Giemsa-stained standard karyotype; (b) C-banding karyotype; (c) the mitotic metaphases (DAPI staining) show the B chromosomes (stars); (d) FISH with B chromosome-specific probe (arrowheads for autosomes and stars for the B microchromosome). In detail a haploid idiogram of the acrocentric chromosomes and the types of B microchromosomes. Red markings indicate the location of the B chromosome-specific probe; (e) Ag-NORs bearing chromosomes (arrowheads); (f) FISH with 18S rDNA (green, arrowheads) and 5S rDNA (red, arrow) probes. The scale bars: 10µm.....	56
--	----

CAPITULO III

- Figura 1 – Consenso de máxima parcimônia para o gene mitocondrial da citocromo oxidase nas espécies de *Moenkhausia* (Benine et al., 2004).....63
- Figura 2 – Cariótipo padrão de *Moenkhausia oligolepis* (Taboquinha) corado com giemsa (A), evidenciando a presença de 6 microcromossomos B e cariótipo de banda C (B) Barra = 10µm.....78
- Figura 3 – Coloração sequencial sobreposta de DAPI+CMA₃ da população Taboquinha (A) e destaques dos cromossomos marcados com sondas de rDNA 5S (verde) e rDNA18S (vermelho) (B, C e D). As setas indicam localizações distintas para os sítios ribossomais. Análise sequencial Giemsa (a), banda C (b) e FISH 18S (vermelho) e 5S (verde) (c) da população Pedro Correia.....79
- Figura 4 – Análise sequencial de banda C evidenciando a presença de um microcromossomo B eucromático (A). Sonda construída por microdissecção do microcromossomo B, amplificada por DOP/PCR e marcada por *nick translation* (vermelho) (B). Hibridização com sonda 18S (verde) usada como controle da FISH (C).....80

CAPITULO IV

- Figura 1 – Cariótipos de *Astyanax paranae* do Ribeirão Mandaguari (A), Córrego Lajeado (B), Lago Paranoá (C) e *A. elachylepis* (D).....87
- Figura 2 – Análise sequencial de metáfases coradas com Giemsa (A); padrão de heterocromatina constitutiva (B) e localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs) (C).....88
- Figura 3 – Metáfases de *A. paranae* do Ribeirão Mandaguari mostrando a dupla FISH das sondas de rDNA 18S e 5S.....88
- Figura 4 – Metáfases de *A. paranae* do Córrego Lajeado corada com giemsa e no detalhe, os cromossomos portadores das Ag-RONs (A); mostrando os blocos heterocromáticos (B) e os sítios de rDNA 5S e 18S (C).....89

Figura 5 – Metáfases sequenciais de <i>A. paranae</i> do Lago Paranoá coradas com giemsa e nitrato de prata mostrando as marcações de Ag-RONs (setas).....	89
Figura 6 – Metáfases sequenciais mostrando o bandamento C (A) e os cístrons de rDNA 18S e 5S (B).....	90
Figura 7 – Metáfases sequenciais de <i>A. elachylepis</i> do Córrego Taboquinha corada com giemsa (A); marcação da heterocromatina constitutiva (B) e sítios rDNA 18S e 5S (C).....	90

Índice – Sumário

Apresentação	12
CAPÍTULO I	14
1 Fundamentação Teórica	15
1.1.1 Considerações sobre o ambiente de coleta	15
1.1.2 Aspectos Citogenéticos	17
1.1.3 Aspectos taxonômicos da Família Characidae	18
1.1.4 Considerações sobre o gênero <i>Astyanax</i>	19
1.1.5 Cromossomos B	21
1.1.6 Presença de Cromossomos B no gênero <i>Moenkhausia</i>	25
1.1.7 Bandamentos Cromossômicos	28
1.1.8 Referências Bibliográficas	30
CAPÍTULO II	44
1.2 Occurrence of the B microchromosome in <i>Astyanax goyacensis</i> Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis)	45
1.2.1 Background	46
1.2.2 Results and Discussion	47
1.2.3 Conclusion	49
1.2.4 Methods	49
1.2.5 References	51
CAPÍTULO III	57
1.3 O cariótipo de <i>Moenkhausia oligolepis</i> (Günther, 1864): aspectos da evolução cariotípica e presença de cromossomos supranumerários no gênero	58
1.3.1 Introdução	60
1.3.2 Material e Métodos	63
1.3.3 Resultados	65
1.3.4 Discussão	67
1.3.5 Referências Bibliográficas	71
CAPÍTULO IV	80
1.4 Intra- and Interspecific diversity in <i>Astyanax</i> (Teleostei: Characidae): Karyoevolutionary inferences	81
1.4.1 Introduction	83
1.4.2 Material and Methods	84
1.4.3 Results	85
1.4.2 Discussion	85
1.4.5 Acknowledgements	88
1.4.6 References	88
1.5 Considerações Finais	97
ANEXOS	98

1.6 Protocolos de Citogenética Convencional	99
1.6.1 Estimulação de mitoses	99
1.7 Obtenção de Cromossomos Metafásicos Mitóticos	99
1.8 Coloração convencional com Giemsa	101
1.9 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs)	101
1.10 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)	102
1.11 Estudos Cariotípicos	103
1.12 Citogenética Molecular	103
1.12.1 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	103
1.12.1.1 Obtenção das sondas	103
1.12.1.2 Marcação de sonda por nick translation	104
1.12.1.3 Marcação da sonda por PCR	104
1.12.1.4 Observação dos tamanhos dos fragmentos em gel	104
1.12.1.5 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	104
1.12.1.6 Lavagens	105
1.13 Montagem da lâmina	106
1.14 Análise dos Marcadores citogenéticos	107
TABELAS	108
1.15 Tabelas das frequências cromossômicas das duas populações de <i>Moenkhausia oligolepis</i> estudadas.	109

Apresentação

A família *Characidae* é o grupo mais complexo entre os Characiformes e compreende a maioria dos peixes de água doce da América do Sul. Sua distribuição geográfica compreende da fronteira do México com os EUA até a Argentina. O gênero *Astyanax* é o mais estudado citogeneticamente dentro dessa família, conhecidos popularmente por lambaris e piabas. Além destes, outros como *Moenkhausia* anteriormente considerados membros da subfamília Tetragonopterinae (sensu Gery), estão listados como *Incertae Sedis* devido às suas características de difícil diagnose. Ao longo dos últimos 30 anos estes peixes têm sido alvo de estudos cromossômicos, que os caracterizaram como um grupo com grande diversidade cariotípica. Recentemente, o advento de técnicas de citogenética molecular forneceram novos dados sobre a biologia evolutiva do grupo, os quais possibilitaram a análise de antigos problemas, como sua difícil classificação taxonômica. O gênero *Astyanax* está intimamente relacionado ao gênero *Moenkhausia*, havendo hipóteses deste último ter conservado um possível cariótipo ancestral deste grupo. Vários trabalhos realizados com *Moenkhausia* e *Astyanax* evidenciaram a presença de cromossomos supranumerários, contribuindo com os estudos de origem e evolução destes elementos. Diante do exposto, através da aplicação de técnicas citogenéticas são apresentados dados cariotípicos para *Astyanax paranae* coletados em três regiões, sendo elas Córregos Mandaguari e Lajeado no município de Indianópolis-MG e Lago Paranoá-DF; *A. elachylepis* e *A. goyacensis* do Córrego Taboquinha município de Monte do Carmo-TO; *Moenkhausia* cf. *oligolepis* dos Córregos Taboquinha e Pedro Correia em Monte do Carmo-TO. As análises cromossômicas apresentadas neste trabalho forneceram dados suplementares sobre a ictiofauna das regiões, relacionando aspectos adicionais do conjunto cromossômico como a presença de cromossomos supranumerários, cromossomos sexuais e aspectos evolutivos das populações. Os dados cromossômicos foram analisados e contribuíram com inferências sobre a estruturação genética destas populações sujeitas à constantes impactos ambientais.

CAPÍTULO I

1 Fundamentação Teórica

1.1.1 Considerações sobre o ambiente de coleta

A modificação da fauna é esperada com a construção de barragens, destruição da vegetação ripária e introdução de espécies de outras bacias. Assim, riachos e suas cabeceiras são ambientes que devem receber prioridade nos estudos, antes que muitas informações sejam perdidas (Castro, 1999; Agostinho et al., 2008).

Devido a ampla diversidade e aos escassos estudos realizados até o momento, o conhecimento que se tem da ictiofauna é reduzido. Este problema tem sido agravado nos últimos tempos pelo fato do ser humano danificar de forma irreparável o ambiente em muitas áreas, conduzindo a extinção de espécies ainda nem conhecidas no mundo científico. Por estas razões, se torna cada vez mais importante e urgente a necessidade de estudar as espécies presentes em nosso ecossistema, envolvendo a maioria dos aspectos possíveis, de maneira que as futuras gerações disponham de informações que lhes permitam o aproveitamento desse recurso ao máximo (Nirchio & Oliveira, 2006).

A bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins possui uma área de mais de 960.000 quilômetros quadrados e abrange os territórios dos estados de Goiás, Tocantins, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Distrito Federal. É formada por diversos rios, dentre eles o Rio Tocantins, Araguaia e o Rio das Mortes, conforme mostra a Figura 1 (Relatório Técnico: Bacia do Araguaia-Tocantins, 2013).

O Reservatório de Lajeado é a quarta maior hidrelétrica construída no Rio Tocantins. A área ocupada que compreende as porções média e alta desse rio, está localizada em uma região de savanas naturais, apresentando em quase sua totalidade o bioma cerrado, antes caracterizada por um ambiente lótico com várias corredeiras e quedas d'água. A sua implementação implicou em graves danos a ictiofauna, bem como o desmatamento acelerado devido à agricultura e a criação de gado, que vêm contribuindo para mudanças no ambiente aquático. Além disso, as informações sobre a ictiofauna desta região

são escassas especialmente para as porções média e alta (Lucinda et al., 2007a).

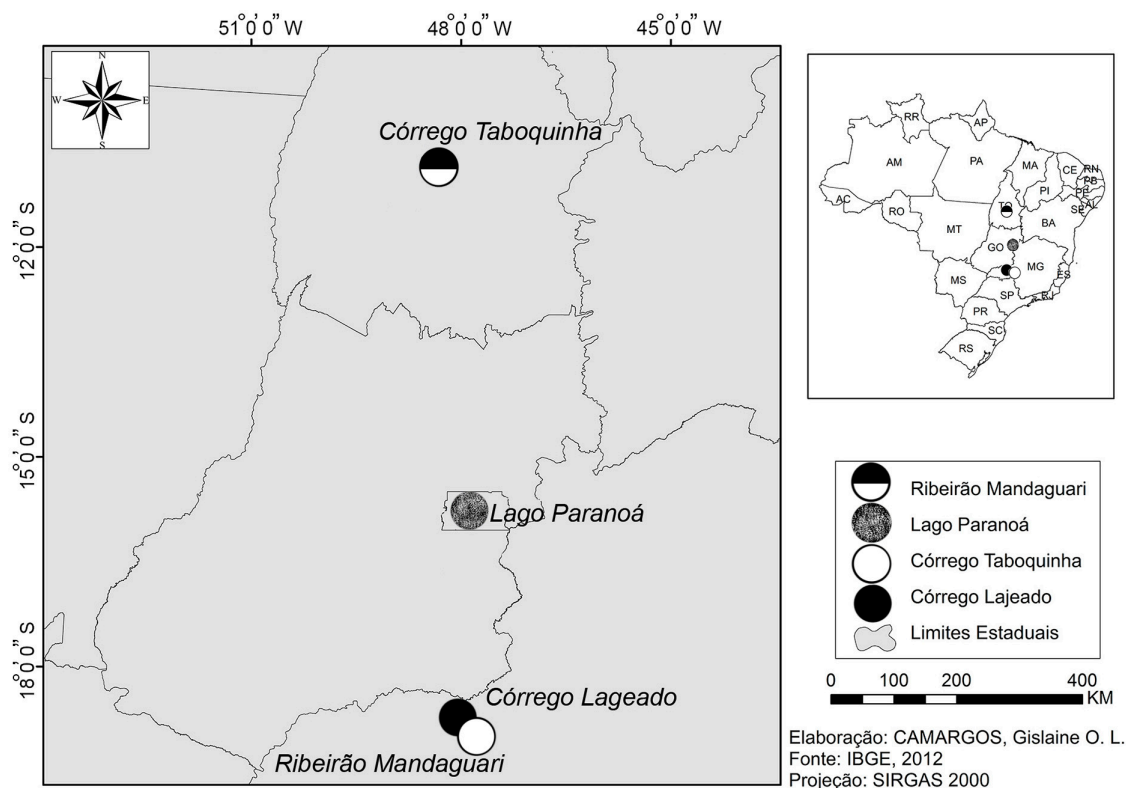


Figura 1 – Mapa do Brasil com detalhe indicativo das localidades de coleta (círculos sombreado, preto e branco) na bacia do Rio Paranaíba e (círculo preto e branco) na bacia do Rio Tocantins.

Apesar de várias espécies novas terem sido descritas na bacia Araguaia-Tocantins nas últimas décadas, muitas espécies permanecem desconhecidas, possuem problemas taxonômicos ou ainda não foram descritas, tornando o conhecimento desta fauna incompleto (Malabarba & Vari 2000; Bertaco & Lucinda 2005, 2006; Lucinda et al., 2007b).

A região do Distrito Federal (DF) é drenada por cursos d'água pertencentes a três das mais importantes bacias hidrográficas brasileiras: São Francisco (Rio Preto), Araguaia-Tocantins (Rio Maranhão) e Paraná (rios São Bartolomeu e Descoberto). De acordo com o mapa hidrográfico do DF (Mapa das Unidades Hidrográficas), essas bacias são denominadas de Regiões Hidrográficas. Todos os seus rios são de planalto, sendo as principais bacias identificadas por um padrão de drenagem radial. Pela disposição da drenagem,

observa-se que dois de seus cursos de água são delimitadores do território do Distrito Federal: a Leste, o Rio Preto e a Oeste, o Rio Descoberto.

1.1.2 Aspectos Citogenéticos

Os efeitos de uma alteração cromossômica se devem a novos arranjos de cromossomos e dos genes que eles contém (Maluf & Riegel, 2011). Muitas destas alterações levam à anomalias no funcionamento celular, interferindo no desenvolvimento do organismo. Existem dois motivos básicos para isso: primeiro, as alterações cromossômicas podem resultar em número ou posição anormal de genes; segundo, se a alteração cromossômica envolver quebra de cromossomos, o que em geral ocorre, a quebra pode ocorrer no meio de um gene, perturbando assim o seu funcionamento (Maluf & Riegel, 2011).

A citogenética tem contribuído com estudos significativos acerca da biologia das espécies, ajudado esclarecer processos evolutivos a que estão sujeitas e em conjunto com os estudos de efluentes no propósito de conservação, tem auxiliado na identificação de polimorfismos cromossômicos de vários graus em diferentes espécies de peixes (Artoni et al., 2006; Pazza et al., 2008).

Os sistemas de rios tropicais de grande porte, como a Bacia do Rio São Francisco e Araguaia-Tocantins, permitem que algumas espécies de peixes se isolem geograficamente nas cabeceiras de seus tributários, através de barreiras intrapopulacionais físicas, químicas ou bióticas, permitindo que estas evoluam dentro do próprio sistema (Lowe-McConnell, 1969).

Alguns trabalhos tem demonstrado que as características cromossômicas são ferramentas para estudos de diversidade genética, interconexão de drenagens na distribuição geográfica dos peixes, melhor identificação das diferentes espécies, conhecimento da estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos, assim como para o mapeamento de genes específicos; o número cromossômico tem sido associado a possíveis divergências durante a história biogeográfica e tectônica (Pamponet et al., 2008; Peres et al., 2012; Nirchio & Oliveira, 2006).

As análises de citogenética molecular tem mostrado que os elementos transponíveis, em inúmeros casos, estão associados com rearranjos

cromossômicos como deleções, duplicações, inversões, formação de fragmentos acêntricos e cromossomos dicêntricos, recombinação e translocações do genoma (Oliveira et al., 2013).

1.1.3 Aspectos taxonômicos da Família Characidae

Pouco ainda se conhece da ictiofauna neotropical considerada como de maior biodiversidade do planeta, a qual segundo Nelson (2006) apresenta cerca de 8.000 espécies de peixes.

A grande diversidade de ambientes ecológicos existentes permitiu uma grande irradiação evolutiva, sendo que esta região possui hoje a ictiofauna de água doce mais rica e diversa de todo o mundo (Artoni et al., 2000).

A ordem Characiformes compreende mais de 3.000 espécies, dos quais a família Characidae representa a quarta mais diversa família de peixes depois dos Cyprinidae, Cichlidae e Gobiidae (Eschmeyer & Fricke, 2014).

Characidae é uma família de peixes de água doce dominante da América Tropical com maior concentração de espécies na bacia amazônica (Eigenmann, 1917; Reis et al., 2003). São reconhecidas cerca de 1100 espécies válidas, representando perto de 58% de todas as espécies incluídas na ordem Characiformes (Eschmeyer & Fricke, 2014). Characidae é o táxon mais ativo em termo de descrição de novas espécies, com aproximadamente 250 nos últimos dez anos, além disso é considerada também o grupo mais problemático na ordem Characiformes e sua composição e relação dentro desta ordem é considerada instável (Oliveira et al., 2011).

Oliveira et al. (2011) propõem uma nova definição para a família Characidae e mudanças nos limites de outras famílias da ordem Characiformes.

Lima et al. (2003) restringiram a subfamília Tetragonopterinae (*sensu* Géry, 1977) a um único gênero, *Tetragonopterus*, e as demais espécies referidas a esta subfamília foram consideradas *incertae sedis* em Characidae. Os caracídeos *incertae sedis* (*sensu* Lima et al., 2003) totalizam hoje 92 gêneros válidos, sendo muitos deles monotípicos, e compreendem os táxons que ocupam uma posição filogenética incerta dentro da família Characidae.

1.1.4 Considerações sobre o gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é um dos principais representantes da família Characidae, que atualmente compreende aproximadamente 142 espécies válidas (Bertaco & Lucena, 2006; Eschmeyer & Fricke, 2014). O gênero descrito por Baird & Girard (1854) inclui peixes de pequeno porte popularmente conhecidos como lambaris ou piabas, sendo amplamente distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina.

Trabalhos baseados em caracteres morfológicos e moleculares, confirmam que as espécies nominais descritas para o gênero *Astyanax* não representam um grupo monofilético (Bertaco & Garutti, 2007; Mirande, 2010; Javonillo et al., 2010; Oliveira et al., 2011). Um número muito grande de espécies, muitas das quais descritas com base em número reduzido de exemplares, tem sido colocadas nesse gênero (Bertaco & Lucinda, 2005; Bertaco et al., 2010; Ingenito & Duboc, 2014; Lucena et al., 2013; Vari & Castro, 2007). Neste sentido, trabalhos de redefinição das espécies já descritas, como o de Melo & Buckup (2006) e Oliveira et al. (2011), têm contribuído para a elucidação da história evolutiva do gênero, eliminando possíveis redundâncias nas descrições específicas.

O gênero *Astyanax*, tem sido amplamente estudado por diversas áreas da biologia, em especial pela citotaxonomia equipada com ferramentas moleculares na intenção de compreender os possíveis eventos evolutivos e de diferenciação que tornam esse grupo incerto sob o ponto de vista morfológico e taxonômico (Mirande, 2010; Javonillo et al., 2010). Os principais motivos que tem norteado essas pesquisas tem sido dentre outros, as particularidades apresentadas como variação no número diplóide e macroestrutura cariotípica, ausência e presença de cromossomos supranumerários, polimorfismos e variações na localização dos genes ribossomais (Artoni et al., 2009; Abellini et al., 2014, Ferreira-Neto et al., 2012; Hashimoto et al., 2008; Santos et al., 2013).

Além disso, são observados no gênero *Astyanax* complexos de espécies, em que tanto os números diploides quanto as fórmulas cariotípicas

são variáveis, relativos à pelo menos três grupos: *A. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Artoni et al., 2000); *A. fasciatus* (Justi, 1993; Pazza et al., 2006; Kantek et al., 2008) e *A. altiparanae* (Fernandes & Martins-Santos, 2004). Nos complexos de espécies é observado alto grau de variabilidade citogenética, envolvendo aspectos como suas macroestruturas cariotípicas, números diploides, presença de cromossomos supranumerários ou B, polimorfismos de blocos heterocromáticos e das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), variações na localização dos genes ribossomais, assim como triploidias (Pazza & Kavalco, 2007; Ferreira-Neto et al., 2009), isso se reflete na diversidade desse gênero, podendo se tratar da ocorrência de espécies críticas.

No complexo *Astyanax altiparanae* / *Astyanax bimaculatus*, estudos citogenéticos têm mostrado grandes variações em suas fórmulas cariotípicas e no número de cromossomos marcados pela prata (Ag-RONs) que não afetam o número diplóide de $2n = 50$, além da presença de cromossomos B (Pacheco et al., 2001; Fernandes & Martins-Santos, 2004; Domingues et al., 2007; Hashimoto et al., 2008; Santos et al., 2013).

A. altiparanae é uma designação dada às populações do Alto rio Paraná do grupo conhecido anteriormente como *A. bimaculatus* (Garutti & Britski, 2000). Esta espécie possui a descrição mais antiga e é considerada a mais comum do gênero, ambas designadas como complexos de espécies. Dentro deste complexo, a espécie *Astyanax goyacensis*, redescrita recentemente pertence ao complexo *A. bimaculatus* e representa um dos integrantes deste grupo diverso de espécies relacionadas filogeneticamente e similares morfológicamente, levando à necessidade de descrições e caracterizações minuciosas (Garutti & Langeani, 2009).

Diversos autores (Garutti & Britski 2000; Bertaco & Garutti, 2007) descreveram espécies semelhantes à *Astyanax bimaculatus*, que apresentam um padrão de coloração característico: uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada; uma mancha losangular negra no pedúnculo caudal, estendida à extremidade dos raios caudais medianos e duas barras verticais marrons na região umeral. As espécies com esse padrão de coloração pertencem ao complexo de espécies denominado “*Astyanax* grupo

bimaculatus”, constituído por diversas espécies similares e provavelmente muito próximas filogeneticamente (Garutti & Langeani, 2009).

A diversidade cariotípica tem sido amplamente estudada em peixes neotropicais e denota tendências evolutivas distintas para os diferentes táxons. Arttoni et al. (2009) reconhecem que para maiores inferências sobre a história evolutiva dos peixes neotropicais é necessário considerar não só o estado atual do cariótipo, mas o cenário geológico em que as espécies se inserem e se distribuíram, assim como aspectos da biologia das espécies e o tempo evolutivo.

1.1.5 Cromossomos B

Os cromossomos B ou supranumerários representam uma porção extra do complemento cromossômico que são adicionais ao conjunto normal de cromossomos chamados de cromossomos A (Houben et al., 2014). Eles exibem um padrão de herança não-mendeliano e tem sido encontrado em várias espécies de animais, plantas e fungos, mas ainda permanecem como um mistério evolutivo desde sua descoberta, há mais de um século (Houben et al., 2014).

A presença destes cromossomos adicionais ao complemento padrão tem sido amplamente estudada em diversos grupos de animais e vegetais que o apresentam. Eles se caracterizam por serem na sua grande maioria heterocromáticos e compostos por sequências de DNA repetitivos, suportando a ideia que esses cromossomos são não-codificantes, porém alguns B já mostraram a presença de genes ativos. O tamanho deles varia desde microcromossomos ao maior do complemento (Camacho et al., 2000; Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012).

Eles não são necessários ao desenvolvimento normal e vida dos indivíduos e não estão presentes em todos os indivíduos de uma espécie, no entanto, foram encontrados efeitos destes na frequência de quiasmas, pareamento cromossômico, composição nuclear, desenvolvimento, morfologia externa, atividade nucleolar (Jones & Rees, 1982) e regulação da expressão de genes estruturais (Camacho et al., 2000; Jones & Rees, 1982).

Cromossomos B estão presentes em 15% das espécies de Eucariotos e, apesar de serem considerados elementos dispensáveis e parasitas do genoma, alguns estudos têm proposto uma importância funcional relevante a esses cromossomos (Palestis et al., 2004). Dentre as espécies que possuem cromossomos supranumerários, *Astatotilapia latifasciata* é um ciclídeo africano que possui de 1 a 2 cromossomos B em aproximadamente 30% dos indivíduos. Nesta espécie foi encontrada uma sequência de DNA repetitivo espalhado por todo o cromossomo B que possui regiões de identidade com sequências dos genomas e transcriptomas das espécies de ciclídeos *Metriaclicha zebra*, *Astatotilapia burtoni* e *Oreochromis niloticus*. Esta sequência de DNA não apresentou similaridade a nenhum tipo de elemento repetitivo ou sequência codificante de proteína já conhecidos, sugerindo tratar-se de uma sequência que está sendo transcrita em RNA não-codificante, denominada de BncDNA (Valente et al., 2014).

A origem dos cromossomos supranumerários ainda é controversa, e várias teorias têm surgido, como a origem a partir do complemento padrão (Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006; Oliveira et al., 2012; Santos et al., 2013). Outras teorias contrastam a essa e propõem que os cromossomos B possuem origem heteróloga. Na primeira, hipótese de origem intra-específica (Jamilena et al., 1994; Jamilena et al., 1995; Houben et al., 1996; Peppers et al., 1997; Cabrero et al., 1999; Camacho et al., 2000), os cromossomos B surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. Por exemplo, um cromossomo B poderia se originar do próprio conjunto polissômico dos cromossomos A, a partir de fragmentos cêntricos resultantes da fusão de cromossomos A ou da amplificação da região paracentromérica de fragmentos de cromossomos A. Na segunda hipótese, da origem interespecífica (Camacho et al., 2000; Perfectti & Werren, 2001), os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização.

Dada a presença de DNA repetitivo e retrotransposons, há indicações sugerindo que os peixes abrigam a mais ampla diversidade de classes de elementos transponíveis (Volf et al., 2003).

A teoria mais contundente propõe que os cromossomos B teriam originado a partir da formação de isocromossomos (Mestriner et al., 2000; Néo

et al., 2000; Moreira-Filho et al., 2004). Esta hipótese é baseada na presença de bandas heterocromáticas intersticiais no braço longo do par 24, o qual após a formação do isocromossomo acredita-se ter originado sítios As51 simétricos em relação ao centrômero em ambos os braços do cromossomo B (Mestriner et al., 2000).

Análises moleculares dos cromossomos B revelaram que eles são compostos de DNA satélites, os quais são consistentes com sua natureza heterocromática. As evidências sobre os isocromossomos B são baseadas no padrão de bandamento C e na formação de anéis univalentes, onde novas mutações do DNA em um braço do cromossomo B espalharam-se para outros braços, aumentando a heterocromatinização e diversificação molecular em relação ao complemento padrão (Moreira-Filho et al., 2004; Vicari et al., 2011).

Pesquisas de mapeamento físico mostraram que o B possui sequências de DNA repetitivo em maior quantidade que os cromossomos do complemento A (Houben et al., 2001; Peng et al., 2005; Vicari et al., 2011).

Yoshida et al. (2011) usaram B microdissectados de *Lithochromis rubripinis* como sondas cromossômicas e detectaram homologia do cromossomo B entre 11 ciclídeos do Lago Victória. Segundo os autores, os cromossomos B são considerados entidades que se perpetuam pela existência de mecanismos que aumentam sua taxa de transmissão, sem prover nenhuma vantagem seletiva aos indivíduos que os possuam.

Além das suposições relatadas, ocorrências como: derivação dos autossomos, mecanismos epigenéticos como metilação, silenciamento gênico relacionado ao empacotamento da cromatina, heterocromatinização, acúmulo de DNA repetitivo e transposons são hipóteses utilizadas para explicar a origem, frequência e evolução dos cromossomos B. O rDNA é um gene que codifica RNAs ribossômicos e, como um cluster de unidades repetitivas, são visualizados como constrição secundária (regiões organizadoras de nucléolo ou RONS). A origem e evolução do cromossomo B pode ser atribuída ao rDNA, sugerindo que as RONS são propensas a quebras cromossômicas e isto pode prover um mecanismo através do qual o cromossomo B é gerado (Ruiz-Esteves et al., 2012; Camacho et al., 2000; Valente et al., 2014).

Segundo Oliveira et al. (2009), quase todas as informações relativas aos cromossomos supranumerários, vieram de peixes coletados em áreas afetadas

pela poluição ou construção de represas, ou ainda, áreas sujeitas a uma grande mudança na temperatura e volume da água, que podem provocar estresse ao peixe. Os autores sugerem que os cromossomos B são co ou bi-produtos de um estresse ao qual o peixe está sujeito, originados por alterações dos cromossomos do complemento A e que foram mantidos nas populações como um polimorfismo cromossômico. Neste trabalho, essa hipótese foi testada com populações de regiões atingidas por construção de represas e o surgimento de ambiente modificado.

Os cromossomos supranumerários podem atingir uma frequência extremamente alta em populações naturais, dependendo do grau em que as espécies podem tolerá-los e do mecanismo de acúmulo necessário, caso contrário o seu aumento só pode ser explicado pelo efeito benéfico aos hospedeiros (Camacho et al., 2000).

Os dois modelos aceitos de evolução dos B explicam sua manutenção em populações naturais, são eles, o modelo heterótico e o modelo parasítico ou egoísta. Ambos propostos por White em 1973 e confirmados em trabalhos posteriores. No modelo heterótico, os cromossomos B seriam mantidos graças às vantagens adaptativas que conferem aos seus portadores quando se encontram em números baixos. Já no modelo parasítico proposto o acúmulo do B se deve a mecanismos próprios de permanência na população, o que aumenta a sua frequência e seu efeito nos portadores, apresentando-se como elementos parasitas (Camacho et al., 2000; Néó et al., 2000).

Outra possibilidade de surgimento do B constatado em estudos populacionais de gafanhotos mostra que a condição parasítica do B pode ser neutralizada pela evolução dos genes do complemento A que suprimem o B (Camacho et al., 1997; Johnson, 1997).

Desta forma, os cromossomos B são considerados como entidades que se perpetuam com a existência de mecanismos que aumentam sua taxa de transmissão, sem fornecer aparentemente qualquer vantagem aos indivíduos que o carregam. Valente et al. (2014) encontraram milhares de sequências duplicadas do cromossomo B de praticamente todos os cromossomos do cariótipo ancestral e propõem que o proto-B de *Astatotilapia latifasciata* tenha se formado antes da divisão das principais linhagens de ciclídeos do lago Victória e foram mantidos apesar da rápida especiação deste grupo. A

manutenção do B em diversas espécies sugere que ele foi adquirido por mecanismos especiais de segregação e manutenção.

Cromossomos supranumerários tem sido relatados em populações do complexo *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho et al., 2004). Nesta espécie, o B é um metacêntrico grande, com tamanho e forma correspondente ao par 1 do complemento A (Salvador & Moreira-Filho, 1992).

Outros fatores associados à presença do B foram observados por alguns autores que relacionam a quantidade de B com a diferença de altitude, comprovando que córregos de cabeceira, onde as populações se encontram isoladas, constituem um ambiente mais apropriado para o aumento deste elemento. Já nas populações de menor altitude, onde as populações encontram-se no limite de sua distribuição, os B estão ausentes. Além disso, a frequência do B foi maior nas fêmeas o que pode ser devido uma maior mortalidade nos machos ocasionada pelos B (Souza & Moreira-Filho, 1995; Vicente et al., 1996; Porto-Foresti et al., 1997; Néo et al., 2000; Castro et al., 2014).

1.1.6 Presença de Cromossomos B no gênero *Moenkhausia*

Moenkhausia Eigenmann, 1903 foi redefinida por Eigenmann (1917) e é um dos gêneros mais crípticos em Characidae e inclui espécies com uma combinação de caracteres morfológicos como dentes pré-maxilares em duas linhas, o interior com cinco dentes, linha lateral completa e nadadeira caudal escavada. Até o momento, é representado por 75 espécies válidas amplamente distribuídas na região Neotropical, da Argentina à Venezuela, do Peru ao Chile (Lima et al., 2003; Eschmeyer, 2014).

Moenkhausia pertence ao grupo de pequenos caracídeos que vivem em córregos, listado como *Incertae Sedis* juntamente com outros 88 gêneros da subfamília Tetragonopterinae (Reis et al., 2003).

Segundo Mirande (2010) o gênero não é considerado monofilético e algumas espécies estão relacionadas com outros gêneros, por exemplo, *M. georgiae* Géry com *Tetragonopterus* Géry, 1977.

Os cromossomos B são frequentes na subfamília Tetragonopterinae com diferenças relacionadas ao número, tamanho, morfologia e distribuição,

diferente de outras espécies de peixes que exibem baixa frequência e ocorrência esporádica (Oliveira et al., 2009), vários microcromossomos tem sido encontrado em *M. sanctaefilomenae* e *M. intermedia* e em certos casos, relacionados ao sexo (Portela et al., 1988; Foresti et al., 1989; Portela-Castro et al., 2001; Portela-Castro & Julio Jr. 2002; Dantas et al., 2007).

As técnicas que identificam as Ag-RONs (Regiões Organizadoras de Nucléolo) pela impregnação do nitrato de prata, permite a obtenção de informações relevantes sobre o conjunto cromossômico das espécies, sendo por isso consideradas um marcador cromossômico. O nucléolo corresponde às regiões onde se localizam as sequências de DNAr, responsáveis pela transcrição do RNAr. Os genes ribossomais são considerados repetitivos, o que significa que existe uma série de unidades de transcrição arranjadas em tandem, separadas umas das outras por segmentos espaçadores (Kasahara, 2009).

Em *M. sanctaefilomenae* Foresti et al. (1989) encontraram uma variação de 1 a 8 microcromossomos em ambos os sexos, ao passo que nesta mesma espécie Portela-Castro et al., (2001) encontraram de 0 a 2 cromossomos B, presentes apenas nos machos. A análise das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RON) através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, confirmou a localização destas sequências ativas também sobre os cromossomos B (Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012). Esta é uma condição não usual em peixes e merece ser mais amplamente avaliada em outras espécies do gênero *Moenkhausia*.

Nas espécies deste gênero, são encontradas variações no padrão de Ag-RONs, onde há casos de Ag-RONs múltiplas (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007) bem como simples (Portela-Castro & Júlio Jr. 2002).

Tem sido relatado nos microcromossomos B de *Moenkhausia* certo polimorfismo no padrão de banda C, o qual pode ser caracterizado como parcialmente, totalmente heterocromático, bem como eucromático, indicando composição distinta do DNA entre estes microcromossomos, especialmente DNA repetitivo (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012). De acordo com os autores, os Bs mostram um importante papel na organização do genoma de *M. sanctaefilomenae* de grande utilidade em análises para determinar se a frequência do cromossomo B que expressa RON

está mudando com o tempo e como isso pode influenciar a atividade cromossômica das RONS do complemento A (Foresti et al., 1989).

A análise de três amostras de *M. oligolepis* realizada por Benine e colaboradores revelaram que estas apresentam distâncias genéticas elevadas e pertencem a grupos monofiléticos distintos, sugerindo que esta espécie corresponda a um complexo de espécies e não uma única espécie. Segundo Benine et al (2004), *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae* pertencem ao grupo *Moenkhausia grandisquamis*.

As análises mostraram que há seis grupos monofiléticos apoiados por valores iguais ou superiores a 99%. Três grupos monofiléticos correspondendo às espécies *M. sanctaefilomenae*, *M. oligolepis* e *M. forestii* e três grupos monofiléticos correspondendo às diferentes amostras de *M. oligolepis* de acordo com a árvore de máxima parcimônia baseada no gene mitocondrial da Citocromo Oxidase, representado abaixo na Figura 2 (Benine et al., 2009).

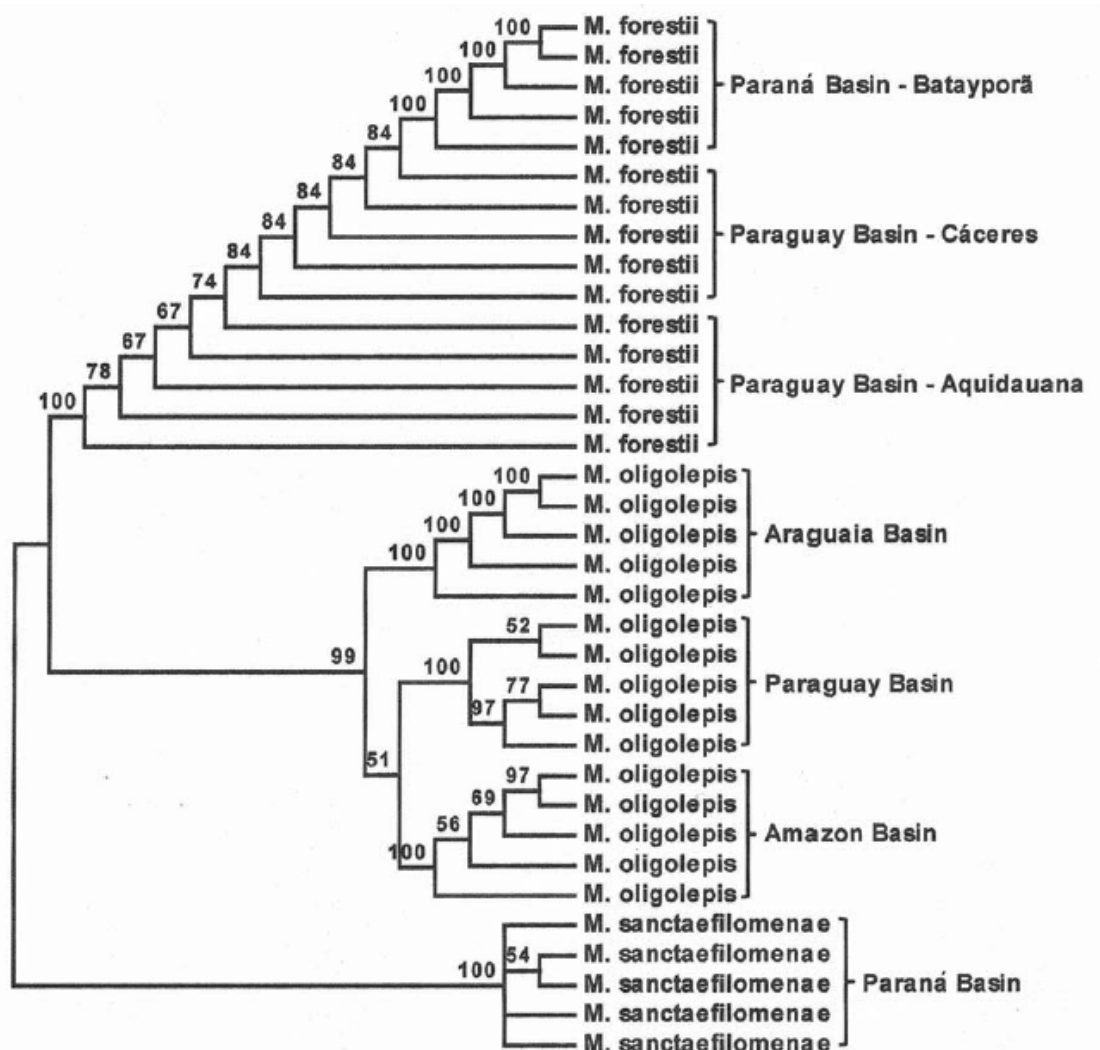


Figura 2. Consenso de máxima parcimônia para o gene mitocondrial da citocromo oxidase nas espécies de *Moenkhausia* (Benine et al., 2004).

Um grande número de espécies de *Moenkhausia* tem sido descritas (Benine, 2002; Benine et al., 2004; Bertaco & Lucinda, 2006; Benine et al., 2007; Lucinda et al., 2007b; Benine et al., 2009; Zanata et al., 2009; Marinho, 2010; Marinho & Langeani, 2010; Sousa et al., 2010; Bertaco et al., 2011a; Bertaco et al., 2011b; Pastana & Dagosta, 2014). Em estudo recente (Mariguela et al., 2013), 29 espécies de *Moenkhausia* foram estudadas baseadas na análise de dois genes mitocondriais e três genes nucleares, onde todas as espécies pertenceram ao mesmo clado e encontraram-se distribuídas em cinco grupos monofiléticos juntamente com outros gêneros diferentes, comprovando ser *Moenkhausia* um grupo polifilético, corroborando com os resultados de Oliveira et al. (2011), o que reforça a necessidade de uma extensiva revisão do grupo. Neste mesmo estudo, as espécies *Moenkhausia cosmops*, *M. oligolepis*, *M. sanctaefilomenae*, *M. forestii*, *M. australe* and *Bario steindachneri* pertenceram ao mesmo grupo dentro do Clado 5, comprovando dados anteriores de maior proximidade entre estas espécies (Figura 3) (Costa, 1994; Mirande, 2009, 2010; Mariguela et al., 2013).

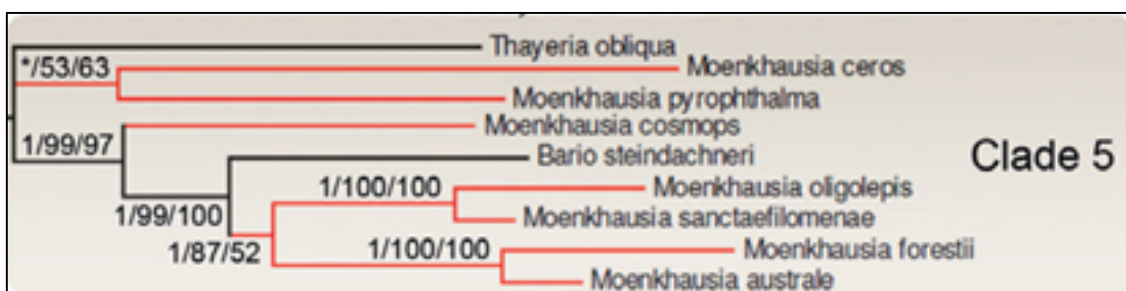


Figura 3 – Representação da relação entre linhagens da família Characidae representando as espécies de *Moenkhausia* Clado 5 (Mariguela et al., 2013).

1.1.7 Bandamentos Cromossômicos

Os estudos de Citogenética comparativa são comumente baseados em métodos de bandamento convencional, os quais se mostram limitados em dar

respostas contundentes quando há entre as espécies estudadas rearranjos ou genomas divergentes (Martins & Vicari, 2012).

Vários métodos tem sido utilizados para analisar a diversidade genética entre populações. A análise da similaridade nucleotídica pode fornecer dados para estudos de relações evolutivas, sendo possível para tal, a escolha de genes mitocondriais e nucleares. Os dados moleculares, particularmente, a sequência nucleotídica, oferecem uma imensidade de informações, que ultrapassa a extensão do vasto conhecimento taxonômico (Page & Holmes, 1998).

Nos últimos 15 anos, as pesquisas de citogenética de peixes passaram a contar com a introdução das tecnologias de hibridização de ácidos nucléicos, suportadas pela facilidade no isolamento e sequenciamento de genes, sequências específicas de DNA ou mesmo genomas inteiros, as quais se tornaram bastante promissoras, possibilitando um conhecimento mais refinado da estrutura molecular dos cromossomos, podendo ser também aplicada em estudos citogenéticos evolutivos no estudo dos cromossomos sexuais, cromossomos B e no melhor entendimento das relações existentes entre espécies e populações (Martins & Vicari, 2012).

O DNA ribossômico (rDNA) é organizado em duas famílias gênicas, sendo elas a sequência que codifica o precursor rDNA 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S, geralmente referidos como rDNA 5S e 45S, respectivamente. A sua localização pode ser determinada por hibridação *in situ* com sondas específicas onde os sítios das RONS podem ser detectados independente da sua atividade transcricional na intérfase anterior. Os dois conjuntos de iniciadores têm sido aplicados com muita eficiência, o primeiro deles permite a obtenção de muitas cópias das unidades repetitivas completas que transcrevem o RNAr 5S e o segundo permite a amplificação de um fragmento do DNA que transcreve o RNAr 18S. Em peixes, a localização dos cístrons de rDNA é usado como um importante marcador cromossômico, útil em estudos de evolução, bem como na organização do genoma, revelando grupos que caracterizam padrões de RONS múltiplas e simples e até sua localização em cromossomos sexuais. (Artoni & Bertollo, 2002; Martins, 2006)..

O rDNA 5S apresenta-se repetido de centenas a milhares de vezes no genoma, formando uma família multigênica que é responsável pela codificação

do RNA ribossômico 5S (rRNA 5S). Cada repetição do rDNA 5S contém uma região conservada de 120 pares de base (pb), que codifica o rDNA 5S, e um segmento de DNA espaçador não transcrito (NTS) altamente variável. Tais repetições apresentam dinamismo no genoma e a ausência de pressão de seleção sobre os NTSs permite que estes segmentos de DNA tenham uma alta taxa de acúmulo de mutações. Isto faz dos NTSs excelentes marcadores na identificação de diferenças entre entidades biológicas que divergiram recentemente na sua história evolutiva (Martins, 2006).

A obtenção de sondas cromossômicas de regiões específicas ou de um cromossomo inteiro (WCP: Whole Chromosome painting), provenientes de braços cromossômicos ou bandas cromossômicas, podem ser obtidas pelo método de microdissecção e posterior amplificação por *Degenerate Oligonucleotide Primed – Polymerase Chain Reaction* (DOP-PCR) (Telenius et al., 1992). O desenvolvimento de primers universais que permitem a amplificação de grandes regiões de DNA através de DOP-PCR (DNA Degenerate Oligonucleotide-Primed) foi a condição primordial para o desenvolvimento desta técnica. Na síntese de sondas para WCP é feita, em um primeiro passo, uma amplificação inespecífica utilizando-se primers degenerados. Em um segundo passo tem-se uma amplificação específica e, finalmente, o DNA é marcado para funcionar como uma sonda de FISH (Martins & Vicari, 2012).

Com o propósito de investigar a diferenciação cromossômica entre populações da família Characidae, alvos de diversos problemas de classificação além da presença de cromossomos B, analisou-se diferentes populações dos gêneros *Astyanax* e *Moenkhausia*.

1.1.8 Referências Bibliográficas

Abelini E, Martins-Santos IC & Fernandes CA (2014) Cytogenetic analysis in three species from genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes) with a new occurrence of B chromosome in *Astyanax paranae*. *Caryologia* 67(2):160-171.

Agostinho AA, Pelicice FM & Gomes LC (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz J Biol* 68:1119-1132.

Artori RF & Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89:15-19.

Artori RF, Vicari MR, Almeida MC, Moreira-Filho O & Bertollo LAC (2009) Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19(3):393-401.

Baptista GMM & Araújo Neto MD (1994) O Processo de Eutrofização Artificial no Lago Paranoá. *Geonomos*, 2(2): 31-39.

Benine RC (2002) *Moenkhausia levidorsa*, a new species from Rio Aripuanã, Amazon Basin, Brazil (Characiformes: Characidae) *Ichthyol Explor Freshwaters* 13:289-294.

Benine RC, Castro RMC & Sabino J (2004) *Moenkhausia bonita*: A New Small Characin Fish from the Rio Paraguay Basin, Southwestern Brazil (Characiformes: Characidae). *Copeia* 1:68–73.

Benine RC, Castro RMC & Santos ACA (2007) A new *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Ostariophysi: Characiformes) from Chapada Diamantina, rio Paraguaçu Basin, Bahia, Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 5(3):259-262.

Benine RC, Mariguela TC & Oliveira C (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology* 7(2):161-168.

Bertaco V & Lucinda PHF (2006) *Moenkhausia pankilopteryx*, new species from rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes, Characidae). *Zootaxa* 1120:57–68.

Bertaco VA & Garutti V (2007) New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 5(1): 25-30.

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

Bertaco VA & Lucinda PHF (2005) *Astyanax elachylepis*, a new characid fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei: Characidae). Neotropical Ichthyology 3(3):389-394.

Bertaco VA, Jerep FC & Carvalho FR (2011a) New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi: Characidae) from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. Neotropical Ichthyology 9(1):57-63.

Bertaco VA, Jerep FC & Carvalho FR (2011b) A new characid fish, *Moenkhausia aurantia* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. Zootaxa 2934:29–38.

Bertaco VA; Carvalho FR & Jerep FC (2010) *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. Neotropical Ichthyology, 8(2):265-275.

Cabrero J, López-Léon MD, Bakkali M, Camacho JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 83:435-439.

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

Camacho JPM, Shaw MW, López-Léon MD, Pardo MC & Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. The American Naturalist 149:1030–1050.

Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta OA, Santos MH, Nogaroto V, Vicari MR, Almeida MC & Artoni RF (2014) Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). Neotropical Ichthyology 12:429-438.

Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: Caramashi EP, Mazzoni R e Peres-Neto PR (eds) Ecologia de peixes de riachos. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, 139-155.

Cioffi MB, Camacho JPM & Bertollo LAC (2011a) Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. Cytogenet Genome Res 132:188–194.

Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D & Bertollo LAC (2012) The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. Molecular Cytogenetics 5:1-7.

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V & Bertollo LAC (2011b) Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. Genetica 139:1065-1072.

Costa WJEM (1994) Description of two new species of the genus *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the central Brazil. Zool Anz 232:21–29.

Dantas ESO, Vicari MR, Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Artoni RF (2007) Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). The nucleus 50(3):505-518.

Diniz D, Moreira-Filho O & Bertollo LAC (2007) Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). Genetica 1: 85-91.

Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC & Artoni RF (2007) Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. Neotropical Ichthyology 5:37-44.

Eschmeyer WN & Fricke R (eds.) (2014) Catalog of Fishes electronic version accessed 01/09/2014. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acessado em 01 de setembro de 2014.

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

Ferreira ME & Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen 220.

Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, Oliveira C & Foresti F (2012) Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. CompCytogen 6(1):29–40.

Ferreira-Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF & Moreira-Filho O (2009) Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). Genetics and Molecular Biology 32(4):792 – 796.

Foresti F, Almeida-Toledo LF & Toledo-Filho SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica 79:107-180.

Futuyma D (1997) Biologia evolutiva. 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.

Garutti V & Britski HA (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Séries Zoologia, Porto Alegre 13: 65-88.

Garutti V & Langeani F (2009) Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 7(3):371-376.

Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F & Porto-Foresti F (2008) First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). Genet Mol Biol 31:275–278.

Hashimoto DT, Voltolin TA, Paes ADNVA, Foresti F, Bortolozzi J & Porto-Foresti F (2012) Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). Comparative Cytogenetics 6(2):141–151.

Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S & Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. Cell Mol Life Sci 71:467–478.

Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN, Forster JW (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). Chromosoma 105:97-103.

Houben A, Verlin D, Leach CR & Timmis JN (2001) The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. Chromosoma 110:451–459.

Ingenito LFS & Duboc LF (2014) A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southern Brazil. Neotropical Ichthyology, 12(2):281-290.

Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruíz-Rejón M, Ruíz-Rejón C, Parker JS (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. Chromosoma 104:113-120.

Jamilena M, Ruíz-Rejón C, Ruíz-Rejón M (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. J. Cell. Sci 107:703-708.

Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH & Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 54:498-511.

Jesus CM, Garutti Jr PM, Valentini SR & Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genetica 118:25-32.

Johnson NA (1997) Selfish genetic elements: long-range dynamics predicted by non-equilibrium models. Trends Ecol. Evol. 12:376–378.

Jones RN & Rees H (1982) B Chromosome. Academic Press, London.

Justi AJ (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces-Characidae, em três bacias hidrográficas. MSc Thesis, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

Kantek DLZ, Noleto RB, Maurutto FAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho, O & Cestari MM (2008) Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguaçu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. Journal of Fish Biology 73:2012-2020.

Kavalco KF, Brandão KO & Pazza R (2009) A new species complex within the genus *Astyanax*? Genetics and Molecular Biology 483: 477-483.

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, da Silva JF P, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C & Lucinda PHF: In Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central

America: Genera *incertae sedis* in Characidae. Edited by Reis RE, Kullander SE, Ferraris CJ Jr. Porto Alegre, RS, Brazil: EDIPUCRS; 2003:106–169.

Lowe-McConnell RH (1969) Speciation in tropical freshwater fishes. Biol J Linnean Soc 1: 51-75.

Lucena CAS, Castro JB & Bertaco VA (2013) Three new species of *Astyanax* from drainages of southern Brazil (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 11(3):537-552.

Lucinda PHF, Freitas IS, Soares AB, Marques EE, Agostinho CS & Oliveira RJ (2007a) Lists of Species. Fish, Lajeado Reservoir, rio Tocantins drainage, State of Tocantins, Brazil. Check List 3(2):70-83.

Lucinda PHF, Malabarba LR & Benine RC (2007) On a new species of the genus *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi: Characidae). Zootaxa 1525: 61–68.

Luis D, Kantek Z, Cipriano RR, Abilhoa V, Artoni RF & Cestari MM (2007) Cytotaxonomic and Evolutionary Considerations about Karyotypic Data of Fishes from the Iguaçu River Basin in South of Brazil. Brazilian Archives of Biology Tchnology 50: 793-802.

Malabarba MCSL (2004) Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 2(4):167-204.

Maluf RS & Riegel M (2011) Citogenética Humana. Artmed, Porto Alegre, 334.

Mariguela TC, Benine RC, Abe KT, Avelino GS & Oliveira C (2013) Molecular phylogeny of *Moenkhausia* (Characidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA evidence. J Zoolog Syst Evol Res 51:327-332.

Marinho MMF (2010) A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the rio Xingu basin, Brazil. Neotropical Ichthyology 8(3):655-659.

Marinho MMF & Langeani F (2010) *Moenkhausia celibela*: a new species from the Amazon basin, Brazil (Characiformes: Characidae). Journal of Fish Biology 77: 879-889.

Martins C (2006) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Fish Cytogenetics. Eds: Pisano E; Ozouf-Costaz C; Foresti, F; Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA. 2006.

Martins C & Vicari MR. Hibridização *in situ* em Cromossomos de Peixes. In: Guerra M (Org.) Citogenética Molecular: Protocolos Comentados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética 59-87. 2012.

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

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

Miranda TB & Jones PA (2007) DNA Methylation: The Nuts and Bolts of Repression. Journal of cellular physiology 213:384-390.

Mirande JM (2009) Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). Cladistics 25:1–40.

Mirande JM (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. Neotropical Ichthyology 8(3):385-568.

Moreira-Filho O (1989) Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax altiparanae* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). Tese Doutorado, Programa de Pós Graduação Ecologia e Recursos Naturais, UFSCAR, São Carlos, SP, 135p.

Moreira-Filho O & Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Braz J Genet 14:331-357.

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

Nelson JS (2006) Fishes of the World. John Wiley and Sons, New Jersey.

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

Nirchio M & Oliveira C (2006) Citogenética de Peces. Universidad de Oriente, Venezuela 212p.

Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP & Castro RMC (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. BMC Evolutionary Biology 11:275.

Oliveira C, Foresti F & Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. Fish Physiol Biochem 35:81-100.

Oliveira SG, Cabral-de-Mello DC, Moura RC & Martins C (2013) Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in *Scarabaeinae coleopterans*. Molecular Cytogenetics 6:54.

Oliveira SG, Moura RC & Martins C (2012) B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. BMC Genetics 13:96.

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

Page RDM & Holmes EC (1998) *Molecular Evolution: a phylogenetic approach*. Malden, MA, USA: Blackwell Science Publishing, 346p.

Palestis BG, Trivers R, Burt A & Jones RN (2004) The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenet Genome Res* 106:151-158.

Pamponet VCC, Carneiro PLS, Affonso PRAM, Miranda VS, Júnior JCS, Oliveira CG & Gaiotto FA (2008) A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(4):621-630.

Pastana MNL & Dagosta FCP (2014) *Moenkhausia rubra*, a new species from rio Jurueña, upper rio Tapajós basin, Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 12(2): 389-396.

Pazza R & Kavalco SAF (2007) Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Nucleus* 50:519-543.

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

Pazza R, Kavalco SAF, Penteado PR, Kavalco KF & Almeida-Toledo LF (2008) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* 72(8): 2002-2010.

Peng SF, Lin YP & Lin BY (2005) Characterization of AFLP sequences from regions of maize B chromosome defined by 12 B-10L translocations. *Genetics* 169:375–388.

Peppers JÁ, Wiggins LE, Baker RJ (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Res* 5:475-479.

Peres WAM, Bertollo LAC, Buckup PA, Blanco DR, Kantek DLZ & Moreira-Filho O (2012) Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river

transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). Rev Fish Biol Fisheries 22:519–526.

Perfectti F, Werren JH (2001) The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. Evolution 55:1069-1073.

Portela ALBS, Galetti Jr PM & Bertollo LAC (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). Rev Brazil Genet 11:307-316.

Portela-Castro ALB & Júlio Jr HF (2002) Karyotype Relationships among Species of Subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomy and Evolution Aspects. Cytologia 67:329-336.

Portela-Castro ALB, Júlio Jr HF & Nishiyama PB (2001) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. Genetica 110:277-283.

Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL & Foresti F (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. Braz J Genet 20:377-380.

Reis RE, Kullander SO & Ferraris CJ Jr (2003) Check list of the freshwater fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre – RS 742p.

Rosa R, Vanzela AL, Rubert M, Martins-Santos IC & Giuliano-Caetano L (2009) Differentiation of Y chromosome in the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Cytogenet Genome Res 127:54–60.

Ruíz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J & Camacho JPM (2012) B Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. PLoS ONE 7(5): e36600.

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

Santos LP, Castro JP, Francisco CM, Vicari MR, Almeida MC, Goll LG, Morelli S & Artoni RF (2013) Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, *incertae sedis*): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics* 6:1-5.

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

Sousa LM, Netto-Ferreira AL & Birindelli JLO (2010) Two new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Serra do Cachimbo, Pará, Northern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 8(2):255-264.

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

Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD & Martins C (2014) Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses. *Mol Biol Evol* 31: 2061-72.

Vari RP & Castro RMC (2007) New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* 1:150-162.

Vicari MR, Pistone HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM & Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH *Genetica* 139:1073–1081.

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

Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C & Fischer C (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends Genet* 19: 674-678.

White MJD. 1973. *Animal cytology and evolution*. London: Cambridge University Press.

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T & Cioffi MB (2014) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *Plos One* 9:1-7.

Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y & Okada N (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genet*. 7:1-10.

Zanata AM, Birindelli JLO & Moreira CR (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Rio Xingu and Rio Tapajós basins, Brazil, with comments on a putative case of polymorphic Batesian mimicry. *Journal of Fish Biology* 75: 2615-2628.

CAPÍTULO II

SHORT REPORT

<http://www.molecularcytogenetics.org/content/6/1/48>

Aceito em 08 de Outubro de 2013.

1.2 Occurrence of the B microchromosome in *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis)

Luana Pereira dos Santos,¹ Jonathan Pena Castro,² Carine de Mendonça Francisco,¹ Marcelo Ricardo Vicari,² Mara Cristina de Almeida,² Leonardo Gusso Goll,² Sandra Morelli¹ and Roberto Ferreira Artoni²

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

²Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Avenida Carlos Cavalcanti 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 34 92049967; fax: +55 34 32182203

E-mail address: luanabio3@gmail.com

Abstract

Background: B chromosomes, also known as supernumerary or accessory chromosomes, are additional chromosomes over the standard complement found in various groups of plants and animals. We investigated the presence of, and characterized, supernumerary microchromosomes in *Astyanax goyacensis* using classical and molecular cytogenetic methods.

Findings: Three specimens possessed $2n = 50$ chromosomes ($8m + 26sm + 8st + 8a$), and two specimens contained 1 to 9 additional B microchromosomes varying intra- and inter-individually. Chromosome painting with a B chromosome-specific probe yielded signals for several B microchromosomes, with one exhibiting no markings. Acrocentric chromosomes of the standard complement were also painted. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using ribosomal probes located two chromosome pairs carrying 18S rDNA marked on the short arm, and one pair carrying 5S rDNA with pericentromeric markings. One chromosome was observed in synteny with 18S cistrons.

Conclusion: These data contribute to knowledge of the karyotype evolution, the origin of B chromosomes, and to an understanding of the functionality of rDNA.

Keywords: Supernumerary chromosome, Synteny, 18S rDNA, Microdissection

1.2.1 Background

The B chromosomes, also known as supernumerary or accessory chromosomes, are additional chromosomes over the standard complement and are found in various groups of plants and animals. They are frequently characterized as heterochromatic and do not follow Mendelian principles of segregation. The occurrence of these elements in *Astyanax* has been analyzed and is one of the most striking cytogenetic features of these fish. Their occurrence has been well studied in *A. scabripinnis* [1] and noted in other species [2].

Neotropical fishes are extremely diverse, and *Astyanax* is among those with the greatest variety, with more than 100 known species [3]. This diversity

hinders the identification and taxonomic description of the group, and these fish have been categorized as *incertae sedis* among the Characidae [4]. Species complexes are common in *Astyanax* and are reported for *A. scabripinnis* [5], *A. altiparanae* [6], and *A. fasciatus* [7]. Karyotype variability follows the systematic diversity of *Astyanax*.

Garutti and Langeani [8] recently re-described *Astyanax goyacensis*, highlighting that *A. goyacensis* is a little studied species belonging to the *A. bimaculatus* species complex. The current study describes the karyotype of *A. goyacensis*, in which the presence of supernumerary microchromosomes were identified and characterized using classical and molecular cytogenetic methods.

1.2.2 Results and Discussion

Astyanax goyacensis contained $2n = 50$ chromosomes and a heterochromatic B microchromosome system ranging from 1 to 9. These B microchromosomes share sequences with chromosomes of the standard complement.

Cytogenetic studies have been conducted on several *Astyanax* species. In the present study, the karyotype of *Astyanax goyacensis*, a little studied species with distribution throughout the Tocantins River basin, is described for the first time [8]. The conserved diploid chromosome number ($2n = 50$) is an established characteristic of *Astyanax* belonging to the *bimaculatus* group [9] and is confirmed here for *A. goyacensis*. An asymmetric karyotype characterized by the presence of different morphological types, as often observed in the genus, is described, with a karyotype formula comprising 8m, 26sm, 8st, and 8a (Figure 1A).

Two of the analyzed specimens of *A. goyacensis* possessed from 1 to 9 additional B microchromosomes and vary intra- and inter-individually (Figure 1B, D). The presence of additional chromosomes in *Astyanax* has been reported, particularly in *A. scabripinnis* [2]. As a rule, these chromosomes are large and are sometimes compared to the first pair of A chromosomes [11]. However, cases of *Astyanax* containing the B microchromosome are rare [12-14].

B chromosomes are, in most cases, heterochromatic, which is their most frequently cited cytogenetic characteristic [1]. The B microchromosomes identified in *A. goyacensis* were frequently heterochromatic, although supernumerary euchromatic examples were also noted (Figure 1b). Chromosome painting with a B chromosome-specific probe produced a signal in most B chromosomes along with hybridization signals on chromosomes of the standard complement (Figure 1d). The results suggest that the B chromosomes originated from chromosomes of the standard complement in addition to possessing heterochromatins similar to A chromosomes. Thus, two pairs of acrocentric chromosomes appear to be the most parsimonious candidates (Figure 1d). The development of B chromosomes from A chromosomes has been detected in fish such as *Prochilodus lineatus* [8,15] and in the *Astyanax* genus [16, 17].

The variable number of intra- and inter-individual B chromosomes indicates mitotic instability, with their accumulation reflecting an initial parasitic state of establishment and fixation in *A. goyacensis*. According to Camacho et al. [1], the accumulation of B chromosomes per cell and the variation in number of those chromosomes at the individual and population levels are characteristic of a parasitic state that precedes a more stable state in population oscillatory phenomena.

Multiple nucleolar organizer regions are common among *Astyanax* [18] and were evident in this study regardless of their activity (Figure 1e). Fluorescence in situ hybridization with ribosomal probes identified the location of two chromosome pairs carrying 18S rDNA marked on the short arm and one pair carrying 5S rDNA with pericentromeric markings; one chromosome was visualized in synteny with 18S cistrons (Figure 1f).

The most conserved pattern of the 5S rDNA location in fishes is the interstitial region of a single chromosome pair [19]. A similar finding is expected for *Astyanax* [20], although some species exhibit multiple markings in some chromosome regions [21]. In *A. goyacensis*, only one chromosome exhibits the syntenic marking of 18S and 5S rDNAs, while the homologue exhibits only 5S rDNA marking. A transposition event may have led to this synteny condition. Reciprocal translocation of the short arm and transposon-mediated 18S invasion are hypotheses that should be tested.

1.2.3 Conclusion

A. goyacensis, assessed for its chromosomal complement for the first time, exhibited karyotype features that are shared with other *Astyanax* of the *bimaculatus* group. This provides an additional study model in evolutionary cytogenetics, given the presence of supernumerary microchromosomes and a polymorphic location of the ribosomal DNA multigene families.

1.2.4 Methods

A cytogenetic survey was conducted on 5 specimens (3 female and 2 male) of *A. goyacensis* collected from the Taboquinha stream, a tributary of the Tocantins River basin located in the town of Monte do Carmo in the state of Tocantins, Brazil (S 10° 47' 11.12" and W 48° 13' 16.57"). The specimens were euthanized using the benzocaine, identified, and deposited in the Laboratory of Systematic Zoology, Sagrado Coração University (Universidade Sagrado Coração) under voucher number CZUSC 00102. The study was performed with permission from the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation [Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)] through the authentication code 43852933. Mitotic chromosomes were obtained from cells of the anterior kidney using the air-drying procedure [22]. The chromosome preparations were submitted to conventional Giemsa staining and C banding [23] to determine the diploid number, chromosome morphology, distribution of heterochromatin, and presence of B chromosomes. The chromosome morphology was determined using arm ratios [24], and chromosomes were classified as metacentrics (m), submetacentrics (sm), subtelocentrics (st), and acrocentrics (a).

The microchromosomes B (B-probes) were obtained via microdissection of mitotic metaphase cells from the single specimen that carried only a B microchromosome, using an inverted IX51 microscope (Olympus) equipped with a Transferrman mechanical micromanipulator (Eppendorf). The B

chromosomes were submitted to a degenerated oligonucleotide primer–polymerase chain reaction (DOP-PCR), following the procedure described by [25] with slight modifications [26]. A second amplification reaction was performed using 100 ng of the first PCR product in a final volume of 50 µL. The reaction solution consisted buffer (200 mM Tris, pH 8.4 and 500 mM KCl), 1 × *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 400 µM dNTP, 2 µM DOP primer 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3', and 2 U *Taq* DNA polymerase. The amplification was performed in a thermocycler (Biocycler) using the following program: three minutes at 94°C; 35 cycles of 90 sec at 90°C, 90 sec at 52°C, and 90 sec at 72°C; and a post-cycling extension of 5 min at 72°C.

The B-probe was labeled through the nick translation procedure using digoxigenin-16-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche Applied Science). The PCR mixture consisted of 1 × *Taq* DNA polymerase buffer (Invitrogen); 2 mM MgCl₂; 40 µM dTTP, dGTP and dCTP; 20 µM dATP; 20 µM biotin-14-dATP; 2 µM DOP primer; and 2 U *Taq* DNA polymerase.

The ribosomal probes (18S rDNA and 5S rDNA) were mapped via FISH on the *A. goyacensis* chromosomes. The 18S rDNA probe was labeled with biotin through nick translation using biotin-16-dUTP (Biotin-Nick Translation Mix, Roche Applied Science), and the 5S rDNA probes were labeled through nick translation using digoxigenin-16-dUTP (DIG-Nick Translation Mix, Roche Applied Science).

Chromosome painting with the B-probe and FISH were performed under conditions of high stringency (2.5 ng/µL probe, 50% formamide, 2× SSC, 10% dextran sulfate) following the general procedure described by [27]. Signal detection was conducted with anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) and Avidin-FITC (Sigma) antibodies. The chromosomes were counterstained with DAPI (0.2 µg/mL) in VECTASHIELD® mounting medium (Vector) and analyzed using an epifluorescence microscope (Olympus BX41) coupled with a DP71 imaging system (Olympus).

1.2.5 References

1. Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LWB: **Chromosome B evolution**. *Phil Trans R Soc Lond B* 2000, 355:163–178.
2. Moreira-Filho O, Galetti PM Jr, Bertollo LAC: **B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations**. *Cytogenet Genome Res* 2004, **106**:230-234.
3. Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC: **Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. *Cytologia* 2001, **66**:59–64.
4. Marinho MMF, Lima FCT: ***Astyanax ajuricaba*: a new species from the Amazon basin in Brasil (Characiformes: Characidae)**. *Neotrop Ichthyol* 2009, **7**:169-174.
5. Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, da Silva JF P, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF: In Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America: Genera *incertae sedis* in Characidae. Edited by Reis RE, Kullander SE, Ferraris CJ Jr. Porto Alegre, RS, Brazil: EDIPUCRS; 2003:106–169.
6. Moreira-Filho O, Bertollo LAC: ***Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex**. *Rev Bras Genet* 1991, **14**:331-357.
7. Fernandes CA, Martins-Santos IC: **Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)**. *Hereditas* 2004, **141**:328-332.

8. Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC, Vicari MR, Bertollo LAC: ***Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil).** *Neotrop Ichthyol* 2006, **4**:197–202.
9. Garutti V, Langeani F: **Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae).** *Neotrop Ichthyol* 2009, **7**:371-376.
10. Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira Filho O, Toledo Filho SA: **Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability.** *Caryologia* 1983, **36**:235-244.
11. Salvador LB, Moreira-Filho O: **B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).** *Heredity* 1992, **69**:50-56.
12. Rocon-Stange EAR, Almeida-Toledo LF: **Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes).** *Rev Bras Genet* 1993, **16**:601-615.
13. Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC: **Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).** *Hereditas* 1997, **127**:249-253.
14. Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F: **First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae).** *Genet Mol Biol* 2008, **31**:275–278.
15. Jesus CM, Moreira-Filho O: **Chromosomal location 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae).** *Caryologia* 2003, **56**:281-287.
16. Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM: **Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* an isochromosome.** *Heredity* 2000, **85**:1–9.

17. Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF: **New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH.** *Genetica* 2011, **139**:1073 – 1081.
18. Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: **Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity.** *Genetica* 2001, **110**:55–62.
19. Martins C, Galetti PM Jr: **Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?** *Genetica* 2001, **111**:439–446.
20. Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O: **Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, and Characidae).** *Genetica* 2005, **123**:211–216.
21. Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: **Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences.** *Genet Mol Biol* 2008, **31**:173–179.
22. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae).** *Rev Bras Genet* 1978, **1**:103-120.
23. Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp Cell Res* 1972, **75**:304-306.
24. Howell WM, Black DA: **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.** *Experientia* 1980, **36**:1014–1015.
25. Levan A, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, **52**:201-220.

26. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A: **Degenerate oligonucleotide primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer.** *Genomics* 1992, **13**:718–725.
27. Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF: **Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives.** *J Fish Biol* 2010, **76**:1094-1116.
28. Pinkel D, Straume T, Gray JW: **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc Natl Acad Sci* 1986, **83**:2934–2938.

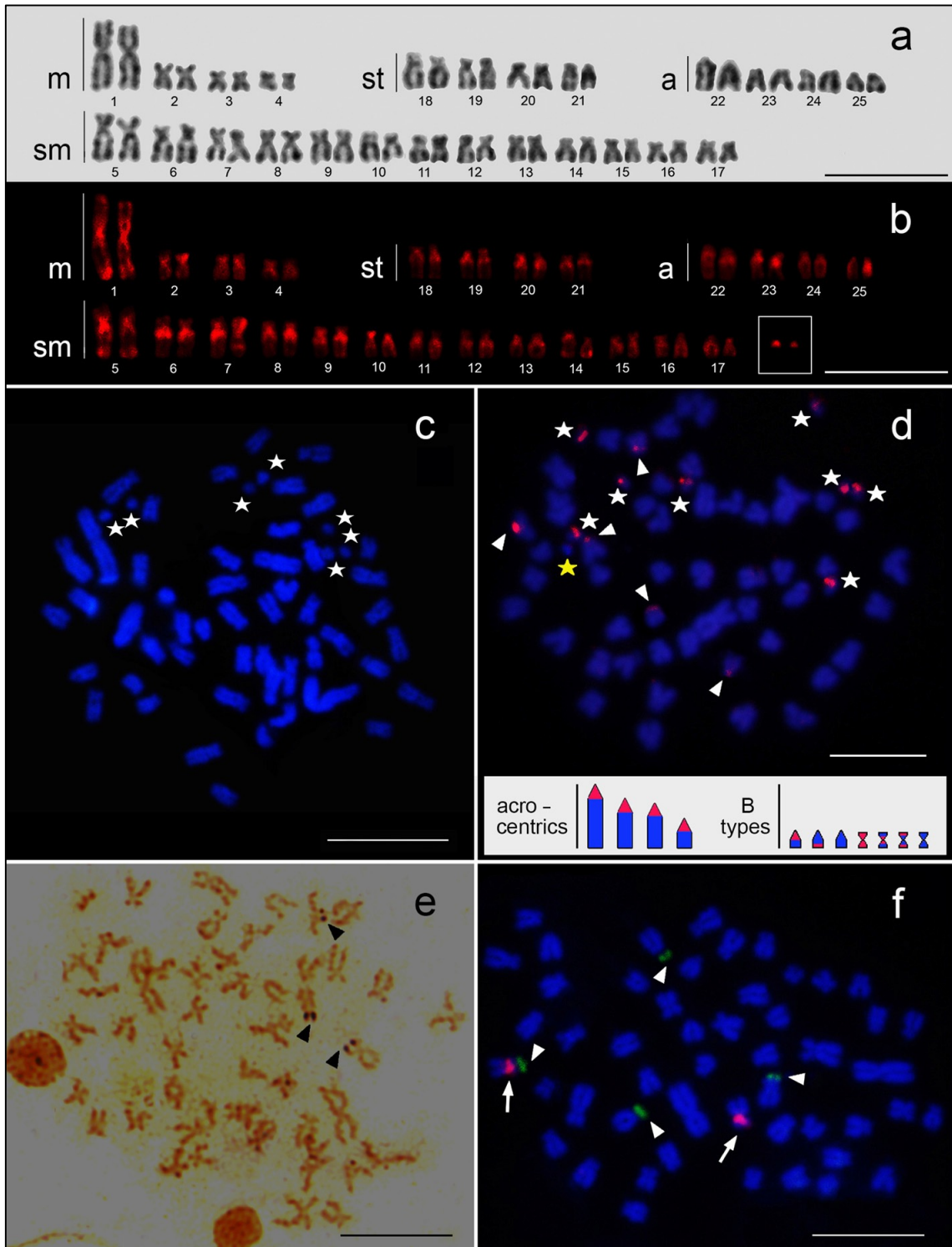


Figure 1 *Astyanax goyacensis* chromosomes showing (a) Giemsa-stained standard karyotype; (b) C-banding karyotype; (c) the mitotic metaphases (DAPI staining) show the B chromosomes (stars); (d) FISH with B chromosome-specific probe (arrowheads for autosomes and stars for the B microchromosome). In detail a haploid idiogram of the acrocentric chromosomes and the types of B

microchromosomes. Red markings indicate the location of the B chromosome-specific probe; **(e)** Ag-NORs bearing chromosomes (arrowheads); **(f)** FISH with 18S rDNA (green, arrowheads) and 5S rDNA (red, arrow) probes. The scale bars: 10 μm .

CAPÍTULO III

1.3 O cariótipo de *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864): aspectos da evolução cariotípica e presença de cromossomos supranumerários no gênero.

Resumo

Algumas espécies do gênero *Moenkhausia* já foram estudadas citogeneticamente e a presença de cromossomos B é considerada uma interessante característica destes peixes. Estes elementos supranumerários que não se recombinaem com os cromossomos do complemento padrão A e seguem seu próprio mecanismo evolucionário variam em número, morfologia e distribuição, como observado no presente trabalho. Aqui são apresentados dados cariotípicos de duas populações de *M. oligolepis* ambas com $2n = 50$ cromossomos e mesma fórmula cariotípica, distribuídos em 10m, 32sm e 8st. Além do número diploide modal, todos os indivíduos apresentaram microcromossomos supranumerários variando intra e interdividual de 0 a 10 em ambos os sexos. O padrão de banda C evidenciou blocos heterocromáticos localizados principalmente na região pericentromérica e parcialmente nos microcromossomos. As Regiões Organizadoras de Nucléolo evidenciadas pela impregnação por Prata (Ag-RONs) se apresentou múltipla e variável com alguns sítios positivos quando corados pelo fluorocromo GC-específico cromomicina A₃. Os sítios ribossomais 18S e 5S localizados por FISH mostraram localização sintênica, sendo que na população Taboquinha diversos cromossomos foram marcados, evidenciando variações intraindividuais decorrentes de translocações ou eventos de transposição. A análise do cariótipo nas populações de *M. oligolepis*, reforça o número diploide conservado e basal para o gênero, assim como a tendência evolutiva destes peixes em apresentar cromossomos supranumerários, provavelmente originados pela formação de isocromossomos e diversificados pelo acúmulo de DNA repetitivo e/ou elementos transponíveis.

Palavras-chave: *Moenkhausia*, tetra de vidro, cariótipo, cromossomo B.

Abstract

Some species of the genus *Moenkhausia* have already been studied cytogenetically, and the presence of B chromosomes is considered an interesting feature of these fish. These dispensable supernumerary elements that do not recombine with the standard chromosomes and follow their own evolutionary mechanism vary in number, morphology and distribution, as observed in this study. Karyotypic data are presented here of two populations of *M. oligolepis* both with $2n = 50$ chromosomes and same karyotype formula, distributed at 5m, 16sm and 4st. Besides the modal diploid number, all the individuals presented supernumerary microchromosomes ranging from 0 to 10 in both sexes. The C-banding pattern evidenced heterochromatic blocks located mainly in the pericentromeric region and partly on microchromosomes. Silver impregnation used to evidence the nucleolar organizer regions (Ag-NORs) was variable, with a multiple pattern, and some sites were positive when stained with GC-specific fluorochrome chromomycin A₃. The location of the 18S and 5S ribosomal sites were shown to be syntenic in both populations, and the population Taboquinha different chromosomes were labeled, showing intra-individual variations due to translocation or transposition events. The karyotype of *M. oligolepis* accessed here in detail reinforces the conserved and basal diploid number for the genus, as well as the evolutionary tendency of these fish to present supernumerary chromosomes, probably originated by the formation of isochromosomes and diversified by the accumulation of repetitive DNA and / or elements transposable.

Key-words: *Moenkhausia*, Glass tetra, karyotype, chromosome B.

1.3.1 Introdução

A diversidade cariotípica tem sido amplamente estudada em peixes neotropicais e denota tendências evolutivas distintas para os diferentes táxons. Artoni et al. (2009) reconhecem que para maiores inferências sobre a história evolutiva dos peixes neotropicais é necessário considerar não só o estado atual do cariótipo, mas o cenário geológico em que as espécies se inserem e se distribuíram, assim como aspectos da biologia das espécies e o tempo evolutivo. *Moenkhausia* pertence ao grupo de pequenos caracídeos que vivem em córregos, listado como *Incertae Sedis* juntamente com outros 88 gêneros da subfamília Tetragonopterinae (Reis et al., 2003).

Os cromossomos B tem sido amplamente estudados em várias espécies de peixes e várias questões sobre sua origem tem sido levantadas, como: relação com mecanismo de determinação sexual (Noleto et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2014); variações nas condições ambientais e rearranjos cromossômicos (De Campos Júnior et al., 2014); origem intraespecífica através da formação de isocromossomos (Mestriner et al., 2000; Vicari et al., 2011; Silva et al., 2014) ou mesmo ocasionados pela dinâmica evolutiva. Entretanto na grande maioria dos casos, a função dos cromossomos supranumerários ainda permanece sem respostas.

Na família Characidae, os cromossomos B, ocorrem com relativa frequência nas espécies, apresentando características diferenciadas com relação ao número, tamanho, morfologia e distribuição relacionada ou não ao sexo (Portela-Castro et al., 2001; Oliveira et al., 2009). A ocorrência de microcromossomos tem sido verificada em *M. sanctaefilomenae* e *M. intermedia* e em certos casos, relacionados ao sexo (Portela et al., 1988; Portela-Castro et al., 2001; Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007; Portela-Castro & Julio Jr. 2002).

Em *M. sanctaefilomenae*, Foresti et al. (1989) encontraram uma variação de 1 a 8 microcromossomos em ambos os sexos, ao passo que nesta mesma espécie Portela-Castro et al. (2001) encontraram em outra população uma variação de 0 a 2 cromossomos B, presentes apenas nos machos. Tem sido relatado nos microcromossomos B de *Moenkhausia* um polimorfismo no padrão

de banda C, o qual pode ser caracterizado como parcialmente ou totalmente heterocromático, bem como eucromático, indicando composição distinta do DNA nestes microcromossomos, especialmente DNA repetitivo (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012).

Nas espécies deste gênero, são encontradas variações no padrão de Ag-RONs, onde há casos de Ag-RONs múltiplas (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007) bem como simples (Portela-Castro & Júlio Jr. 2002). Em *M. sanctaefilomenae*, a análise das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S, confirmou a localização destas sequências também sobre os cromossomos B (Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012).

Uma análise populacional de três amostras de *M. oligolepis* revelou que estas apresentam distâncias genéticas elevadas e pertencem a grupos monofiléticos distintos, sugerindo que esta espécie corresponda a um complexo de espécies, dessa maneira, foi sugerido que *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae* pertencem ao grupo *Moenkhausia grandisquamis* (Benine et al., 2004).

Estudos posteriores mostraram que há seis grupos monofiléticos apoiados por valores iguais ou superiores a 99% de distância. Três grupos monofiléticos correspondendo às espécies *M. sanctaefilomenae*, *M. oligolepis* e *M. forestii* e três grupos monofiléticos correspondendo às diferentes amostras populacionais de *M. oligolepis* de acordo com a árvore de máxima parcimônia baseada no gene mitocondrial da Citocromo Oxidase, representado abaixo na Figura 1 (Benine et al., 2009).

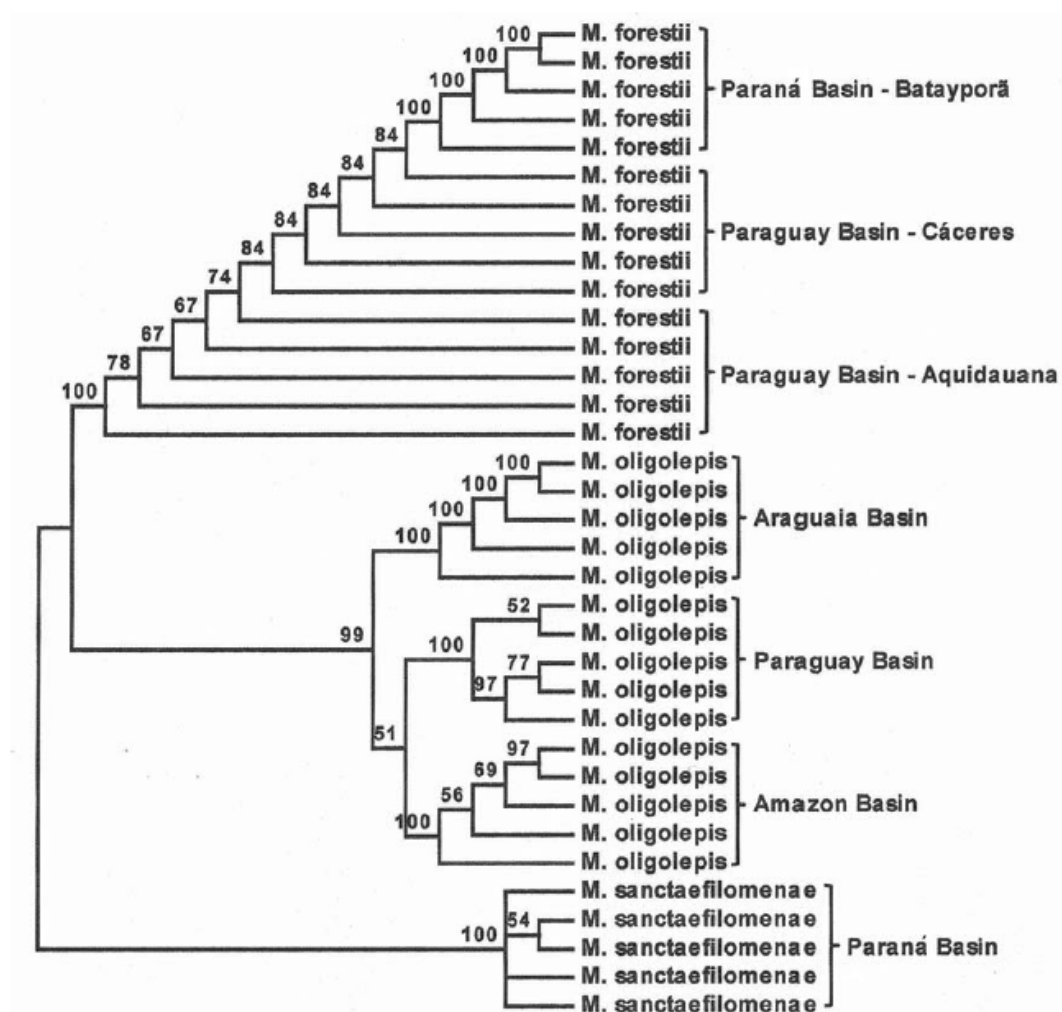


Figura 1. Consenso de máxima parcimônia para o gene mitocondrial da citocromo oxidase nas espécies de *Moenkhausia* (Benine et al., 2004).

A bacia do Rio Tocantins, está localizada em uma região de savanas naturais, apresentando em quase sua totalidade o bioma cerrado. Anterior a construção de diversas hidrelétricas, como a quarta maior no reservatório de Lajeado, era caracterizada por um ambiente lótico com várias corredeiras e quedas d'água (Lucinda et al., 2007). A nascente do Córrego Taboquinha está situada numa região de serras juntamente com vários outros pequenos córregos à jusante (Ribeirão Ponte de Pedra, Ribeirão Conceição, Ribeirão Areias) e tem sua foz no Rio Tocantins. O Córrego Pedro Correia tem sua nascente situada paralelo ao Córrego Taboquinha e à jusante deste ponto deságua no Ribeirão Conceição, separados por um sistema de queda d'água, que permite o isolamento entre essas populações de *Moenkhausia oligolepis*.

As populações de *M. oligolepis* dos Córregos Taboquinha e Pedro Correia, foram estudadas com uso de marcadores citogenéticos moleculares e microdissecção para construção de sonda do cromossomo B com o objetivo de investigar a origem dos microcromossomos B, comparar o cariótipo das duas populações e melhor caracterizar essas populações estabelecendo inferências evolutivas.

1.3.2 Material e Métodos

Foram analisados espécimes coletados na bacia do rio Tocantins, 18 exemplares (3 machos, 11 fêmeas e 4 com sexo indeterminado) de peixes da espécie *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864), foram coletados no Córrego Pedro Correia, na região de Monte do Carmo, Tocantins, Brasil (10°49'22.56"S 48°15'1.99"W) nos períodos de 2011/2012 e 2013/2014 e 36 indivíduos (10 machos, 18 fêmeas e 8 com sexo indeterminado) da mesma espécie foram coletados no Córrego Taboquinha na região de Monte do Carmo, Tocantins, Brasil (10°47'11.12"S 48°13'16.57"W) nos períodos de 2009/2010, 2011/2012 e 2013/2014.

Os exemplares coletados no período 2009/2010, foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, onde foram depositados sob os números de tombo MZUEL 5386, 5387, 5388, 5389. Os demais exemplares que foram coletados nos anos posteriores foram identificados pelo Dr. Ricardo Cardoso Benine e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Botucatu, sob os lotes CZUSC 00101, LBP 19028, LBP 19032, LBP 19036.

Os exemplares foram coletados mediante autorização do órgão competente Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade – ICMBio sob licença número: 32313-3.

As preparações cromossômicas que consiste basicamente foram obtidas a partir de células do rim anterior segundo Bertollo et al. (1978) e Foresti et al. (1993), cerca de 60 células por cada indivíduo foram analisadas para estabelecer o número cromossômico, o cálculo para o índice de Instabilidade Mitótica (IM) foi realizado seguindo $MI = (M-ni/fi)/M.N$, onde a fórmula relaciona

a média do número total de cromossomos B (M) pelo total de células analisadas (N) de acordo com Pardo et al. (1994). As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas pelo emprego do nitrato de Prata coloidal (Ag-RONs) de acordo com o protocolo de Howell & Black (1980), enquanto a heterocromatina constitutiva foi evidenciada por meio da técnica de banda C descrita por Sumner (1972). As heterocromatinas ricas em bases GC foram visualizadas pela técnica de coloração com Cromomicina A₃ contracorada com Distamicina (DA/CMA₃) segundo o protocolo de Schmid (1980). A morfologia cromossômica foi estabelecida conforme a razão de braços e nomenclatura proposta por Levan et al. (1964), com os cromossomos sendo arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

A sonda dos microcromossomos B foi obtida por microdissecção de metáfases mitóticas contendo somente um B (10 cópias) usando um microscópio invertido IX51 (Olympus) acoplado a um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Os cromossomos B foram amplificados de forma inespecífica pela Reação em Cadeia da Polimerase DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR), utilizando-se os iniciadores segundo Telenius et al. (1992) com algumas modificações (Vicari et al., 2010).

Uma segunda amplificação foi realizada usando 100 ng do produto da primeira DOP-PCR em um volume final de 50 µl. A reação foi feita com tampão (200 mM de Tris, pH 8.4 e 500 mM de KCl), 1x Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 400 µM de dNTP, 2 µM de DOP primer 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de Taq DNA polimerase. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (Eppendorf) sob as seguintes condições: três minutos a 94° C; 35 ciclos de 90 segundos a 90° C, 90 segundos a 52° C e 90 segundos a 72° C; extensão por cinco minutos a 72° C.

A sonda do microcromossomo B foi marcada por PCR usando digoxigenina-16-dUTP (Dig Nick Mix - Roche). A mistura da PCR consistiu de tampão 1x Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 40 µM de dTTP, dGTP e dCTP, 20 µM de dATTP, 20 µM de biotina-14-dATP, 2 µM do iniciador degenerado e 2 U de Taq DNA polimerase.

As sondas ribossomais 18S e 5S foram marcadas pelo procedimento de Nick Translation utilizando biotina (Biotin Nick Translation Mix – Roche Applied

Science) e digoxigenina (Dig Nick Translation Mix – Roche Applied Science), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante.

As sondas ribossomais e a pintura cromossômica com a sonda “B” foram submetidas à FISH sob condições de alta estringência (2.5 ng/μL de sonda, 50% formamida, 2x SSC, 10% de sulfato dextrano) seguindo o procedimento descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com anticorpos anti-digoxigenina-rodamina (Roche) e Avidina-FITC (Sigma). Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (0.2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados usando um microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) acoplado a um sistema de imagem DP71 (Olympus).

1.3.3 Resultados

As duas populações de *Moenkhausia oligolepis* apresentaram $2n = 50$ cromossomos para machos e fêmeas como número diplóide modal e mesma fórmula cariotípica composta por cinco pares de cromossomos metacêntricos, dezesseis submetacêntricos e quatro subtelocêntricos ($10m + 32sm + 8st$) com número de braços cromossômicos representados pelo Número Fundamental $NF = 100$ (Figura 2A). Além dos cromossomos do complemento padrão, foram encontrados cromossomos supranumerários variando entre 0 e 10 por célula (Tabelas 1 e 2), tanto intra- quanto interindividualmente e independente do sexo (Figura 2A). Em relação a Instabilidade Mitótica (IM) foi verificado que este índice está em queda na população do rio Taboquinha (Tabela 1) e em elevação na população de Pedro Correia (Tabela 2).

Tabela 1. Instabilidade Mitótica do cromossomo B em *M. oligolepis* na população Taboquinha.

Data de coleta	Córrego Taboquinha												nº Total de Células	MI
	0 B	1 B	2 B	3 B	4 B	5 B	6 B	7 B	8 B	9 B	10 B			
2009-2010	16.5± 15.9	8.6± 8.1	11.9± 8.5	10.3± 9.6	10.5± 13.0	3.2± 5.1	2.3± 4.1	2.9± 7.6	0.1± 0.2	0.5± 1.50	0.6± 1.7	1147	0,40	
2011-2012	33.4± 34	2.87± 3.8	4.2± 6.9	3.7± 7.3	4.12± 6.6	0.5± 1.1	0.1± 0.4	0.3± 0.7	-	-	-	394	0,20	
2013-2014	12.6± 17.2	7.7± 9.9	20± 13	8.3± 8.9	10± 9.7	3.4± 4.2	5± 6.5	2.1± 3.6	2.1± 4.1	0.6± 1.8	0.3± 0.9	1578	0,21	

Tabela 2. Instabilidade Mitótica do cromossomo B em *M. oligolepis* na população Pedro Correia.

Data de coleta	Córrego Pedro Correia											nº Total de Células	MI
	0 B	1 B	2 B	3 B	4 B	5 B	6 B	7 B	8 B	9 B	10 B		
2011-2012	83.5± 32	5.4± 5	1.5± 3.1	0.3± 0.6	-	-	-	-	-	-	-	907	0,01
2013-2014	20.4± 27	27± 37	25.6± 34.2	12.7± 17.5	12.2± 17	4± 6.1	5.3± 8	4± 6.6	2.2± 4.4	-	0.2± 0.4	511	0,40

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RONs) apresentou uma variação no número de cromossomos marcados caracterizando um padrão múltiplo com até três marcas visualizadas (Figura 3c). A análise da distribuição da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C no cariótipo mostrou blocos marcados principalmente na região pericentromérica dos cromossomos do complemento A, enquanto os microcromossomos supranumerários se mostraram eucromáticos (Figura 3B e 3b).

O emprego do fluorocromo DAPI/CMA₃ evidenciou marcas GC positivas terminais sobre o braço curto de um par cromossômico provavelmente correspondente aos cístrons ribossômicos verificados pela prata e adicionalmente em outras regiões intersticiais em alguns cromossomos do complemento padrão (Figura 3A).

A análise da dupla FISH evidenciou seis sítios de rDNA 18S na população Pedro Correia, localizadas na região centromérica do par 1, par 2 e um par submetacêntrico (Figura 3c). Os sítios de rDNA 5S se apresentaram sintênicos ao rDNA 18S no par cromossômico 2 (Figura 3c). Na população de Taboquinha, cinco sítios de rDNA 18S foram localizados na região centromérica dos pares 1 e 2 e um cromossomo submetacêntrico individual (Figura 3B, 3C e 3D). Os sítios de rDNA 5S localizaram-se em sete cromossomos, sendo que um cromossomo do par 2 apresentou esta marcação na região distal do braço longo, indicando sintenia entre o rDNA 18S e o rDNA 5S também nesta população (Figura 3B, 3C e 3D). A pintura cromossômica com a sonda do microcromossomo B específica evidenciou o cromossomo B totalmente marcado, além da região completa do par cromossômico acrocêntrico (Figura 4).

1.3.4 Discussão

Várias espécies de Characidae apresentam populações pequenas, sobretudo aquelas que representam táxons característicos de ambientes de cabeceiras de rios ou ambientes de pequenos riachos. O tetra de vidro, *Moenkhausia oligolepis* é um bom exemplo destas espécies de pequeno porte com distribuição restrita a cabeceira de riachos. Estas características biológicas suscitam a investigação do cariótipo de *M. oligolepis* a exemplo do que ocorre com o complexo de espécies *Astyanax scabripinnis*, especialmente em relação a presença de cromossomos B ou supranumerários (Moreira-Filho et al. 2004).

No presente estudo verificamos uma frequência de até 10 microcromossomos B em *M. oligolepis* de duas populações dos Córregos Taboquinha e Pedro Correia da bacia do Rio Tocantins. A frequência variável destes elementos cromossômicos, tanto intra quanto interpopulacional pode ser interpretada como ação de duas forças contrárias: o acúmulo do cromossomo B, com tendência de aumento na frequência destes cromossomos na população e o efeito adaptativo sobre os indivíduos que portam estes cromossomos, com tendência a diminuir a frequência dos cromossomos supranumerários na população (Camacho et al., 2000).

Concernente a MI e manutenção dos cromossomos B nestas populações é possível inferir preliminarmente que a população Taboquinha esteja evoluindo para um estágio de neutralização, enquanto a população Pedro Correia se encontra em um estágio de acúmulo de cromossomos B. Estes dados corroboram a evidência do equilíbrio dinâmico entre seleção e neutralismo proposto por Camacho et al. (1997) para a presença de cromossomos B em populações naturais.

Os dados quanto à instabilidade cromossômica são apresentados nas Tabelas 1 e 2 e revelam que o córrego Taboquinha apresentou decréscimo do valor de referência (IM) no período 2009/2010 em relação ao período seguinte. Nesse sentido, nos períodos posteriores deste mesmo córrego, 2011/2012 e 2013/2014 fica evidenciado que os valores de referência se mantiveram constantes. É possível ainda indicar que devido aos valores de instabilidade fixados pelo MI, foram avaliados nesses diversos períodos, peixes que

apresentaram alta amplitude no número de cromossomos B, e que tais alterações podem ter influência temporária nesta população, visto que em períodos distintos os cariótipos apresentaram grandes variações numéricas.

No que tange ao comportamento por instabilidade mitótica dos espécimes avaliados na população Pedro Correa, também foi evidenciado grande variação no número de cromossomos B. Foi possível verificar que no período 2011/2012, os indivíduos não apresentavam mais que 3 cromossomos supranumerários, mas que, no próximo período, os peixes chegaram a apresentar até 10 cromossomos B. Ficou evidenciado também que no 1º período analisado o valor de IM foi extremamente baixo, devido ao grande número de células que não apresentaram nenhum cromossomo B, mas que no período seguinte, 2013/2014, devido ao grande número de variações, foi fixado um valor relativamente expressivo (0.4) quanto a instabilidade cromossômica dos peixes dessa população. Este valor mostra-se elevado quanto ao observado por Hashimoto et al. (2012) em uma população de *M. sanctafilomenae*, onde os autores encontraram um IM=0.2 e inferior ao observado por Foresti et al. (1989) de IM=0.6, uma possível indicação que esse valor varie dependendo do local, necessitando assim de monitoramento durante os próximos anos, com o intuito de avaliar e confirmar a origem deste elemento.

Portanto, a presença de cromossomos B em *M. oligolepis* aqui verificada, pode remontar a origem das diferenças evidenciadas entre este complexo de espécies descrito por Benine et al. (2009) e a formação desta espécie em relação a outras espécies do gênero, se for confirmada a hipótese de origem comum para estes cromossomos supranumerários no gênero.

O número cromossômico de $2n = 50$ foi verificado em *M. intermedia* e *M. costae* estudados por Portela et al. (1988). Os autores encontraram uma macroestrutura cariotípica composta pelos tipos cromossômicos meta e submetacêntricos, além da presença de um pequeno cromossomo supranumerário em *M. intermedia*. Dados de check list para peixes amazônicos indicam $2n = 50$ cromossomos para uma população de *M. oligolepis* (Porto et al., 1992). Dantas et al. (2007) corroboraram o número diploide de $2n = 50$ cromossomos verificado anteriormente por Foresti et al. (1989) para a espécie *M. sanctaefilomenae*. O número diploide parece ser um caráter conservado

para o gênero *Moenkhausia* uma vez que também foi detectado no presente estudo em *M. oligolepis*.

Por outro lado, a diversificação da macroestrutura cariotípica neste gênero não se reporta somente a presença de cromossomos supranumerários ou reflete um estado de conservadorismo *strito sensu* para o número diploide de cromossomos. O cariótipo das duas populações de *M. oligolepis* apresentaram quatro pares de cromossomos subtelocêntricos, provavelmente em decorrência de eventos de diversificação cariotípica não robertsonianos como inversões pericêntricas que alteram a fórmula cariotípica. Dantas et al. (2007) também verificaram a presença de um par de cromossomos acrocêntricos em concordância com a fórmula cariotípica anteriormente descrita para *M. sanctaefilomenae* por Foresti et al. (1989). Isto indica que a diversidade da macroestrutura cariotípica pode ser mais ampla do que a verificada até o momento nestes complexos de espécies.

Considerando as duas populações, o padrão de banda C não difere daquele observado na literatura para outras espécies do gênero *Moenkhausia*. A heterocromatina evidenciada pelo bandamento C se mostrou padrão para as duas populações, evidenciada principalmente nas regiões pericentroméricas, porém, mostra-se heterogênea na composição, onde segmentos diferenciais ricos em bases GC e AT podem ser identificados especialmente na população Pedro Correia (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012). Alguns microcromossomos mostraram-se eucromáticos, indicando a possível presença de genes ativos nestes segmentos cromossômicos, corroborando trabalhos prévios de outras populações onde os mesmos mostraram-se total ou parcialmente heterocromáticos e eucromáticos, indicando polimorfismo no padrão de banda C (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007; Hashimoto et al., 2012). Esta evidência indica a natureza heterogênea da heterocromatina no cariótipo desta população e implica na presença de, pelo menos, mais de uma classe de heterocromatina.

A presença de apenas um par cromossômico portador de regiões organizadoras de nucléolos (RONs simples) ocorre no gênero *Moenkhausia* como verificado em *Moenkhausia* sp. e *M. intermedia* (Dantas et al., 2007), confirmado por FISH com sonda 18S. Por outro lado, *M. sanctaefilomenae* têm apresentado uma extensa variação para a presença de RONs ativas (RONs

múltiplas) verificada em diferentes populações (Foresti et al., 1989; Dantas et al., 2007), também sobre os cromossomos B, confirmando a importância destes cromossomos na organização do genoma destas espécies. Esta é uma condição não usual em peixes e merece ser mais amplamente avaliada em outras espécies do gênero *Moenkhausia*.

O emprego da FISH com sondas de rDNA 18S ampliou o polimorfismo verificado em uma população de *M. sanctaefilomenae* do Córrego Capivara na região de Botucatu-SP (Dantas et al., 2007), inclusive com a presença destas sequências gênicas localizadas também sobre os cromossomos B presentes naquela população.

A hibridação *in situ* possibilitou detectar sintenia dos genes ribossomais 18S e 5S nas duas populações de *M. oligolepis*, sendo que na população Pedro Correa as mesmas coincidiram com o par cromossômico portador da Ag-RON além do par cromossômico 1 que também possui marcações 18S e pequenas marcações em um par submetacêntrico. Na população do Córrego Taboquinha houve maior variabilidade na localização dos genes ribossomais, com vários cromossomos carregando sítios ribossomais 18S como os pares 1 e 2 e um submetacêntrico individualmente, indicando que diversas situações como polimorfismos, fatores evolutivos e transposições ocorreram e ampliaram a distribuição destes marcadores, assim como ocorreu em outros grupos de peixes (Kavalco & Moreira-Filho, 2003; Vicari et al., 2011). Provavelmente devido uma plasticidade do genoma atribuída a movimentação destas regiões pelo cariótipo, em decorrência de elementos transponíveis, visto a presença de marcações em cromossomos não homólogos. Os Elementos Transponíveis afetam o genoma pela sua capacidade de se mover e replicar gerando assim plasticidade (Wicker et al., 2007).

A maioria do genoma dos eucariotos é formada por regiões que não codificam proteínas, essas sequências incluem DNA satélites, microsatélites, minissatélites e regiões codificantes como os transposons e elementos retrotransponíveis. Durante muito tempo, estas sequências não codificantes foram consideradas como DNA lixo (junk DNA), devido sua não funcionalidade, porém tem-se mostrado que muitas dessas sequências são funcionais e estão envolvidas em complexos mecanismos regulatórios como regulação do ciclo celular (Houben et al., 2014).

Os dados de FISH com a sonda do B eucromático (Figura 4A) na população do córrego Taboquinha mostraram hibridação completa com um par cromossômico do complemento A (Figura 4B), podendo-se inferir que os cromossomos B tenham sido originados a partir da formação de isocromossomo do braço curto do cromossomo marcado no complemento A, seguido pelo acúmulo de sequências repetitivas não heterocromáticas, possivelmente elementos transponíveis (TEs) também detectados pela sonda no braço longo do par cromossômico do complemento A marcado.

O presente trabalho evidenciou dados cariotípicos para populações de *M. oligolepis* pertencente à bacia do Rio Tocantins com a presença de até 10 microcromossomos B e um cariótipo constituído pelo número diplóide basal ($2n = 50$) para o gênero, modificado na fórmula cariotípica pela presença de cromossomos subtelocêntricos, muito provavelmente em decorrência de inversões pericêntricas. Estes achados podem estar relacionados à características intrínsecas das espécies de córregos de cabeceira onde a instabilidade cariotípica têm se mostrado mais acentuada em peixes neotropicais.

1.3.5 Referências Bibliográficas

Artori RF, Vicari MR, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2009) Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. Review in fish biology and fisheries 19:393-401.

Artori RF, Vicari MR, Bertollo LAC (2000) Neotropical fish cytogenetics: methods, results and perspectives. Publ UEPG Biol Health Sci 6:43-60

Benine RC, Castro RMC, Sabino J (2004) *Moenkhausia bonita*: A New Small Characin Fish from the Rio Paraguay Basin, Southwestern Brazil (Characiformes: Characidae). Copeia 1:68–73.

Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments of the *Moenkhausia oligolepis* species complex. Neotrop Ichthyol 7:161-168.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics 1:103-120.

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. Philos. T. Roy. Soc. 355:163-178.

Camacho JPM, Shaw MW, López-Léon MD, Pardo MC & Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. The American Naturalist 149:1030–1050.

Dantas ESO, Vicari MR, Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Artoni RF (2007) Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1913 (Teleostei, Characidae). The Nucleus 50:505-518.

De Campos Júnior EO, Pereira BB, Morelli S, Pavanin EV & Pavanin LA (2014) Biological monitoring and B chromosome frequency in Bagre (*Rhamdia quelen*) in southeast Brazil. Environmental Toxicology and Pharmacology 38:510–517.

Foresti F, Almeida-Toledo LF & Toledo-Filho SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica 79:107-180.

Foresti F, Oliveira C & Almeida-toledo L.F (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. Experientia 49:810-813.

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

Hashimoto DT, Voltolin TA, Paes ADNVA, Foresti F, Bortolozzi J & Porto-Foresti F (2012) Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of

the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). Comparative Cytogenetics 6(2):141–151.

Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S & Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. Cell Mol Life Sci 71:467–478.

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

Kavalco KF & Moreira-Filho O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. Caryologia 56(4):453-461.

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

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Pezzi da Silva JF, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L & Bertaco VA (2003) Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-168. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ (eds) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre: Brasil.

Lucinda PHF, Freitas IS, Soares AB, Marques EE, Agostinho CS & Oliveira RJ (2007) Lists of Species. Fish, Lajeado Reservoir, rio Tocantins drainage, State of Tocantins, Brazil. Check List 3(2):70-83.

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

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

Noletto RB, Vicari MR, Cestari MM & Artoni RF (2011) Variable B chromosomes frequencies between males and females of two species of pufferfishes (Tetraodontiformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22:343-349.

Oliveira C, Foresti F & Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:81–100.

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Silva GJC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C & Foresti F (2014) Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*. *Plos One* 9(9):e107169.

Pardo MC, López-León MD, Cabrero J & Camacho JPM (1994) Transmission analysis of mitotically unstable B chromosome in *Locusta migratoria*. *Genome* 37:1027-1034.

Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 2934-2938.

Portela ALBS, Galetti Jr PM, Bertollo LAC (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Rev Brazil Genet* 11:307-316.

Portela-Castro ALB & Júlio Jr HF (2002) Karyotype Relationships among Species of Subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomy and Evolution Aspects. *Cytologia* 67:329-336.

Portela-Castro ALB, Júlio Jr HF, Nishiyama PB (2001) New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110:277-283.

Porto JIR, Feldberg E, Nakayama CM, Falcão JN (1992) A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 25:287-299.

Reis RE, Kullander SO & Ferraris CJ Jr (2003) Check list of the freshwater fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre – RS 742p.

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

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti FP & Foresti F (2014) Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *Plos One* 9(4):e94896.

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

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA & Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718–725.

Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094–1116.

Vicari MR, Pistone HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM & Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH *Genetica* 139:1073–1081.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capi P, Chalhub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P & Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982.

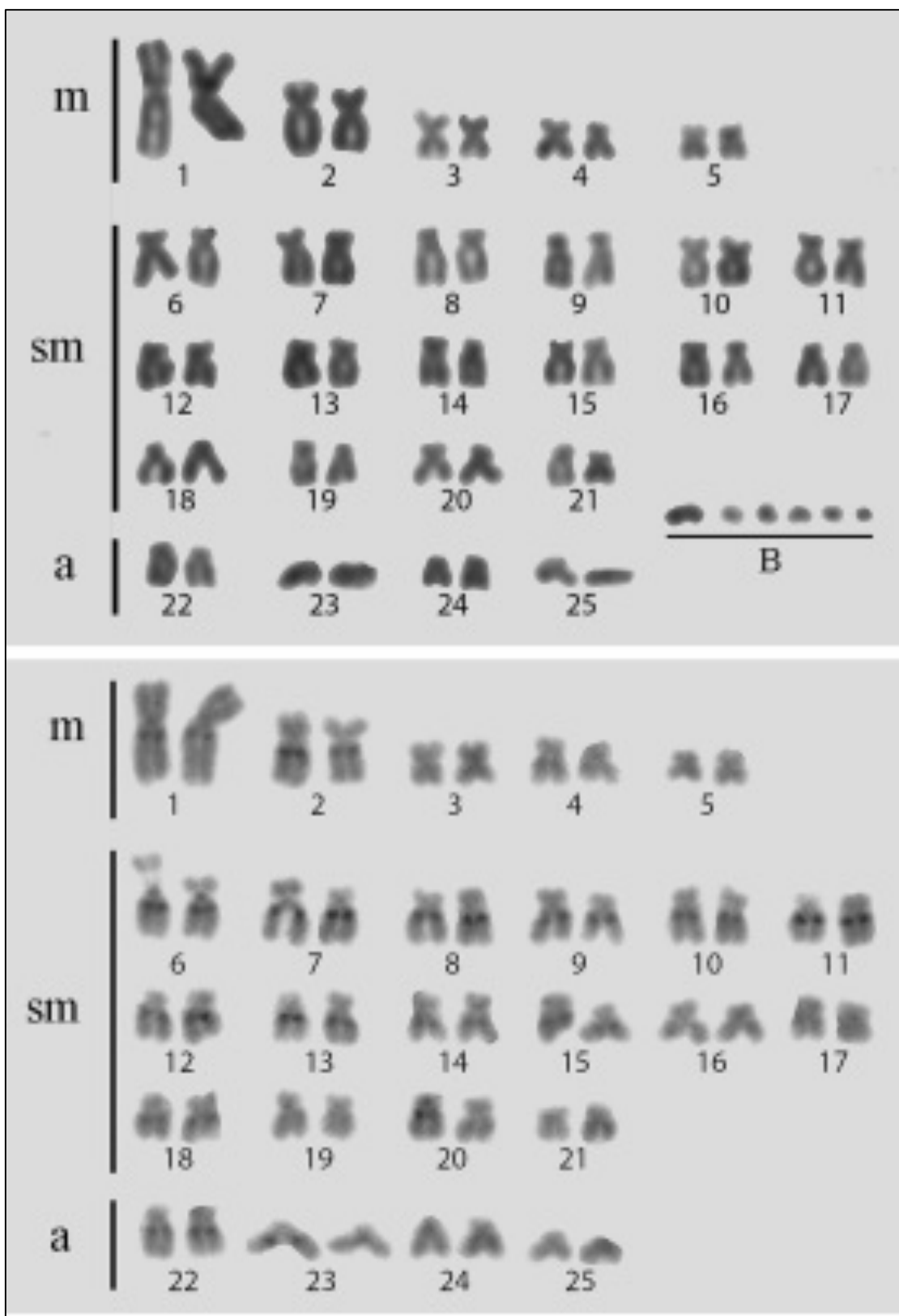


Figura 2. Cariótipo de *Moenkhausia oligolepis* da população do Rio Taboquinha submetido a coloração convencional por giemsa (A), em destaque a presença de 6 cromossomos B. Em (B) Cariótipo em bandamento C. Barra = 10µm.

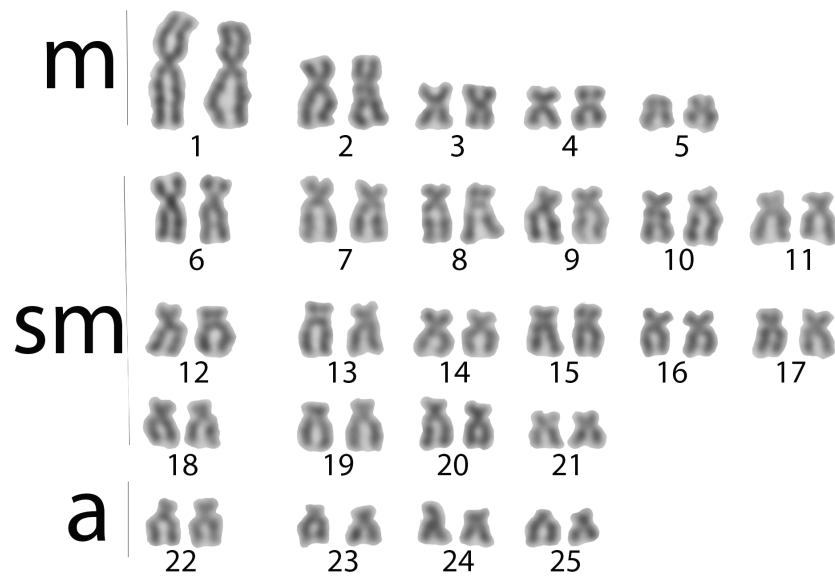


Figura 3. Cariótipo de *Moenkhausia oligolepis* da população do Córrego Pedro Correa submetido a coloração convencional por giemsa.

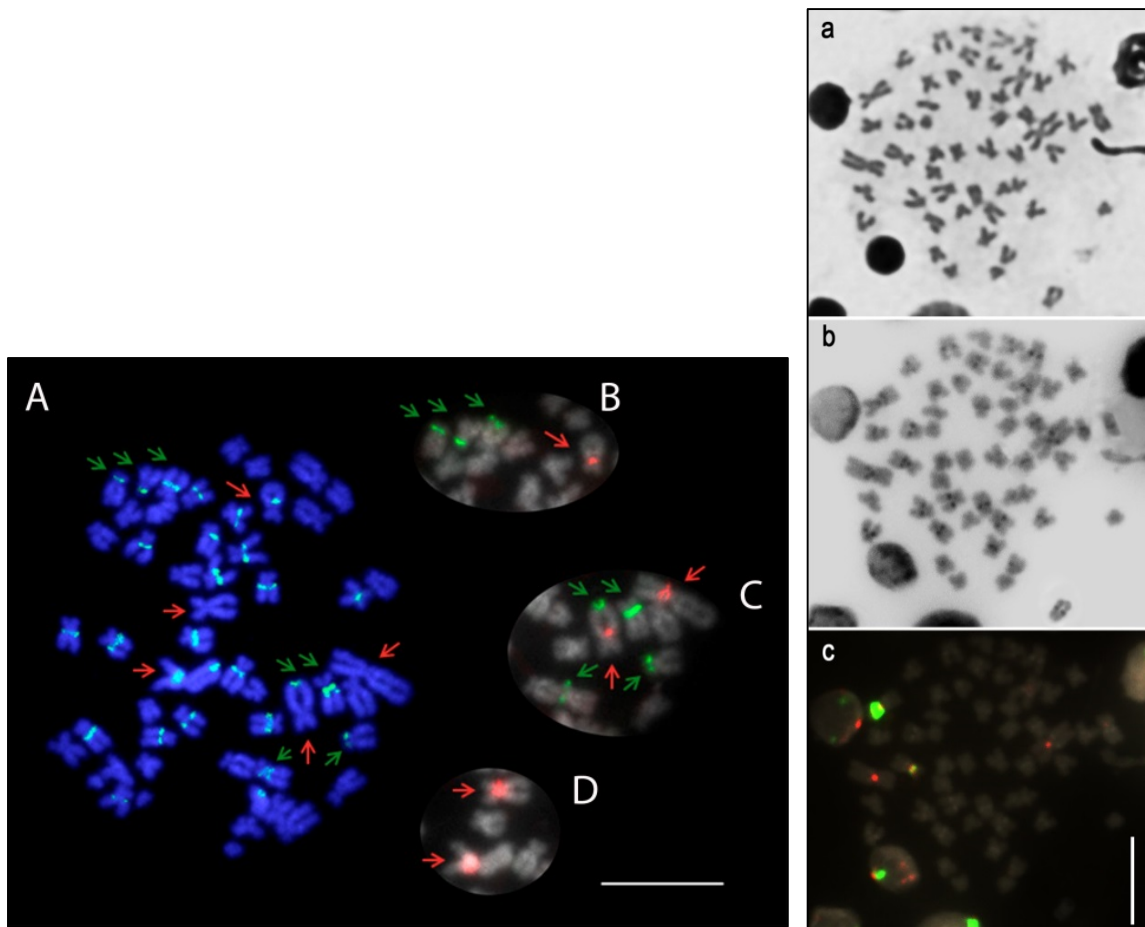


Figura 4. Coloração sequencial sobreposta de DAPI+CMA₃ da população Taboquinha (A) e destaques dos cromossomos marcados com sondas de rDNA 5S (verde) e rDNA18S (vermelho) (B, C e D). As setas indicam localizações distintas para os sítios ribossomais. Análise sequencial Giemsa (a), banda C (b) e FISH 18S (vermelho) e 5S (verde) (c) da população Pedro Correia.

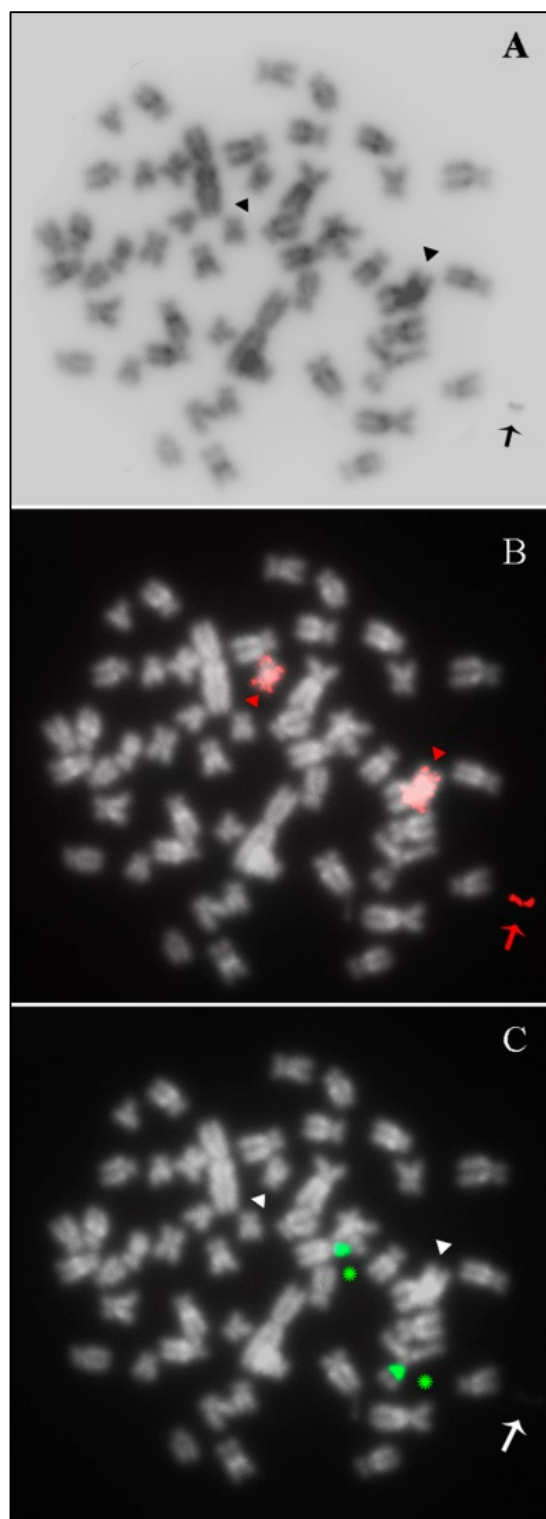


Figura 5. Análise sequencial de banda C evidenciando a presença de um microcromossomo B eucromático (A). Sonda construída por microdissecção do microcromossomo B, amplificada por DOP/PCR e marcada por *nick translation* (vermelho) (B). Hibridização com sonda 18S (verde) usada como controle da FISH (C).

CAPÍTULO IV

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Zebrafish

1.4 Intra- and Interspecific diversity in *Astyanax* (Teleostei: Characidae): Karyoevolutionary inferences

Luana Pereira dos Santos^{1,2*}, *Carine Mendonça Francisco*,² *Jonathan Pena Castro*³, *Patrícia Barbosa*³, *Sandra Morelli*², *Luiz Antonio de Oliveira*⁴ and *Roberto Ferreira Artoni*^{3, 4}

¹*University Centre of Triangle, Campus UNITRI, Av, Nicomedes Alves dos Santos, 4545, Gávea, 38411-106, Uberlândia, MG, Brazil.*

²*Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Av. Pará, 1720, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil.*

³*Graduate Program in Evolutive Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.*

⁴*Department of Structural Biology, Molecular and Genetics, Graduate Program in Evolutionary Biology, State University of Ponta Grossa, Avenida Carlos Cavalcanti 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil.*

** Corresponding author. Tel.: +55 34 992049967; fax: +55 34 32182203*

E-mail address: luanabio3@gmail.com

Abstract

Many Neotropical species of fishes of the order Characiformes are considered *incertae sedis* because of a lack of consistent evidence of monophyly, with the genus *Astyanax* among them. With a cytotaxonomic and evolutionary purpose, we compared the karyotype of two species of *Astyanax*: *A. paranae* (three populations sampled) and *A. elachylepis* (one population sampled). Conventional cytogenetic analyses revealed $2n = 50$ chromosomes for the two species, with interspecific and interpopulation karyotype variations. Heterochromatin was primarily localized in the pericentromeric regions, and was associated with organized regions of the nucleolus (NORs) and/or telomeric areas in some acrocentric chromosomes. The *in situ* localization of 18S rDNA probes (large subunit) and 5S (small subunit) varied among *A. paranae* populations. In *A. elachylepis*, only one chromosome pair was stained by the 18S probe and another by the 5S probe, confirming a simple NORs pattern. These results support the utility of chromosome markers in *Astyanax* taxonomy and reveal the conserved characteristics of the karyotype of *A. elachylepis*, consisting exclusively of two chromosome arms, as well as the occurrence of simple homologous and non-syntenic sites for 18S and 5S rDNA in this species.

Keywords: Molecular cytogenetics, FISH, heterochromatin, rDNA, karyotype evolution.

1.4.1 Introduction

The genus *Astyanax*, the most common and diversified genus in the Characidae family, is widely distributed from the Mexican border with the United States to south of Argentina. It includes approximately 150 valid species.¹ These fishes are popularly known as “*lambaris*” or “*piabas*,” and they inhabit diverse environments, including headwaters of rivers and streams.² It is characterized, along with other genera, as *incertae sedis* of the family Characidae.³ Currently, it stands out as a model for various laboratory studies.⁴

The genus presents similar morphological forms, however, there is high variability in the number and morphology of the chromosomes, resulting in species complexes.^{5,2} At least three groups are recognized as species complexes, among them is the genus *Astyanax*. It includes *A. scabripinnis*,⁵ *A. fasciatus*,⁶⁻⁷ and *A. altiparanae*.⁸

Astyanax displays wide cytogenetic variation, primarily in the number of chromosomes, karyotype macrostructure, presence of supernumerary chromosomes, heterochromatic block polymorphisms, nucleolus organizer regions (Ag-NORs), variations in the location of ribosomal genes, and triploid syndrome.⁹⁻¹⁹

In addition, studies have shown the occurrence of distinct sympatric cytotypes,^{6,20} which indicates the diversity of this genus and reinforces the occurrence of cryptic species. However, the amplitude of karyotypic plasticity and specific diversity in *Astyanax*, as well as its monophyletism are still open questions.

Although previous studies have characterized the karyotype of different species and populations of *Astyanax*, complementary studies are still necessary to elucidate the karyotype and cytotaxonomic positioning of these fishes. Thus, the goal of this study was to present new data concerning the karyotypic structure and organization of *Astyanax paranae*, recently removed from the *A. scabripinnis* complex.²¹ It was originally cited as *A. scabripinnis paranae* by Eigenmann²² and described as a new species, *Astyanax elachylepis*, by Bertaco and Lucinda²³. This study also explored the potential of intra and

interpopulation markers, using classic methodologies associated with molecular cytogenetics to locate 18S and 5S ribosomal genes.

1.4.2 Material and Methods

The information concerning the *Astyanax* populations studied are summarized in Table 1 and Figure 1. The fishes were identified by an expert and deposited under LBP 19027 and LBP 19031 vouchers numbers at the Museum of Zoology of the Institute of Biosciences of the State University of São Paulo (UNESP), in Botucatu, São Paulo, Brazil.

Chromosome preparations of the 50 captured samples were obtained from cells of the anterior kidney, according to Bertollo *et al.*²⁴ and Foresti *et al.*²⁵ The constitutive heterochromatin was stained using the Summer²⁶ technique, adapted according to Lui *et al.*²⁷. The nucleolus organizer regions (Ag-NORs) were detected according to the methods of Howell and Black.²⁸ The morphology of each chromosome was established according to the arm ratio (AR) proposed by Levan *et al.*²⁹, with the chromosomes arranged in the karyotype in descending order by size.

Identification of 18S and 5S rDNA regions was performed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), using a 18S labeled probe, obtained by PCR with primers NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' and NS8 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'³⁰ and a 5S labeled probe with primers A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' and B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3',³¹ amplified in the genomic DNA of *Astyanax scabripinnis*. The labeling of the 18S probe was conducted with the Biotin Nick Translation Mix (Roche), and that of the 5S probe with the Dig Nick Translation Mix (Roche) kit, according to the manufacturer's instructions.

FISH was performed under highly stringent conditions (2.5 ng/μL probe, 50% formamide, 2 × SSC, 10% dextran sulfate), following the general procedure described by Pinkel *et al.*³² The metaphases were analyzed under an epifluorescent microscope (Olympus BX41) coupled with the image capture system DP 71 (Olympus), using the CCD Olympus DP 71[®] system and the DP-Controller software, version 3.2.1.276.

1.4.3 Results

Astyanax paranae and *A. elachylepis* displayed a diploid number of $2n = 50$ chromosomes, with differences in the karyotype formula (Table 2, Figure 2). In general, the populations of the two species exhibited marked heterochromatic blocks in centromeric and interstitial regions, as well as at the end of these blocks (Figure 3a, d, g, j). *A. elachylepis* had a high number of chromosomes with pericentromeric and interstitial C-positive bands (Figure 3j). It is noteworthy that the heterochromatin associated with subtelocentric pair 23, carried Ag-NORs in the short arm. The Ag-NORs were simple, as confirmed by FISH with a 18S rDNA probe and only occurred in one population of *A. paranae* (Córrego Lageado), with staining in submetacentric 7 pair, and *A. elachylepis* (Figure 2 highlighted, Figures 3e, f; 3k, l), whereas the other two populations of *A. paranae* (Ribeirão Mandaguari e Lago Paranoá) showed multiple polymorphic sites for Ag-RONs/18S (Figure 2 highlighted, Figures 3b, c; 3h, i).

The 5S rDNA sequences were shown by FISH to localize in the two species of *Astyanax* studied. One submetacentric chromosome pair, with a pericentromeric location of the 5S probe, was conserved in all populations (Figure 3c, f, i, l). In the *A. paranae* from the Mandaguari River, this chromosome pair still had 18S rDNA syntenic sites in the short arm (Figure 3c). The population of *A. paranae* from Paranoá Lake and *A. elachylepis* only displayed one sm chromosome pair carrying rDNA5S (Figures 3i, l), whereas the populations of *A. paranae* from the Mandaguari River and the Córrego Lageado had an additional acrocentric chromosome pair carrying the short 5S arm sequences (Figures 3c, f).

1.4.2 Discussion

Our results confirmed a diploid number of $2n = 50$ chromosomes for all of species and populations of *Astyanax* analyzed herein. These data support a conserved condition found in the majority of species, and is the basis for all *Astyanax*¹². In addition, *A. elachylepis* showed a highly differentiated karyotype, composed exclusively of the two arms of chromosomes (14m+30sm+6st),

which is uncommon in these fishes and far from the karyotype formula described by Tenório *et al.*³³ for a population of *A. elachylepis* from the Araguaia River basin (TO, Brazil), with 6m+22sm+10st+12a. Robertsonian events of centric fission/fusion are required to explain this population difference. On the other hand, these two populations of *A. elachylepis* share the occurrence of only one pair of chromosomes carrying active Ag-ORNs stained by FISH with the 18S rDNA probe. We should highlight that staining occurred in the short arm of the pair of acrocentric chromosomes in the population from the Araguaia River, whereas in the population from the Tocantins River (present study) the type of chromosomes carrying the NORs was submetacentric. A pericentric inversion event could have diversified this marker in these populations. These differences in karyotype macro and micro-structure are strong evidence of a process of allopatric speciation that requires deeper taxonomic study of *A. elachylepis*.

The three populations of *Astyanax paranae* studied did not share the same karyotype formula (macrostructure). These populations inhabited the hydrographic basin of the Paranaíba River and, although all sampling points were at indistinct locations along the basin, the karyotype macrostructure showed that the number of metacentric chromosomes ($m = 8$) was conserved in these populations, and that the inter-population variation in the number of chromosome arms (NF) was caused by structural alterations in other chromosome classes. Furthermore, interpopulational differences related to the karyotype microstructure referring to the activity of Ag-NORs were shown, as well as patterns of constitutive heterochromatin, and location and diversification of 18S and 5S rDNA sequences, which reflects the structural tendencies of these populations.

Interspecific differences in karyotype microstructure, specifically in relation to the localization of ribosomal genes are common in *Astyanax* (reviewed in Piscor *et al.*,¹⁹ as well as among allopatric populations of the same species; for example *A. scabripinnis*³⁴ and *A. bockmanni*.¹⁸ On the other hand, the fixation of chromosome polymorphic variants, which was observed herein, has a more restrictive occurrence, which suggests that *A. paranae* formed evolutionarily different population units along the same hydrographic basin. These data are important as cytotaxonomic markers and indicative of incipient

speciation processes. They could also aid in decision-making in the location of biological conservation areas. This species exhibits an intriguing scenario to be investigated from the perspective of population genetics; however, this was not the goal of current study.

Besides structural chromosome rearrangements, other mechanisms are required to explain the diversification in the karyotype microstructure of the populations analyzed herein, especially in relation to 18S and 5S rDNA. According to Mantovani *et al.*,³⁵ there are generally multiple locations of 18S sequences in *Astyanax*, and they can vary in different populations of the same species. In this study, we found multiple 18S locations in two of three populations of *A. paranae*, accompanying a polymorphism in the activity of these same regions when compared to staining Ag-NORs. The occurrence of bitelomeric staining in one chromosome of the population of Paranoá Lake is also noteworthy. Staining of bitelomeric 18S rDNA was also observed in a single subtelocentric chromosome in other populations of *A. paranae*^{36,17} and other species of the genus, such as in *A. hastatus*,³⁷ highlighting that events of distribution of the sequences should occur in this species, probably because of translocations between non-homologous chromosomes and/or transposition events. Another peculiar condition was found for the submetacentric chromosome pair, which stains the pericentrometric location of the 5S rDNA, in synteny with the 18S rDNA in the short arm.

As for the syntenic ratio 18S/5S, it has been proposed that it is a condition conserved between *Astyanax*.³⁸ Our data for the *A. paranae* population of the Mandaguari River supports this hypothesis, even though this was not observed in the other populations of *A. paranae* and *A. elachylepis*. The co-localization of 18S ribosomal DNA with transposable elements (TEs) might be involved with genome evolution and karyotype diversification in *A. scabripinnis*,³⁹ and could occur in other species of the genus. This evidence shows that 18S/5S synteny does not prevent the action of evolutionary forces and karyotype diversification of this group related to *Astyanax*.

In conclusion, our results reinforce the utility of cytotaxonomic markers in *Astyanax* and reveal a conserved condition for the *A. elachylepis* karyotype, formed preferentially by the arms of chromosomes, as well as the occurrence of simple homologous and non-syntenic sites for 18S and 5S rDNA in this species.

In addition, populations of *A. paranae* of the same hydrographic basin show a greater diversification of karyotypic macro and microstructure, suggesting that this is a cryptic species complex.

1.4.5 Acknowledgements:

The authors would like to thank Dr. Ricardo Cardoso Benine for his taxonomic identification of the species. LPS received a scholarship from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel). The work also received the financial support of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

1.4.6 References

1. Eschmeyer WN. Catalog of fishes, 2016. California Academy of Sciences. Available at: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Accessed 20 January 2016.
2. Garutti V, Britski HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Séries Zoologia 2000;13: 65-88.
3. Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, da Silva JFP, Vari RP, Harold A, *et al.*: Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr. (eds), pp. 106-169, Edipucrs, Porto Alegre, 2003.
4. Elipot Y, Legendre L, Père S, Sohm F, Rétaux S. *Astyanax* Transgenesis and Husbandry: How Cavefish Enters the Laboratory. ZebraFish 2014;11:291-299.
5. Moreira-Filho O, Bertollo LAC. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Braz J Genet 1991;14:331-357.

6. Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC, Vicari MR, *et al.* *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotrop Ichthyol* 2006;4:197-202.
7. Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC. Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome Res* 2006;112:313-319.
8. Fernandes CA, Martins-Santos IC. Cytogenetics study in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* 2004;141:328-332.
9. Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 2001;66:59–64.
10. Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM. B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 2004;106:230-234.
11. Kavalco KF, Almeida-Toledo LF. Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 2007;4:103-111.
12. Pazza R, Kavalco KF. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *The Nucleus* 2007;50:519-543.
13. Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol* 2008;31:275-278.
14. Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti F. Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). *Caryologia* 2012;65:228–233.

15. Santos LP, Castro JP, Francisco CM, Vicari MR, Almeida MC, Goll LG, *et al.* Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, *incertae sedis*): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Mol Cytogenet* 2013;6:1-10.
16. Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, *et al.* Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *Plos One* 2014;9:1-10.
17. Yano CF, Moreira-Filho O, Margarido VP. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. *Biologia* 2014;69:790—798.
18. Daniel SN, Penitente M, Hashimoto DT, Silva DMZA, Foresti F, Porto-Foresti F. New Insights into Karyotypic Relationships Among Populations of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes) of Different Watersheds. *ZebraFish* 2015;12:1-8.
19. Piscor D, Alves AL, Parise-Maltempi PP. Chromosomal Microstructure Diversity in Three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species: Comparative Analysis of the Chromosomal Locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish* 2015;12:81-90.
20. Cunha MS, Reis VJC, Dergam JA. Closely Related Syntopic Cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. *ZebraFish* 2016;13:112-117.
21. Bertaco VA, Lucena CAS. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotrop Ichthyol* 2006;4:53-60.
22. Eigenmann CH. Some results from studies of South American fishes. IV. New genera and species of South American fishes. *Indiana University Studies* 1914;20: 44-48.

23. Bertaco VA, Lucinda PHF. *Astyanax elachylepis*, a new characid fish from the rio Tocantins drainage, Brazil (Teleostei: Characidae). *Neotrop Ichthyol* 2005;3:389-394.
24. Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1978;1:103-120.
25. Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 1993;49:810-813.
26. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp Cell Res* 1972;75:304-306.
27. Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique- *Biotech & Histochem* 2012;87:433-438.
28. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 1980;36:1014-1015.
29. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964;52:201-220.
30. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ (eds), pp. 315-322, Academic Press, NY, 1990.
31. Martins C, Galetti PM. Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 1999;7:363–367.
32. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934–2938.

33. Tenório RCCO, Vitorino CA, Souza IL, Oliveira C, Venere PC. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotrop Ichthyol* 2013;11:553-564.
34. Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta AO, Santos MH, Nogaroto V, *et al.* Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Rev Fish Biol Fish* 2015;25:231-244.
35. Mantovani M, Abel LD, Mestriner CA, Moreira-Filho O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 2000;109:161–168.
36. Abelini E, Martins-Santos IC, Fernandes CA. Cytogenetic analysis in three species from genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes) with a new occurrence of B chromosome in *Astyanax paranae*. *Caryologia* 2014; 67:160-171.
37. Kavalco KF, Brandão KO, Pazza R, Almeida-Toledo LF. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? *Genet Mol Biol* 2009;32:477-483.
38. Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 2002;97:229-233.
39. Barbosa P, Oliveira LA, Pucci MB, Santos MH, Moreira-Filho O, Vicari MR, *et al.* Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica* 2015;143:55-62.

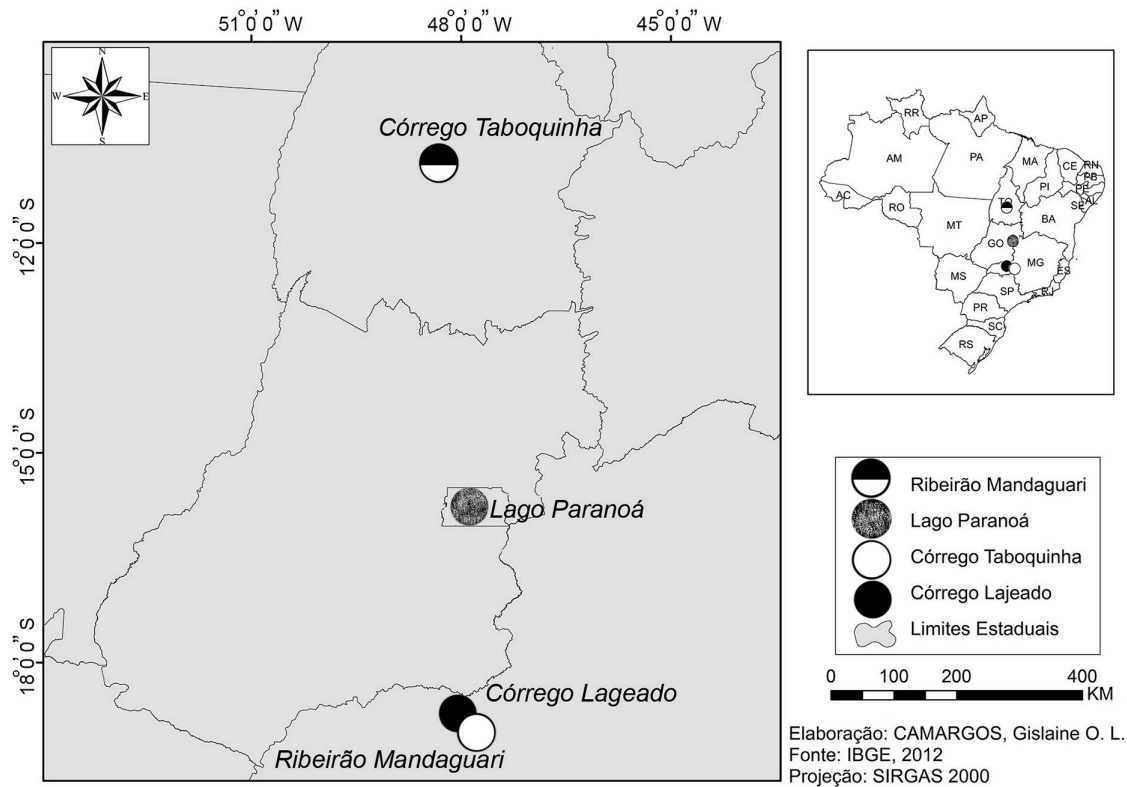


Figure 1. Map of Brazil with indication of collection sites of *A. paranae* (shaded circles, black and white) in the Paranaíba river basin, and *A. elachylepis* (circles black and white) in the Tocantins river basin.

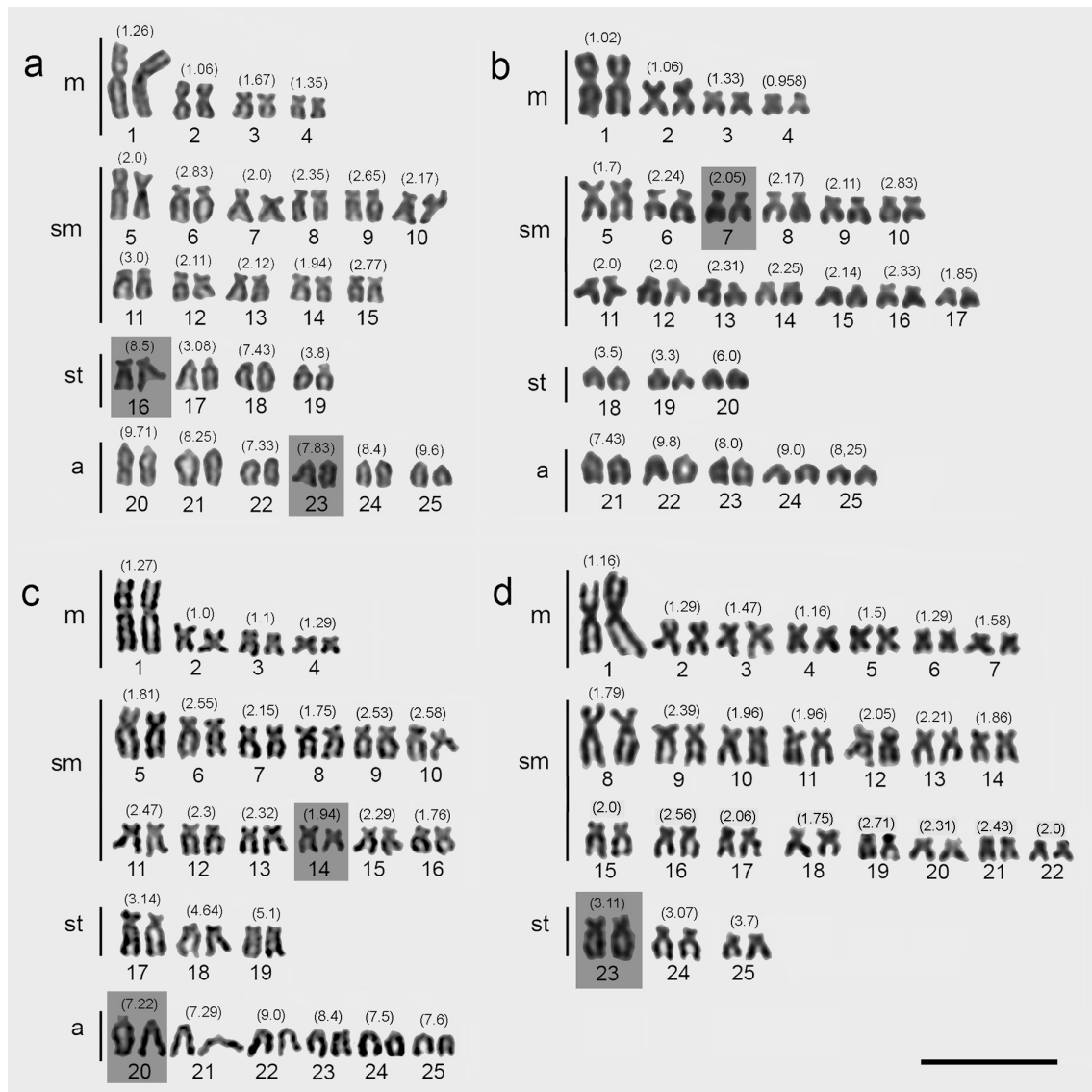


Figure 2. Somatic karyotypes of *Astyanax paranae* (a – Mandaguari river, b – Córrego Lajeado, c – Paranoá Lake) and *Astyanax elachylepis* (d – Córrego Taboquinha) stained with Giemsa. The value of the arm ratio (AR) is indicated above each chromosome pair and obtained by the mean AR of each of homologous pairs. Chromosomes that carry Ag-ORNs are highlighted in dark grey boxes in each karyotype. The bar represents 10 µm.

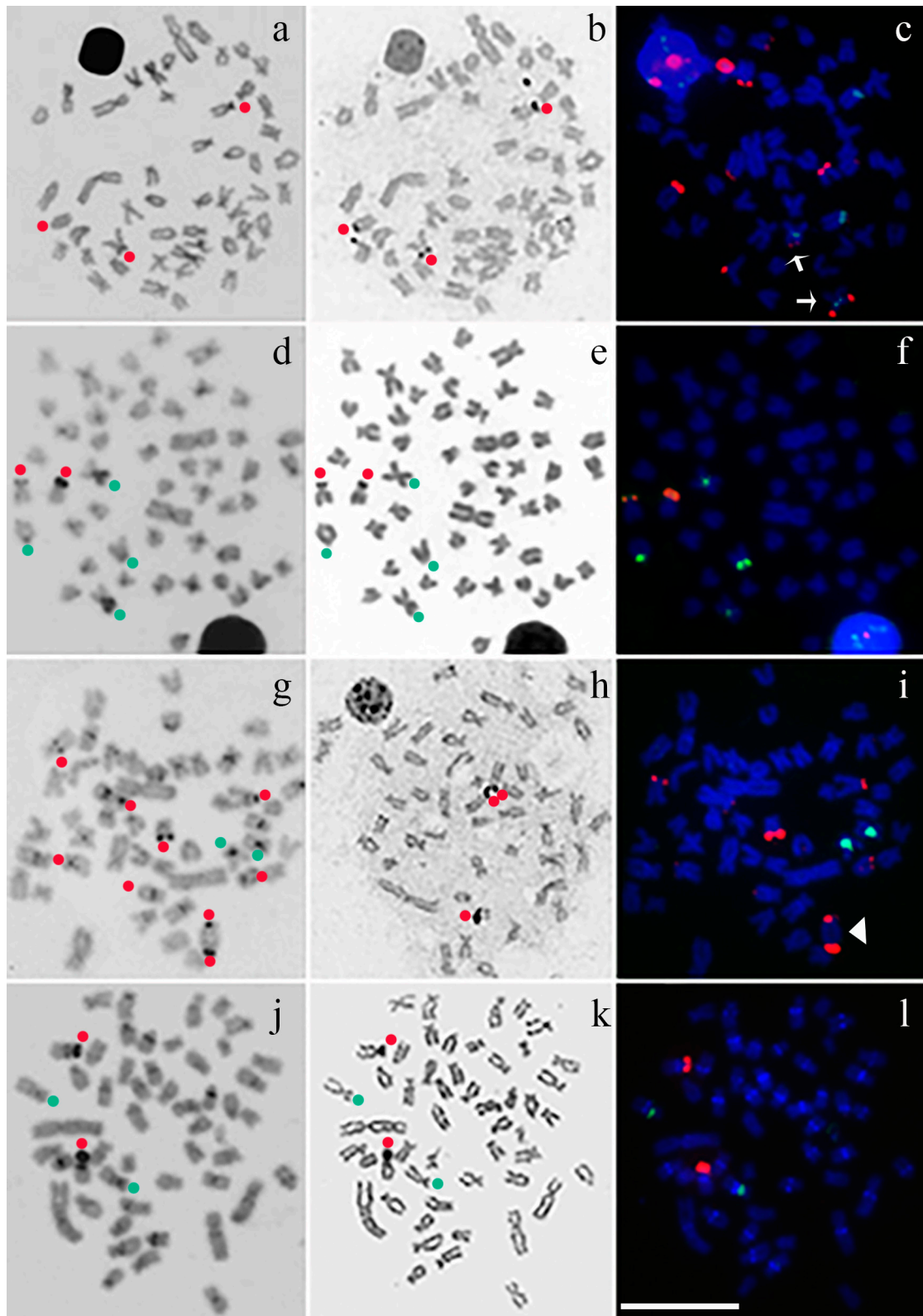


Figure 3. Somatic metaphases of *Astyanax paranae* (a, b, c – Mandaguari river, d, e, f – Córrego Lajeado, g, h, i – Paranoá Lake) and *Astyanax elachylepis* (j, k, l – Córrego Taboquinha), showing constitutive heterochromatin (C-band), nucleolus organizer regions (Ag-NORs) and double FISH with 18S and 5S probes, respectively. Circles and red staining indicate the localization of ORNs

and circles and green staining indicate the localization of 5S sequences. The arrows in (c) indicate chromosomes stained with rDNA 18S e 5S in synteny. The arrowhead in (i) indicates bitelomeric 18S rDNA staining. Each bar represents 10µm.

Table 1. Sample data of the *Astyanax* populations studied.

Species	N/sex	Location	Coordinates
<i>A. paranae</i>	15/ 10m; 5f	Mandaguari River, Paranaíba river basin, Indianópolis-MG	18°57'31.3"S 47°53'28.2"W
<i>A. paranae</i>	9/ 4m; 5f	Córrego Lajeado, River Paranaíba basin, Indianópolis-MG	18°53'23.1"S 47°55'14.7"W
<i>A. paranae</i>	6/ 4m; 2f	Paranoá Lake, River Paranaíba basin, Brasília-DF	15°44'03.9"S 47°50'17.2"W
<i>A. elachylepis</i>	20/ 12m; 8f	Córrego Taboquinha, River Tocantins basin, Monte do Carmo-TO	10°47'11.12"S 48°13'16.57"W

N: number of sampled species; m: male; f: female; MG: Minas Gerais; FD: Federal District; TO: Tocantins.

Table 2. Karyotype data of the *Astyanax* populations studied.

Species	Population	2n	NF	Karyotypic Formula
<i>A. paranae</i>	Mandaguari river	50	88	8m+22sm+8st+12a
<i>A. paranae</i>	Córrego Lajeado	50	90	8m+26sm+6st+10a
<i>A. paranae</i>	Paranoá Lake	50	88	8m+24sm+6st+12a
<i>A. elachylepis</i>	Córrego Taboquinha	50	100	14m+30sm+6st

2n: diploid number; NF: fundamental number; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric; a: acrocentric.

1.5 Considerações Finais

A Hibridação Fluorescente *In Situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S e 5S revelaram grande variação intraindividual nas duas espécies de *M. oligolepis* analisadas, o que pode estar relacionado a grande quantidade de repetições desses cístrons de rDNA gerando variabilidade na localização dos genes rRNA no cariótipo.

O alto número de cístrons de rDNA 18S pode ser explicado por eventos de transposição observados em outros grupos de peixes (Castro et al., 1996; Almeida-Toledo et al., 1996).

A variabilidade citogenética constatada pelas análises da macroestrutura cariotípica, padrão de Ag-RONs, banda C e localização dos sítios de rDNA confirma a hipótese que algumas espécies de pequenos tributários possuem a capacidade de formarem populações isoladas sob pressões seletivas específicas.

A análise profunda do material genético, tanto em nível citogenético quanto molecular, pode responder questões relativas a diversos aspectos relacionados às mudanças observadas nas populações, inclusive, a presença dos cromossomos B.

As técnicas de citogenética molecular avançadas como a FISH e a microdissecção cromossômica tornam possível explorar com maior precisão as semelhanças entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento padrão.

ANEXOS

1.6 Protocolos de Citogenética Convencional

1.6.1 Estimulação de mitoses

Com o objetivo de se obter uma maior frequência de células em divisão mitótica nas preparações, os animais foram submetidos à injeção prévia de Cloreto de Cobalto, conforme descrito por Cucchi & Baruffaldi (1990), os quais propuseram a aplicação de Cloreto de cobalto (CoCl_2) em peixes para intensificar a frequência de mitoses nas células.

O Cloreto de cobalto age bioquimicamente inibindo a ação da piruvato desidrogenase em acetil coenzima A e da α --cetoglutarato desidrogenase, duas enzimas que são de vital importância na respiração celular. Assim o O_2 não pode ser consumido e o tecido “entende” como hipoxia o que estimula a formação de heritropoetina, conduzindo ao aumento na proliferação celular do tecido hematopoiético (Cucchi & Baruffaldi, 1990).

O procedimento utilizado consiste em:

- 1) Preparar uma solução de Cloreto de Cobalto na seguinte proporção: 400 mg de Cobalto e 100 ml de água destilada;
- 2) Injetar a solução na região dorso-lateral do peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 3) Deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado por cerca de 18 a 20 horas antes de sacrificar;

1.7 Obtenção de Cromossomos Metafásicos Mitóticos

Para obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica proposta por Foresti et al. (1978). Esta metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das

células em suspensão por solução de KCl e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento utilizado consistiu em:

- 1) Injetar intraperitonealmente no peixe, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução de colchicina (0,025%), na proporção de 1ml por 100g de massa corpórea do animal;
- 2) Colocar o tecido em 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C;
- 3) Fragmentar esse material, com auxílio de pinça de dissecação desprovida de agulha, aspergindo e expirando o material até que fique homogêneo;
- 4) Transferir o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por 20 minutos (pedaços de tecidos ainda não desfeitos são descartados);
- 5) Acrescentar 1ml de fixador Carnoy recém preparado (álcool metílico : ácido acético 3:1), e ressuspender o material deixando-o em temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugá-lo durante 10 minutos a 500rpm;
- 6) Descartar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur;
- 7) Adicionar 6-8 ml de fixador;
- 8) Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos;
- 9) Descartar o sobrenadante e repetir esse procedimento;
- 10) Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1 ml de fixador para 0,5 ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo;

11) Colocar uma lâmina limpa em água a 60° C. Pingar três gotas da suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida e secar ao ar;

12) O material deve ser guardado em tubos tipo eppendorf e mantidos em freezer à -20°C.

1.8 Coloração convencional com Giemsa

As preparações cromossômicas depositadas nas lâminas foram coradas por 5 minutos com solução de Giemsa a 5 % em tampão Fosfato (pH=6,7).

1.9 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs)

Para identificar as RONS foi utilizada a técnica de impregnação por nitrato de Prata descrita por Howell & Black (1980). Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas ácidas que compõem o complexo protéico nas regiões organizadoras de nucléolos. O procedimento envolveu o uso de duas soluções:

- **Solução A** (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada. Adiciona-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- **Solução B** (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO₃ dissolvida em 2 ml de água destilada. Estas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4 °C. Procedeu-se da seguinte maneira:

1) Hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60 °C;

2) Lavar em água destilada e secar a lâmina;

- 3) Misturar em um tubo Eppendorf duas gotas da solução A e uma gota da solução B com o auxílio de pipetas Pasteur;
- 4) Cobrir a lâmina com uma lamínula;
- 5) Depositar a lâmina em um suporte no interior de um banho-maria a 65 °C com a lamínula voltada para cima. Em aproximadamente 2 minutos a lâmina torna-se marrom-dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar;
- 6) Corar com solução de Giemsa 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por 10 segundos;
- 7) Lavar o material da lâmina e deixar secar ao ar.

1.10 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita originalmente por Sumner (1972). Esta técnica baseia-se na ação sequencial de tratamentos com base, ácido e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, que se encontram mais compactadas. O procedimento consistiu em:

- 1) Tratar a lâmina contendo os cromossomos mitóticos com uma solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, durante 15 minutos;
- 2) Lavar em água deionizada e secar ao ar;
- 3) Submergir as lâminas numa cuba com 2 x 2xSSC por 15 minutos, a 37°C;
- 4) Lavar e secar ao ar;
- 5) Submergir as lâminas em um cuba com hidróxido de Bário a 5% por 40 a 60 segundos, a 42°C;

- 6) Lavar em solução de HCl 0,2N e em seguida em água deionizada e secar ao ar;
- 7) Incubar as lâminas numa solução salina de 2 2xSSC, aquecida por 30 minutos a 60°C;
- 8) Lavar em água deionizada e secar ao ar;
- 9) Corar com Giemsa à 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 20 a 30 minutos;
- 10) Lavar em água deionizada e secar ao ar.

1.11 Estudos Cariotípicos

A identificação cromossômica foi realizada baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposta por Levan et al. (1964) e classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtelocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00).

1.12 Citogenética Molecular

1.12.1 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

1.12.1.1 Obtenção das sondas

Para a identificação das regiões de DNAr 5S foi utilizada a sonda obtida usando os primers A 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (Martins & Galetti, 1999). A sonda de DNAr 18S foi obtida a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti., 2004).

1.12.1.2 Marcação de sonda por nick translation

Misturar 4 µl do mix de nick translation com 1,5 µg do DNA de interesse e completar com água destilada, para volume final de reação de 20 µl. Deixar a reação durante 1h e 30min a 15°C. Após adicionar 2 µl de EDTA 0,5 M e deixar a reação a 65°C durante 15 min, para inativação da reação.

1.12.1.3 Marcação da sonda por PCR

Nas reações de amplificação e marcação por PCR, utilizou-se os nucleotídeos modificados dUTP biotina ou dUTP digoxigenina.

1.12.1.4 Observação dos tamanhos dos fragmentos em gel

Misturar 3 µl da reação de nick translation ou de PCR com 1 µl de azul de bromofenol e aplicar em gel de agarose 1% e 3 µl gel red;

Aplicar a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos.

1.12.1.5 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

Lavar as lâminas em tampão PBS uma vez durante 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada (secar);

Incubar as lâminas em 90 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;

Fixar em formaldeído 1% em PBS uma vez, 50 mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente;

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85%, 100% por 5 minutos cada;

Desnaturar em série alcoólica, a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;

Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada;

Preparar câmara úmida à 37°C;

Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar 12h à 37°C;

1.12.1.6 Lavagens

Lavar duas vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada sob agitação;

Lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada sob agitação;

Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/ 4xSSC por 15 minutos;

Lavar duas vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/ 800 µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/800 µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar ao ar.

1.13 Montagem da lâmina

Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI – 4'-6 diamidino – 2 - phenilindole (50 µg/ml);

Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

1.14 Análise dos Marcadores citogenéticos

Para cada uma das técnicas aplicadas foram examinadas 30 células metafásicas ou meióticas. As preparações foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 40 e capturadas com câmera digital CCD Olympus DP71 13 mp. Para a análise com DAPI foi utilizado filtro de comprimento de onda variando de 360 a 390 nm.

TABELAS

1.15 Tabelas das frequências cromossômicas das duas populações de *Moenkhausia oligolepis* estudadas.

Tabela da população do Córrego Taboquinha período 2009/2010.

Nº Registro	Sexo	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	Total Células
1734	♀	0	7	14	12	4	10	4	0	0	0	0	51
1735	♀	54	5	16	0	0	0	0	0	0	0	0	75
1739	♀	10	15	37	7	41	3	2	0	0	6	6	127
1817	♂	43	0	10	1	2	2	1	0	0	0	0	59
1818	-	10	0	21	11	8	0	0	0	0	0	0	50
1819	-	0	6	6	18	30	4	14	0	0	0	0	78
1820	-	0	0	10	25	4	6	4	4	0	0	0	53
1823	♀	16	5	6	21	6	20	0	2	0	0	0	76
1825	♂	2	0	6	14	29	3	0	0	0	0	0	54
1826	-	16	6	20	31	9	2	0	0	0	0	0	84
1827	-	11	7	3	1	5	0	5	29	1	0	0	62
1828	♂	25	12	8	0	8	0	0	0	0	0	0	53
1832	♀	0	4	10	8	30	4	10	14	0	2	4	86
1834	♂	10	17	14	7	2	0	0	0	0	0	0	50
1843	♀	26	29	3	2	0	0	0	0	0	0	0	60
1852	♂	23	18	14	0	0	0	0	0	0	0	0	55
1854	♂	34	16	4	18	2	0	0	0	0	0	0	74
Total		280	147	202	176	180	54	40	49	1	8	10	1147

Tabela da população do Córrego Taboquinha período 2011/2012.

Nº Registro	Sexo	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	Total
2376	♂	93	4	2	0	0	0	0	0	0			99
2379	♂	71	1	1	0	0	0	0	0	0			73
2382	*	14	11	8	7	10	3	1	2				56
2383	*	50	0	0	0	0	0	0	0				50
2386	♀	2	2	3	2	5	0	0	0				14
2389	*	22	0	0	0	0	0	0	0				22
2390	♀	11	0	0	0	0	0	0	0				11
2393	♀	4	5	20	21	18	1	0	0				69
Total		267	23	34	30	33	4	1	2	0	0	0	394

Tabela da população do Córrego Taboquinha período 2013/2014.

Nº Registro	Sexo	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	Total
2671	♀	25	0	19	10	0	0	0	0	0	0	0	54
2673	♀	0	0	22	31	17	1	1	0	0	0	0	72
2676	♂	6	15	26	10	16	6	9	3	12	6	3	112
2677	♂	11	19	24	0	1	1	2	0	0	0	0	58
2679	♀	0	3	15	0	26	3	20	0	0	0	0	67
2680	♀	58	11	10	4	0	0	0	0	0	0	0	83
2681	♀	6	1	11	11	16	10	13	8	2	0	0	78
2682	♀	4	5	18	3	22	12	4	0	1	0	0	69
2683	♀	5	1	21	13	7	1	1	0	0	0	0	49
2698	♀	2	0	0	8	4	4	5	10	8	1	0	42
2702	♀	22	30	52	1	0	0	0	0	0	0	0	105
Total		139	85	218	91	109	38	55	21	23	7	3	789

Tabela da população do Córrego Pedro Correia período 2011/2012.

Nº Registro	Sexo	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	Total
2364	♀	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34
2365	*	81	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	82
2366	♀	107	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	111
2367	♂	60	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61
2368	♀	113	10	0	2	0	0	0	0	0	0	0	125
2369	♀	29	8	10	1	0	0	0	0	0	0	0	48
2370	♀	100	13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	114
2371	♀	103	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	111
2372	♀	110	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	121
2373	♀	98	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Total		835	54	15	3	0	0	0	0	0	0	0	907

Tabela da população do Córrego Pedro Correia período 2013/2014.

Nº Registro	Sexo	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	Total
2647		0	0	13	0	11	0	0	10	0	0	0	34
2652		12	5	9	16	17	4	7	8	10	0	0	88
2660	♂	10	9	10	9	8	9	9	0	0	0	0	64
2665	♂	10	26	20	6	4	5	0	0	0	0	0	71
2667		15	25	25	3	0	0	0	0	0	0	0	68
2694	♀	16	14	10	11	10	0	8	0	0	0	0	69
2695	♀	6	15	22	12	5	0	0	0	0	0	0	60
2700	♀	23	27	6	0	0	0	0	0	0	0	1	57
Total		92	121	115	57	55	18	24	18	10	0	1	511

Dados de média e desvio padrão para tabela de Índice Mitótico da população do Córrego Taboquinha.

		0 B	1 B	2 B	3 B	4 B	5 B	6 B	7 B	8 B	9 B	10 B
2009/2010	Média Aritmética	16,5	8,6	11,9	10,4	10,6	3,2	2,4	2,9	0,1	0,5	0,6
	Desvio Padrão	16,0	8,1	8,5	9,6	13,1	5,1	4,1	7,6	0,2	1,5	1,7
2011/2012	Média Aritmética	33,4	2,9	4,3	3,8	4,1	0,5	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
	Desvio Padrão	34,0	3,8	6,9	7,4	6,7	1,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,0
2013/2014	Média Aritmética	12,6	7,7	19,8	8,3	9,9	3,5	5,0	1,9	2,1	0,6	0,3
	Desvio Padrão	17,2	9,9	13,0	8,9	9,7	4,2	6,5	3,6	4,1	1,8	0,9

Dados de média e desvio padrão para tabela de Índice Mitótico da população do Córrego Pedro Correia.

		0 B	1 B	2 B	3 B	4 B	5 B	6 B	7 B	8 B	9 B	10 B
2011/2012	Média Aritmética	83,5	5,4	1,5	0,3	0	0	0	0	0	0	0
	Desvio Padrão	31,6	4,9	3,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
2014	Média Aritmética	20,4	26,9	25,6	12,7	12,2	4,0	5,3	4,0	2,2	0,0	0,2
	Desvio Padrão	27,6	36,6	34,2	17,5	16,9	6,1	8,0	6,6	4,4	0,0	0,4